



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Caracterización genómica y fenotípica
de la especie *Brycon henni*
(Characiformes: Characidae) en cuencas
hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso,
Guabas y Sabaletas**

Edilma Vélez Sinisterra

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencia Animal
Palmira, Colombia
2020

Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

Edilma Vélez Sinisterra

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencias Agrarias

Director:

Ph.D. Jaime Eduardo Muñoz Flórez

Codirector:

MSc. Carlos Alberto Jaramillo Cruz

Línea de Investigación:

Producción Animal Tropical

Grupo de Investigación:

Diversidad Biológica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencia Animal

Palmira, Colombia

2020



Dedicatoria

A mis padres y familiares.

*Por creer en mí y apoyarme incondicionalmente
en todas las etapas de mi vida.*

Agradecimientos

A Colciencias (hoy Minciencias) que, por medio del programa de jóvenes investigadores, me ayudó a emprender en el camino de la investigación.

A la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira.

A mis maestros: Jaime Eduardo Muñoz Flórez, Carlos Alberto Jaramillo Cruz y Diana López Álvarez, por creer en mí y compartir sus conocimientos.

A Jorge Mario Londoño, por contribuir a la construcción de la idea de investigación.

A mis compañeros de pesca: Álvaro Domínguez, Adriana Rueda, Fernando Montenegro, Manuel Esteban Bordón, Iván Manuel López, Andi Pamela Mendoza, Joaquín Alonso Marín Caicedo, Marino Arango Escobar, Oscar Arango Gómez, por la compañía, el aprendizaje y las experiencias.

A mi segunda familia, los grupos de investigación en Diversidad Biológica y Recursos Zoogenéticos por compartir la mayor parte del tiempo, especialmente a Claudia Lenis y a Paula Rugeles.

Al profesor Héctor Fabio Ramos Rodríguez, por ser un gran amigo y quien me motivó a terminar esta etapa.

Finalmente, a mis padres, Amanda y Gustavo, a mis hermanos, Gisel y Camilo, a mi cuñado Cristóbal y a mi sobrina Aura que con mucho amor, cariño y comprensión me apoyaron en esta etapa importante en mi vida.

Resumen

Aun cuando se presenta gran diversidad y cantidad de especies marinas y dulceacuícolas en Colombia, los estudios referidos a las relaciones filogenéticas de las especies ícticas en el país siguen siendo insuficientes, pese a la necesidad de caracterización rigurosa de la ictiofauna local.

La presente investigación tuvo como objetivo caracterizar la especie dulceacuícola *Brycon henni* en cuencas hidrográficas ubicadas en cuatro municipios del departamento del Valle del Cauca-Colombia, mediante el uso de código de barras y morfometría geométrica. Se empleó un gen nuclear altamente conservado que pudiera ser amplificado y secuenciado fácilmente (RAG1), así como las regiones mitocondriales 16S rRNA y COI. Los resultados mostraron una identificación de cuatro especies *Brycon sp.*, para los individuos colectados en Sabaletas (Buenaventura), *Brycon henni* para los individuos provenientes de Guabas, Sonso y Yotoco, *Bryconamericus caucanus* para dos individuos colectados en Guabas y finalmente *Creagrutus sp.* para cinco individuos colectados en Yotoco. Para la morfometría geométrica se utilizaron imágenes y se registraron un total de nueve marcas en cada individuo. Los resultados indicaron una separación completa de las especies *Brycon sp.* y *Brycon henni* por medio de la estructura del cuerpo. Asimismo, se observa una marcada separación con los individuos de la especie *Creagrutus sp.* y *Bryconamericus caucanus*.

Palabras clave: Morfometría geométrica, código de barras, sabaleta.

Abstract

Even when there is great diversity and quantity of marine and freshwater species in Colombia, studies regarding the phylogenetic relationships of fish species in the country are still insufficient, despite the need for rigorous characterization of the local fish fauna.

The objective of the present investigation was to characterize the freshwater species *Brycon henni* in hydrographic basins located in four municipalities of the department of Valle del Cauca-Colombia, through the use of barcode and geometric morphometry. A highly conserved nuclear gene that could be easily amplified and sequenced (RAG1) was used, as well as the 16S rRNA and COI mitochondrial regions. The results showed an identification of four species *Brycon sp.*, for the individuals collected in Sabaletas (Buenaventura), *Brycon henni* for the individuals from Guabas, Sonso and Yotoco, *Bryconamericus caucanus* for two individuals collected in Guabas and finally *Creagrutus sp.* for five individuals collected in Yotoco. For geometric morphometry, images were used and a total of nine marks were recorded in each individual. The results indicated a complete separation of the *Brycon sp.* and *Brycon henni* through body structure. Likewise, a marked separation is observed with the individuals of the species *Creagrutus sp.* and *Bryconamericus caucanus*.

Keywords: Geometric Morphometry, Barcode, Sabaleta.

Contenido

	Pág.
Resumen	vi
Contenido	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xi
Introducción	1
1. Capítulo 1. Marco referencial.....	5
1.1 Seguridad alimentaria mundial.....	5
1.2 La acuicultura como seguridad alimentaria en Colombia.....	6
1.3 Género <i>Brycon</i>	8
1.4 Aspectos generales de la especie <i>Brycon henni</i>	9
1.4.1 Clasificación taxonómica.....	9
1.4.2 Morfología de la especie <i>Brycon henni</i>	9
1.4.3 Nombres comunes	10
1.4.4 Biología y ecología de la especie <i>B. henni</i>	10
1.4.5 Distribución	11
1.4.6 Reproducción	12
1.4.7 Conservación	13
1.5 Diversidad genética.....	13
1.6 Código de Barras de ADN	15
1.7 ADN mitocondrial	16
1.7.1 Citocromo c oxidasa I	18
1.7.2 16 S rRNA.....	19
1.8 ADN nuclear	20
1.8.1 Gen de activación de recombinación uno (RAG1).....	21
1.9 Morfometría	22
1.10 Morfometría geométrica	23
1.11 Hitos	24
1.12 Bibliografía	25
2. Capítulo 2. Código de barras de la especie <i>Brycon henni</i> en las cuencas hidrográficas de Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas.....	36

ix Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

2.1	Resumen	36
2.2	Abstract	37
2.3	Introducción	38
2.4	Materiales y métodos	42
2.4.1	Sitios de recolección de muestras	42
2.4.2	Material experimental	43
2.4.3	Extracción de ADN	43
2.4.4	Medición de la calidad y cantidad de ADN	44
2.4.5	Amplificación de ADN, purificación y secuenciamiento	45
2.4.6	Análisis de datos	48
2.4.6.1	Alineación de datos	48
2.4.6.2	Análisis de las distancias genéticas	48
2.4.6.3	Análisis de redes de haplotipos	48
2.4.6.4	Análisis filogenético	48
2.5	Resultados	49
2.6	Discusión	67
2.7	Conclusiones	70
2.8	Recomendaciones	71
2.9	Bibliografía	71

3. Capítulo 3. Caracterización morfométrica de la especie *Brycon henni* en las cuencas hidrográficas de Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas79

3.1	Resumen	79
3.2	Abstract	80
3.3	Introducción	81
3.4	Materiales y métodos	84
3.4.1	Muestra	84
3.4.2	Análisis de datos	85
3.4.3	Análisis estadísticos	87
3.5	Resultados	90
3.5.1	Morfometría geométrica entre zonas geográficas	91
3.5.1.1	Análisis de Componentes Principales entre zonas geográficas	92
3.5.2	Morfometría geométrica entre especies	93
3.5.2.1	Análisis de Componentes Principales entre especies	93
3.5.2.2	Análisis de Variantes Canónicas	94
3.5.2.3	Regresión múltiple	96
3.5.2.4	Análisis de Función Discriminante	97
3.6	Discusión	99
3.7	Conclusiones	101
3.8	Recomendaciones	101
3.9	Bibliografía	102

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Sabaleta.	9
Figura 1-2: Distribución geográfica de <i>B. henni</i>	12
Figura 1-3: Posición de los genes mitocondriales en la secuencia de <i>B. henni</i>	18
Figura 2-1: Gel de agarosa al 1 %, 1 - 24 algunas muestras de peces con buena calidad de ADN para los procesos moleculares, concentraciones del bacteriófago λ	45
Figura 2-2: Gel de agarosa 1,5 %, para las regiones a) COI I, b) 16S y c) RAG1. (M) Marcador molecular.	47
Figura 2-3: Mapa de coordenadas geográficas de Guabas, Yotoco, Sonso y Sabaletas-Buenaventura.	49
Figura 2-4: Red de haplotipos para las regiones a) COI, b) 16S y c) RAG1.	62
Figura 2-5: Árboles generados por el método de Neighbor-Joining, empleando las distancias de K2P (Kimura, 1980), con base en las secuencias de las regiones: a) COI, b) 16S, c) RAG1 y d) Datos combinados (COI-16S-RAG1).	65
Figura 3-1: <i>Brycon</i> sp. del río Sabaletas-Buenaventura.	85
Figura 3-2: Individuo mostrando los nueve hitos del análisis morfogeométrico.	87
Figura 3-3: Superposición de Procrustes de los hitos. Los puntos más grandes pertenecen al consenso.	91
Figura 3-4: Estructura consenso originada a partir de los nueve hitos en los 40 especímenes.	91
Figura 3-5: Diagrama de dispersión de los CP1 y CP2 por zona geográfica.	93
Figura 3-6: Diagrama de dispersión de los CP1 y CP2 por especies.	94
Figura 3-7: Diagrama de dispersión de los CV1 y CV2 por especies.	95
Figura 3-8: Diagrama de dispersión análisis de regresión múltiple por especies.	97
Figura 3-9: Análisis de la variable canónica de <i>Brycon henni</i> y <i>Brycon</i> sp.	98

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Clasificación taxonómica de <i>Brycon henni</i> (Abe et al., 2014).....	9
Tabla 2-1: Georreferenciación para los puntos de colecta.	43
Tabla 2-2: Cebadores usados para la amplificación de diferentes fragmentos de genes de ADN mitocondrial y ADN nuclear.	45
Tabla 2-3: Resultados de alineamiento en BLAST para las secuencias.	50
Tabla 2-4: Resultados de alineamiento de la región COI en BLAST para las muestras del río Sabaletas-Buenaventura.	51
Tabla 2-5: Resultados de alineamiento de la región 16S en BLAST para las muestras del río Sabaletas-Buenaventura.	52
Tabla 2-6: Resultados de alineamiento de la región RAG1 en BLAST para las muestras del río Sabaletas-Buenaventura.	54
Tabla 2-7: Variación de la secuencia y poder de discriminación de tres regiones estudiadas para el Código de Barras de ADN.	56
Tabla 2-8: Lista de haplotipos de <i>Brycon henni</i> , <i>Bryconamericus caucanus</i> , <i>Brycon sp.</i> y <i>Creagrutus sp.</i> , obtenidos del análisis estadístico de parsimonia (TCS) para las secuencias completas de COI, 16S y RAG1.	59
Tabla 3-1: Valores y porcentajes de los componentes principales.	92
Tabla 3-2: Distancia de Mahalanobis en la matriz triangular inferior y distancias de Procrustes en la matriz triangular superior.	95
Tabla 3-3: Clasificación de los grupos.	96
Tabla 3-4: Análisis de Función Discriminante aplicado a <i>Brycon sp.</i> y <i>Brycon henni</i>	98

Introducción

Colombia, por su extensa hidrografía y por ser uno de los países con los más altos índices de biodiversidad del planeta, constituye un potencial para que la pesca continental se desarrolle como una de las bases económicas del país, siendo la pesca de agua dulce una fuente de subsistencia y de importancia en términos de seguridad alimenticia principalmente para pobladores ribereños (Lasso *et al.*, 2011).

Los peces del orden de los Characiformes se encuentran en gran diversidad de ambientes tales como ríos con corrientes rápidas, afluentes del piedemonte andino, cordilleras del neotrópico, así como en sistemas de agua lénticos de las llanuras inundadas de las tierras bajas de América y África (Oliveira *et al.*, 2011).

Las especies de aguas continentales que se encuentran reportadas en Colombia son aproximadamente 1572, pero solo el 24,9 % son endémicas de Colombia (DoNascimento *et al.*, 2018), una de estas especies es la sabaleta *Brycon henni*, que se distribuye en las cuencas de los ríos Cauca, Magdalena, San Juan, Patía; habita en aguas corrientosas, limpias y cálidas (Arboleda *et al.*, 2005).

La sabaleta puede encontrarse a una altura entre los 1000 a 2000 m s.n.m. y tiene un potencial promisorio en cuanto a la producción a gran escala, teniendo en cuenta que se pueden aprovechar embalses y lagos abundantes en las condiciones ecosistémicas adecuadas para el desarrollo de la especie, realizando piscifactorías por medio de jaulas; de otra parte, es importante su consumo para las comunidades ribereñas donde habita, por ser un recurso pesquero que aporta a la cultura gastronómica y la seguridad alimentaria, además de constituir un alimento que contiene alto valor nutricional para la dieta (Montoya *et al.*, 2006).

2 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

B. henni no aparece en ninguna de las categorías de riesgo propuestas por el *Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia* (Mojica *et al.*, 2012), ni en la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Tognelli *et al.*, 2016), aun así, diversos autores expresan que podría estar en peligro de extinción, dado que se ha expuesto a construcción de embalses, contaminación de cuencas hídricas y pesca indiscriminada, por tanto, es importante realizar la identificación genética por medio de códigos de barras y, de forma complementaria, hacer la identificación taxonómica por morfometría (Pineda *et al.*, 2007).

En cuanto a la primera técnica, se establece que los códigos de barras de ADN son cortas secuencias de genes, segmentos de una porción fija del genoma, usado para identificar especies; en la actualidad esta técnica es investigada por profesionales del sector agropecuario, ya que se puede recuperar una secuencia corta estandarizada de ADN y es un marcador único de identificación para todas las especies en el mundo; asimismo, se emplea como instrumento para abordar temas esenciales en conservación, evolución y ecología (Kress *et al.*, 2015).

La aplicación de la técnica de códigos de barras de ADN en peces presenta ventajas comparativas con respecto a la identificación tradicional, los códigos de barras pueden abarcar todas aquellas especies que se han pasado por alto debido a su alta sensibilidad y permite la identificación en donde no pueden emplearse métodos convencionales (Ward *et al.*, 2009).

El gen nuclear RAG1 (Recombination Activating Gene 1), por su parte, es de importancia sustancial para efectuar la caracterización molecular, toda vez que en esta región es donde se encuentra la mayoría de la información génica del individuo, además, Baker *et al.* (2004), reseñaron que son genes altamente conservados en vertebrados; las regiones mitocondriales 16S rRNA y Citocromo C Oxidasa subunidad I (COI) son fundamentales para el estudio ya que, como señalan Ward *et al.*, 2005, el ADN es heredado de la madre, por lo cual se puede obtener información genética materna en la línea ascendente.

La morfometría, según De Luna (2020), “es el estudio de la forma y tamaño de objetos empíricos mediante el uso de descriptores cuantitativos”. Para Polly (2018), la morfometría

geométrica es un tipo de metodología multivariada que sirve para medir y evaluar las formas de los cuerpos. Una desventaja en la metodología de morfometría geométrica es que es difícil ubicar los puntos fijos y los que se modifican por la biología. En tanto que para MacLeod, 2017, los investigadores pueden usar la morfometría geométrica como un conjunto de instrumentos para describir y entender problemas que traten sobre diferencias y semejanzas morfológicas en varios ámbitos.

Teniendo en cuenta la importancia de la especie entre las comunidades ribereñas, por su aporte a la cultura pesquera y la seguridad alimentaria, y considerando la vulnerabilidad en la que se encuentra la sabaleta, el objetivo general de este trabajo es identificar por medio de código de barras a la especie íctica *Brycon henni* y realizar la caracterización morfológica de la especie, presente en diferentes cuencas hidrográficas del Valle del Cauca (Guabas, Yotoco, Sonso, Sabaletas).

Capítulo 1. Marco referencial

1.1 Seguridad alimentaria mundial

En el informe de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación, la FAO (1996) definió Seguridad Alimentaria en términos de su función, como aquella que:

A nivel de individuo, hogar, nación y global, se consigue cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana.

Los humanos consumen alimentos derivados de ambientes acuáticos porque son recursos proteicos esenciales para la salud, además por razones culturales y gastronómicas. Para las comunidades es una meta conservar la producción y abastecimiento a largo plazo en la acuicultura y en la pesca de captura en los medios naturales. Igualmente, es importante contar con una producción ambientalmente sostenible y que no involucre otros bienes y servicios ecosistémicos, para conservar la biodiversidad y la productividad de los elementos alimenticios (Jennings *et al.*, 2016).

La pesca y la acuicultura son sectores que representan subsistencia e ingresos para millones de pobladores en el planeta. A nivel mundial, el pescado y sus subproductos son importantes en cuanto a la seguridad alimentaria y nutricional, ya que están presentes nutrientes y micronutrientes esenciales para fabricar diversas dietas (FAO, 2018).

Los datos que respaldan las tesis planteadas pueden ser dimensionadas teniendo en cuenta que en los países en desarrollo para el año 2013 el consumo de pescado por persona fue de 18,8 Kg, este consumo a nivel mundial ha mejorado la alimentación y nutrición de las personas; aproximadamente el 20 % del consumo medio de proteínas de

6 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

origen animal fue gracias al pescado suministrado a más de 3100 millones de personas (FAO, 2016), el pescado es un alimento que aporta diferentes nutrientes que son provechosos, tales como la proteína y el omega 3 (Sanabria, 2019), dicho alimento es importante en la parte nutricional por la calidad y cantidad de proteínas, aporte de ciertos minerales, vitaminas y especialmente por tener ácidos grasos esenciales (De Oliveira y Amancio, 2012).

Una fuente importante tanto de proteína como de nutrientes esenciales para el consumo humano están contenidos en el pescado, este puede provenir ya sea de producciones acuícolas o de poblaciones naturales de aguas continentales o marítimas (HLPE, 2014).

En el mundo, en el año 2014, la pesca de captura procedente de agua dulce fue 11,9 millones de toneladas y en aguas marítimas fue 81,5 millones de toneladas. La producción de pesca de captura en aguas dulces continúa aumentando en un 37 % en la última década; el 80 % al año de las capturas continentales del total en el mundo se realizan principalmente por 16 países: Bangladés, Brasil, Camboya, China, Egipto, Rusia, Filipinas, India, Indonesia, Birmania, Nigeria, República Democrática del Congo, República Unida de Tanzania, Tailandia, Uganda, Vietnam, que sobrepasan las 200 000 toneladas (FAO, 2016).

De igual modo, el consumo de pescado ha aumentado anualmente a nivel mundial, siendo mayor al crecimiento poblacional y sobrepasando el consumo de carne de otras especies como bovinos, porcinos, ovinos, entre otras, excluyendo las aves de corral (FAO, 2018). Este aumento del consumo se debe a una mezcla de circunstancias, no solo al crecimiento de la producción, sino a la disminución de los desperdicios, un mejor uso, mejora en los canales de distribución, incremento en el desarrollo demográfico, el alza de los salarios y la edificación (FAO, 2018).

1.2 La acuicultura como seguridad alimentaria en Colombia

La nación es la encargada de cuidar los bienes pesqueros, ya que son bienes públicos. Colombia es un país sobresaliente en la hidrografía del planeta por tener una de las más altas diversidades de especies de peces con un valor comercial elevado, sin embargo,

posee una cifra baja de individuos por especies, la pesca de agua dulce se encuentra afectada por contaminación del hábitat y la excesiva pesca (Esquivel *et al.*, 2014).

A pesar de que la producción acuícola ha aumentado de manera rápida en el último decenio, en Colombia la acuicultura no registra participación importante y no es significativa en cuanto a la obtención de riqueza y a las necesidades alimenticias de los pobladores con pobreza tanto de las comunidades urbanas como rurales. En el año 2006 la producción acuícola fue de 71 168 toneladas y para el 2011 logró 82 733 toneladas (Merino *et al.*, 2014); en el Producto Interno Bruto (PBI) la participación de la pesca y la acuicultura señalan un comportamiento decreciente, en el año 2009 contribuyó con el 0,18 % del PIB total y en el PIB agropecuario con 2,66 %, en el año 2018 aportó en el crecimiento económico nacional con 0,17 % del PIB total y en el sectorial, con 2,68 % (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019); además esta producción en la parte continental es objeto de sobreexplotación y varios problemas ambientales, donde se destaca el mal manejo de las cuencas hidrográficas (Lasso *et al.*, 2011).

Sin embargo, la acuicultura de agua dulce es una fuente importante para la pesca de subsistencia y está a la vez lo referente con la seguridad alimentaria de las comunidades aledañas a ríos, igualmente contribuye al fomento para el desarrollo de la actividad de pesca para empresas medianas y pequeñas, recreación y pesca deportiva (Lasso *et al.*, 2011).

Para las comunidades ribereñas la pesca artesanal es una actividad cultural, social y económica, que no cuenta con estímulos y reconocimientos, pero es una labor importante para la soberanía alimentaria; los pescadores artesanales provienen de diferentes poblaciones como son las comunidades indígenas, negras o campesinas y con dificultades dadas por los desplazamientos forzados, igualmente este sector en Colombia ha sido poco estudiado, por tanto, no se cuenta con registros provenientes de pesca artesanal, además es una labor que no tiene reconocimientos y estímulos (Moreno, 2018).

Con todo, Colombia por ser un país tropical presenta altas probabilidades de tener un mayor crecimiento en la producción acuícola legalizada, ya que cuenta con características propias tales como: abundancia hídrica marina y continental, variabilidad de especies de peces y de biodiversidad en general, diversidad de pisos térmicos y condiciones climáticas

- 8 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas
-

que permanecen por periodos largos anuales, reservas naturales y forestales, resguardos indígenas, parques naturales y lugares con topografía difícil, proyectándose como un factor activo del aumento en la economía, que produce empleo, riqueza y mejores indicadores en seguridad alimentaria (Merino *et al.*, 2014).

Previas las consideraciones que atañen a la importancia de los estudios referidos a los peces, a continuación, se refiere lo relacionado a la especie estudiada:

1.3 Género *Brycon*

Este género hace parte de la subfamilia *Bryconinae*, son peces neotropicales importantes en las aguas continentales (Lima, 2003). En el año 2006, según Zaniboni, Reynalte-Tataje, y Weingartner, había más de 40 especies válidas, varias con características zootécnicas para producción, en el año 2017 Lima reportó que el género *Brycon* se le asignan más de 70 especies nominales y se identificaron 44 especies válidas, este género se encuentra distribuido geográficamente en México, Panamá, Perú, Venezuela, Ecuador, Guyana, Brasil y Colombia, en este las especies más representativas son *Brycon amazonicus*, *Brycon polylepis*, *Brycon whitei*, *Brycon melanopterus*, *Brycon hilarii* y *Brycon falcatus*.

En Colombia el género *Brycon* es diverso, se reportan 13 especies incluidas ocho endémicas: *Brycon whitei*, *Brycon falcatus*, *Brycon oligolepis*, *Brycon henni*, *Brycon labiatus*, *Brycon medemi*, *Brycon meeki*, *Brycon moorei*, *Brycon sinuensis*, *Brycon posadae*, *Brycon rubricauda*, *Brycon fowleri* y *Brycon amazonicus*

Maldonado-Ocampo *et al.*, 2005, presentaron una guía de campo de los *Peces de los Andes colombianos*, en el caso del género *Brycon* las especies *Brycon fowleri*, *Brycon henni*, *Brycon medemi*, *Brycon moorei*, *Brycon oligolepis* y *Brycon rubricauda* son las que habitan los ríos de la región Andina en Colombia (Lima, 2003).

Es un género donde las especies se caracterizan por ser aptas para la producción piscícola y recursos pesqueros, además, son omnívoras diseminadoras de semillas en los bosques aledaños, indicadoras de la calidad ambiental, por ubicarse en los ríos con agua oxigenada y limpia, la talla puede oscilar entre mediano a grande (entre 16 cm a 70 cm), se desplazan fácilmente (Arruda *et al.*, 2019).

Las especies de *Brycon* son de gran importancia en la pesca comercial y deportiva por su ubicación geográfica, a causa de su riqueza en los ecosistemas riparios, tal como su apetecida carne (Mateus *et al.*, 2004). Son especies susceptibles al impacto humano sobre el medio donde habita, estas pueden ser por construcción de represas, contaminación del agua o perturbaciones en los ecosistemas ribereños (Rosa y Lima, 2008).

1.4 Aspectos generales de la especie *Brycon henni*

1.4.1 Clasificación taxonómica

Brycon henni es una especie endémica de Colombia, se clasifica taxonómicamente (tabla 1-1.) así:

Tabla 0-1: Clasificación taxonómica de *Brycon henni* (Abe *et al.*, 2014).

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Characiformes
Familia	<i>Bryconidae</i>
Género	<i>Brycon</i>
Especie	<i>Brycon henni</i>
Autor	Eigenmann, 1913

1.4.2 Morfología de la especie *Brycon henni*

Figura 0-1: Sabaleta.



Fuente: (Domínguez, 2015).

- 10 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas
-

La sabaleta, como es conocida comúnmente, se caracteriza principalmente porque es plateada en los costados con una mancha opercular y caudal, tiene forma cilíndrica y presenta una coloración verdosa en el dorso, también puede ostentar manchas rojizas en la parte de arriba del ojo y en las aletas, la aleta adiposa tiene dos presentaciones de colores verdosa o naranjada (Montoya *et al.*, 2006).

1.4.3 Nombres comunes

Sabaleta, sardina, toá, ojicolorada (Maldonado-Ocampo *et al.*, 2005).

1.4.4 Biología y ecología de la especie *B. henni*

Habita en aguas con un rango de temperatura entre 18 a 28° C, las cuales son transparentes y limpias (Arboleda *et al.*, 2005), el agua donde se encuentra la especie presenta un rango entre 6 y 10 mg/L de concentraciones de oxígeno disuelto (Lenis *et al.*, 2009). Es un nadador hábil, en los ríos selecciona las regiones que tienen vegetación, corrientes fuertes, cuevas socavadas por agua; es una especie omnívora oportunista por consumir alimentos del exterior del cauce como del fondo del río (Botero-Botero y Ramírez-Castro, 2011); se alimenta en sitios turbulentos donde el río arrastra materiales, su comida se basa principalmente en: flores, frutos, insectos, hojas y ocasionalmente peces pequeños (Maldonado-Ocampo *et al.*, 2005).

La especie es usada además como un bioindicador relacionado con la calidad de las aguas corrientes, la ausencia o disminución de esta especie reofílica en sus áreas podría dar cuenta de la fragmentación de las corrientes por la construcción, operación de represas o de presencia de contaminantes, pese a que la especie tiene potencial para la acuicultura industrial, presenta dificultades para la obtención de cantidades comerciales de huevos viables y la predicción del tiempo de latencia es compleja, una vez los huevos por tratamiento hormonal son expulsados hacia la cavidad ovárica del pez, para proceder con la inseminación artificial. Persisten, por tanto, incertidumbres para que las hembras respondan positivamente al tratamiento hormonal y parcialmente a la ovulación, lo cual hace prácticamente imposible la obtención de los huevos por extrusión simple (Lenis *et al.*, 2009a).

1.4.5 Distribución

La especie *B. henni* tiene una distribución extensa según (figura 1-2) Maldonado-Ocampo *et al.*, 2005:

Se ubica en el bajo y alto Cauca, algunos afluentes del río San Jorge, alto río Uré, ríos Patia, Dagua, Anchicayá, Calima, Dígua. **Cauca:** ríos Hondo, Palacé, Cofre, Bermejil, Ovejas, Mondomo, Mandivá, Quinamayó, Quilichao y La Quebrada en la vía Cali-Popayán; río Palo en Guachené y Paila en Corinto; río Timba en Timba; río Desbaratado en Miranda. **Quindío:** quebrada la española sistema río Roble, río Santo Domingo, río Verde en Calarcá; quebrada Cristales sistema río La Vieja, municipio La Tebaida; quebrada Macho sistema del río Barragán, municipio Pijao; quebrada La Carmelita sistema río Roble, río La Vieja, río Barbas cerca al puente que limita los departamentos de Valle, Quindío y Risaralda, municipio de Filandia. **Risaralda:** río San Rafael, río Mapa. **Valle del Cauca:** río Jamundí en la vía Cali-Jamundí; río Guadalajara en Buga; río Mediacanoa en la vía Panorama entre Cali-Buga; río Tulúa en Tulúa; río Bugalagrande en Bugalagrande; río Amaime en Amaime; río Frío en la vía Panorama; ríos Frío, Chanco y Catarina en Ansermanuevo; río Pijao en la vía Sevilla-Armenia; quebrada San Pablo, cuenca del río La Paila en el corregimiento de La Paila; río San Miguel.

12 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

Figura 0-2: Distribución geográfica de *B. henni*.



En el mapa de Colombia se muestra por medio de puntos la distribución de la especie *B. henni* (Montoya *et al.*, 2006).

1.4.6 Reproducción

B. henni tiene dos épocas reproductivas en el año, la talla mínima de madurez reportada por Montoya *et al.* (2006) fue de 10,4 cm de longitud total, mientras que Mancera-Rodríguez (2017) reportó que fue de 8,27 cm en machos y en hembras de 11,97 cm.

La especie presenta dimorfismo sexual, las hembras en fase de reproducción exhiben espinas pequeñas en los radios de la aleta anal, por el contrario, los machos adultos siempre las tienen (Montoya- López *et al.*, 2006; Lenis-Sucerquia, Cruz y David, 2015); otra diferencia en los sexos es que en los machos adultos al realizarles masaje en la zona abdominal les brota gotas de esperma denso, en cambio en las hembras la papila genital es prominente, vascularizada y presenta color rojo intenso (Martínez-Orozco y Vásquez-Zapata, 2001).

Con el propósito de contribuir sobre el conocimiento de la producción en cautiverio de la sabaleta existen varios estudios con respecto a su reproducción, por ejemplo, Tabares *et al.*, 2006, determinaron que la viabilidad y volumen del semen disminuyó de acuerdo al aumento de las lluvias, sin embargo, el brillo solar tuvo efecto positivo con relación a la concentración y al volumen del esperma. Restrepo-Betancur., *et al.*, 2017 concluyeron que

la calidad espermática es mejor cuando al descongelar el semen se emplea la curva de congelación programable de velocidad media y como crioprotector a etilenglicol. Montoya *et al.*, 2018, argumentan que el avance de la maduración de las ovas en la especie *B. henni* se estimuló utilizando de las mezclas hormonales sGnRHa y EPC en la maduración in vitro.

1.4.7 Conservación

La especie *Brycon henni* podría estar en peligro de extinción, debido a la elaboración de represas que se interponen en su migración, contaminación del agua, la deforestación de bosques y a la sobrepesca, por estos motivos el Gobierno Nacional procura salvar y recuperar las regiones de pesca, por medio del repoblamiento de peces para disminuir la erosión dulceacuícola endémica, sin embargo al gran número de amenazas todavía no aparece en el *Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia* en ninguna de las clases de riesgo, igualmente se están desarrollando investigaciones sobre el manejo en cautiverio de *B. henni*, aspectos biológicos y descripción anatómicas e histológicas de las gónadas que ayudará en el desarrollo de tecnologías de reproducción artificial para la conservación (CVC- Funagua (ed.), 2011).

Cuando se limita el flujo genético dentro de las poblaciones de especies de peces en Colombia es por la ocurrencia en la afectación del hábitat, la sobreexplotación, la segmentación del ecosistema y la incorporación de especies exóticas (Mancera *et al.*, 2013).

Debido a que *Brycon henni* es susceptible a las modificaciones en los factores químicos y físicos del agua, se puede producir descenso en la cantidad de especímenes en sus poblaciones, además la sobrepesca ocasionaría una pérdida de la variabilidad genética (Hurtado-Alarcón *et al.*, 2011). En un reciente estudio en donde existe un flujo genético limitado dentro de las poblaciones de sabaletas, Muñoz-A. *et al.*, 2019 concluyeron que se puede experimentar consecuencias desfavorables con respecto a su conservación, en los resultados se observó que las poblaciones pueden alcanzar una baja densidad, esto pone en peligro la conservación de la especie.

1.5 Diversidad genética

En lo referido a estudios previos, se ha reportado una alta variabilidad genética en la especie sabaleta, por Hurtado-Alarcón *et al.*, 2011, donde se obtuvo como resultado de

14 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

análisis molecular con marcadores de Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA-RAPD) un 62,55 % de fragmentos polimórficos, también se presentó estructuración genética en el análisis de Varianza Molecular (Amova) en donde el F estadístico arrojó resultados en un nivel muy alto o medio-alto; asimismo, Pineda Santis *et al.*, en 2007, encontraron un número menor de fragmentos únicos en la especie *Brycon henni* que en dos especies, *Brycon moorei* y *Colossoma macropomum* que se usaron como control interespecífico, concluyendo que hay alta diversidad genética en la especie *B. henni* con respecto a los dos grupos control. En el estudio de Vélez y Velandia, 2014, también se realizó la caracterización molecular de la especie *B. henni* con la técnica Microsatélites Amplificados al azar, concluyeron que a un nivel de similaridad de 65 % se formaron dos grupos, que señalan las poblaciones que se diferencian (Reserva Natural Bosque de Yotoco y río Sonso). Igualmente, Muñoz-A. *et al.*, 2019, utilizando marcadores microsatélites mostraron que las poblaciones de *Brycon henni* estudiadas en Risaralda, Campoalegre, Riofrío y Chinchiná presentaron un nivel moderado de variación genética, probablemente por el distanciamiento geográfico entre ellas. De igual modo, Landínez-García y Márquez, 2020, usando loci de microsatelites polimórficos específicos para la especie *Brycon henni* revelaron que existe diversidad genética y se encuentran genéticamente estructurados entre dos afluentes del río Cauca (río Ituango y río Espíritu Santo), apartados por 30 km, un resultado que indica que puede existir aislamiento reproductivo entre dichos grupos.

Estudios en el área de molecular han evidenciado tener eficiencia para solucionar incógnitas taxonómicas en grupos sin identificar, explicando la historia evolutiva de las especies y fortaleciendo la ecología y biodiversidad como ciencias complementarias (Lanteri, 2007). No obstante, los diagnósticos moleculares convencionales no están estandarizados por lo que se necesita de más tiempo e inversión para llevar a cabo los análisis (Hebert *et al.*, 2003).

Indudablemente, la idea de emplear secuencias genéticas para la caracterización rápida de especies no es reciente (Moritz y Cicero, 2004), lo que es novedoso de la técnica de Código de Barras de ADN es que plantea utilizar información dentro de un mismo gen, en todos los taxones, con metodologías de secuenciación estandarizadas, eficientes y relativamente económicas (Lanteri, 2007).

1.6 Código de Barras de ADN

El DNA Barcoding (en español, Código de Barras de ADN) es una metodología de identificación de especies que usa un banco de datos de secuencia de nucleótidos estandarizados (Hebert *et al.*, 2003), se fundamenta en el empleo de un segmento de ADN, que se utiliza para la determinación rápida de organismos, con el objetivo de obtener un modelo de determinación efectivo en cuanto a la información, al uso razonable de la diversidad biológica y la conservación (Paz *et al.*, 2011). Con la finalidad de que los genes se consideren como código de barras de ADN es necesario que estos permitan diferenciar entre la variabilidad intraespecífica e interespecífica (Meyer y Paulay, 2005).

Para la identificación de las especies mediante código de barras de ADN hay varias alternativas de metodologías cuando existe un banco de datos (Goldstein y DeSalle, 2011). La primera metodología es una identificación por medio de distancias genéticas, establecidas por los sitios de nucleótidos variables entre la información genética desconocida y la información que se encuentra en el banco de datos de referencia (Kimura, 1980). La segunda metodología para la identificación es a través de árboles filogenéticos, fundamentado en la proximidad evolutiva con otras secuencias de esa agrupación monofilética (Elias *et al.*, 2007) y el objetivo de la tercera metodología es identificar uno o varios caracteres moleculares nuevos que se encuentran en diferentes individuos (Rach *et al.*, 2008).

Una limitante para la utilización de los códigos de barras de ADN con cualquier región es tener disponible un banco de datos de referencia completa (Paz *et al.*, 2011).

Debido a los efectos del cambio climático global y en aras de la conservación de la variabilidad de los seres vivos por el rápido deterioro del entorno, es necesario emplear métodos útiles para la identificación de las especies, por ello los códigos de barras de ADN son una herramienta fundamental para la determinación de especies, sin que sea requerida experiencia previa en clasificación taxonómica para obtener resultados objetivos; el código de barras para cada individuo es único en las secuencias de ADN, del mismo modo tiene un millar de copias en cada célula y su área es corta, de aproximadamente 700 nucleótidos de extensión (Center, 2014).

Los peces dulceacuícolas en el neotrópico están representados por los órdenes Perciformes, Characiformes y Siluriformes, recientes estudios moleculares dan cuenta de

16 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

la variabilidad en peces neotropicales, ello implica una alta complejidad para la identificación de la fauna presente en estos territorios. Los códigos de barras son importantes para identificar y reafirmar la variabilidad de fauna, asimismo se tienen en cuenta los análisis morfológicos y taxonómicos (Pereira *et al.*, 2013).

Los códigos de barras de ADN emplean marcadores moleculares como etiquetas específicas de la especie, utilizando bases cortas para identificar especies, dicha herramienta brinda datos automatizados y precisos. Por medio de la región mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI) se realiza identificación a nivel de especie, estos suministran nuevas perspectivas tanto en la sistemática como en la ecología de los peces; los códigos de barras ofrecen beneficios con respecto a las características fenotípicas, toda vez que estas no son suficientes e idóneas para la identificación de peces, ya que estas especies conforman un grupo muy variable de vertebrados que presentan cambios morfológicos a lo largo del desarrollo. En esta técnica no se tiene en cuenta la etapa en que se encuentra el espécimen, el resultado de la secuencia principal se encuentra en una base de datos y se registra toda la información necesaria del individuo (Hubert *et al.*, 2008).

1.7 ADN mitocondrial

Para la identificación de especies de peces se han utilizado regiones mitocondriales, en varias investigaciones de códigos de barras de ADN (Arias *et al.*, 2003); como por ejemplo, Identificación de peces de agua dulce canadienses a través de códigos de barras de ADN (Hubert *et al.*, 2008). Sistema de identificación molecular basado en códigos de barras de ADN para especies de peces (Kim *et al.*, 2010). Relaciones filogenéticas dentro de la familia de especies Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) basadas en análisis multilocus y muestreo de endogrupos extensivo (Oliveira *et al.*, 2011). Estudio de la efectividad de los códigos de barras de ADN para la discriminación de la fauna de peces de agua dulce neotropicales megadiversos (Pereira *et al.*, 2013). El código de barras de ADN revela altos niveles de divergencia entre los linajes mitocondriales de *Brycon* (Characiformes, Bryconidae) (Arruda *et al.*, 2019). La reidentificación de *Decapterus macarellus* y *D. macrosoma* (Carangidae) revela inconsistencias con la taxonomía morfológica actual en China (Zang *et al.*, 2020). Los códigos de barras de ADN revelan una diversidad críptica en el género subestimado *Triplophysa* (Cypriniformes: Cobitidae, Nemacheilinae) del noreste de la meseta de Qinghai-Tibet (Wang *et al.*, 2020). Hacia la

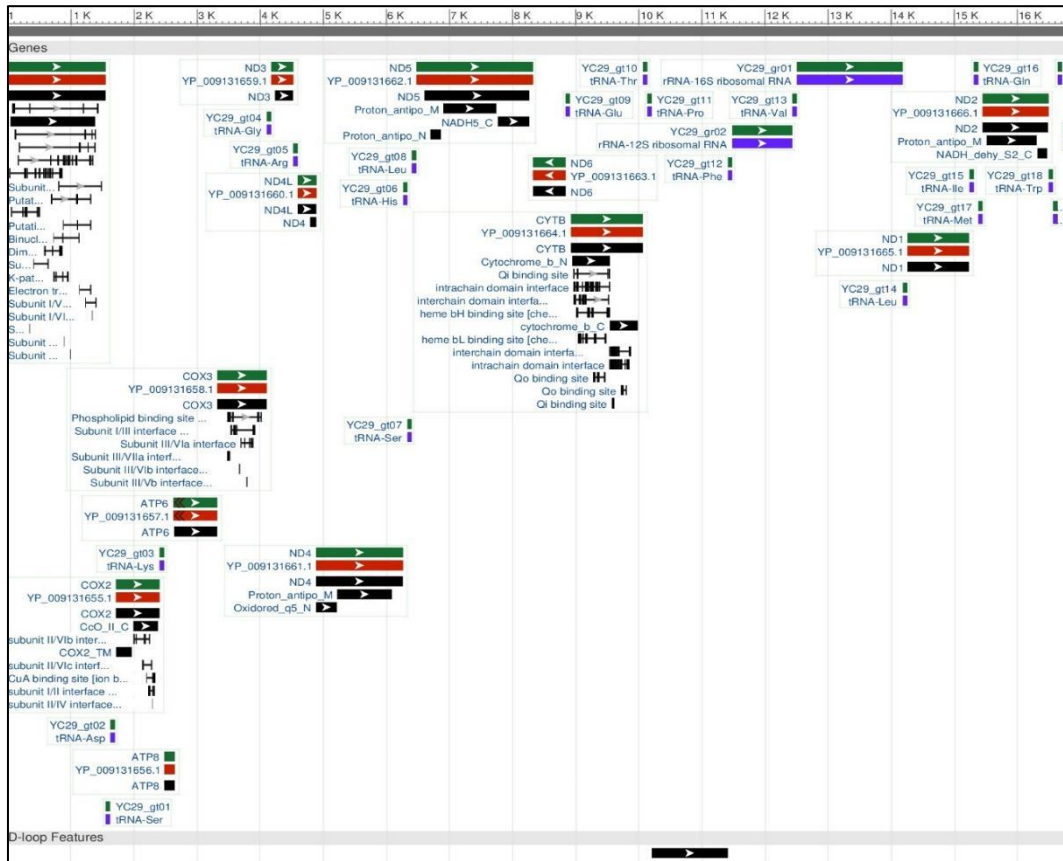
recuperación del tesoro prometeico: una primera evaluación molecular de la diversidad de peces de agua dulce de Georgia (Epitashvili *et al.*, 2020).

Los marcadores mitocondriales tienen condiciones como: a) tasa de mutación rápida, lo convierten en una técnica para estimar la historia evolutiva y la relación filogenética; b) el ADN mitocondrial es pequeño en un rango entre 15 a 20 kb; c) con esta región se accede a explorar las contribuciones maternas ya que es una región heredada maternalmente, sin embargo, se hace incorrecto para algunas investigaciones genéticas por herencia materna, no mendeliana (Wong, 2011); d) tiene 37 genes que se dividen en 2 ribosomales, 13 genes codificadores de proteína y 22 de ARN de transferencia, estos pocos genes que codifica para el 5 % de los productos necesarios para el funcionamiento de la mitocondria; e) es considerado un genoma compacto, porque extrañamente tiene secuencias espaciadoras, secuencias repetitivas, pseudogenes e intrones; f) el genoma es muy conservado, al igual que el orden de los genes (Arias *et al.*, 2003).

Por otro lado, en la investigación de Landínez-García, Alzate y Márquez, 2014, realizaron la secuenciación del ADN mitocondrial de la especie *B. henni* en la plataforma illumina Miseq, obtuvieron una longitud de 16 885 pares de bases, el genoma mitocondrial se encuentra registrado en el GenBank con número de acceso KP027535.

18 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

Figura 0-3: Posición de los genes mitocondriales en la secuencia de *B. henni*.



Se muestran las diferentes regiones mitocondriales en una secuencia completa de la especie *Brycon henni* (Landínez-García *et al.*, 2014).

1.7.1 Citocromo c oxidasa I

Citocromo C oxidasa es una enzima importante en la respiración celular, donde se cataliza el transporte de electrones entre el oxígeno y el citocromo c; además de esta reacción de óxido-reducción importante, esta enzima tiene como objetivo la conservación energética de la reacción de óxido-reducción liberada para usarla en la síntesis de ATP en el tercer lugar llamado fosforilación oxidativa. La función de la reacción de óxido-reducción de la Citocromo C oxidasa es la translocación de iones hidrógeno por medio de la membrana mitocondrial en la parte interna (Wikstrom, 1977).

El gen Citocromo Oxidasa I (COI) está en bacterias y en los eucariotas en la mitocondria, frecuentemente se usa como código de barras de ADN o marcador molecular, tiene un fragmento entre 600 a 700 pares de bases, es un método para la identificación de especies

principalmente animales porque presenta una tasa de sustitución alta, teniendo variación de la secuencia entre especies de un mismo género (Hebert *et al.*, 2003), dicho marcador es de fácil uso, preciso y confiable para el análisis, además es importante para estudiar la evolución, la biodiversidad y la ecología de las especies (Kim *et al.*, 2010). Por ser corto, la secuenciación es económica y rápida (Ratnasingham y Hebert, 2007).

Se han desarrollado varias investigaciones en peces, entre ellos, en el género *Brycon* se utilizó el marcador COI para observar los linajes mitocondriales (Arruda *et al.*, 2019), también para estimar las relaciones filogenéticas entre especies del género *Brycon* en cuencas hidrográficas de Brasil (Antunes *et al.*, 2010). Investigaciones que a través del Código de barras de AND se identifique peces canadienses de agua dulce (Huber *et al.*, 2008). Igualmente, se plantea este marcador para establecer una base de datos de referencia de códigos de barras de peces en el Estrecho de Taiwán (Bingpeng *et al.*, 2018).

1.7.2 16 S rRNA

El gen 16S rRNA es altamente conservado, permite establecer la relación entre individuos y la distancia evolutiva (Clarridge, 2004); con esta subunidad mitocondrial se han realizado investigaciones en relaciones filogenéticas, así como también entre taxones muy relacionados (Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004).

Utilizando este marcador mitocondrial han realizado investigaciones tales como la de Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004 que estimaron la filogenia molecular de la familia del bagre blindado Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). Pardo *et al.*, 2005 realizaron análisis filogenético de peces planos del Orden Pleuronectiformes. Rahman *et al.*, 2018 describieron la identidad de *Osteobrama cotio* y el estado de *Osteobrama serrata* (Teleostei: Cyprinidae: Cyprininae). Chowdhury *et al.*, 2019 llevaron a cabo la identificación molecular y la evaluación filogenética de especies del género *Parapenaeopsis* Alcock, 1901, de aguas de la India. Gangan *et al.*, 2020 reportaron una nueva especie de *Stolephorus* (Clupeiformes: Engraulidae) de la Bahía de Bengala, India.

16S es el último cronómetro molecular, por presentar una longitud corta (aproximadamente 1500 nucleótidos) la secuenciación es sencilla, puede realizarse en todas las especies, tiene una funcionalidad constante, su estructura es de mosaico con regiones más variables y conservadas (Coenye y Vandamme, 2003), ha sido un gen con el que se ha trabajado por la eficiencia que ha presentado, en la determinación de las relaciones evolutivas de los

linajes de divergencia similar y también porque al amplificar genes con cebadores universales la obtención de información es fácil (Pardo *et al.*, 2005).

Usando el gen 16S se obtiene un árbol filogenético donde la longitud de la rama es equivalente a los cambios ocurridos, además, se puede observar la similitud entre los individuos, la comparación entre dos grupos con origen evolutivo en la misma rama y se determinan los cambios sufridos a partir de la separación (J. A. Oliveira *et al.*, 2013).

1.8 ADN nuclear

Las secuencias de exones e intrones originan proteínas nucleares, las primeras tienen secuencias fijas codificantes, pertenece al RNA maduro; en cambio las segundas no son codificantes, se descartan en el pre-mRNA para que en la transcripción logre cambiar a mRNA maduro (Russell, 2010).

Trabajar con ADN nuclear en investigaciones de población genética y evolutiva es importante para una óptima asimilación del desarrollo evolutivos que ha sucedido, y extender las destrezas para concluir el pasado más allá de lo permitido por otros marcadores de ADN más populares (D. X. Zhang y Hewitt, 2003).

Por ser diploide y biparental, el ADN nuclear es cuatro veces más polimórfico que el ADN mitocondrial y cloroplástico, porque estos solo se heredan de manera materna (Hare, 2001).

Para el análisis de marcadores nucleares se está trabajando en las siguientes problemáticas: primera, dificultad técnica de laboratorio para obtener información de haplotipos; segunda, inconvenientes en el análisis de la información por causa de la recombinación; tercera, bajo grado de divergencia y evolución entre individuos de la misma especie de multifurcación, y cuarta, el beneficio de las secuencias polimórficas nucleares de copia única para tratar temas de genética de poblaciones. En cuanto a las secuencias polimórficas nucleares de copia única ya no se tienen incertidumbres sobre la disponibilidad, gracias a los diferentes proyectos de secuenciación del genoma e investigaciones en organismos modelos, asimismo, se tiene acceso a varios protocolos

para obtener marcadores moleculares de organismos que no son modelos (D. X. Zhang y Hewitt, 2003).

1.8.1 Gen de activación de recombinación uno (RAG1)

Se ha propuesto que las proteínas RAG se originan a partir de un elemento transponible (TE), ya que comparten similitudes mecánicas y estructurales con varias familias de transposasas y son ellas capaces de mediar en la transposición. Un número de proteínas tipo RAG y TE con similitud de secuencia con *RAG1* y *RAG2* han sido identificados, pero recientemente su función comenzó a caracterizarse, revelando enlaces mecánicos a los RAG vertebrados (Carmona y Schatz, 2017).

Los genes del receptor de antígeno que producen el receptor de las Células T, el receptor de las células B y las inmunoglobulinas secretadas están constituidas por grupos de fragmentos de genes. La unión de estos fragmentos génicos en una diversidad de mezclas genera una fuente de diversidad para las zonas de reconocimiento de antígenos de estas proteínas y es básico para la inmunidad adaptativa en especies que son vertebrados, con mandíbula. La recombinación V (D) J es el desarrollo a través del cual los fragmentos génicos se unen y las proteínas del gen activador de la recombinación (RAG) 1 y 2 intervienen en las sustituciones bicatenarias del ADN específico de zonas importantes para el proceso (Carmona y Schatz, 2017).

Este gen es considerado como código de barras de ADN porque tiene regiones conservadas y no muestra saturación, razón por la que es un marcador filogenético de un nivel alto de calidad (Chiari *et al.*, 2009).

Springer *et al.*, 2001 no recomiendan la utilización de un solo marcador molecular (fundamentalmente si es mitocondrial), para las reconstrucciones filogenéticas, ya que no se puede evidenciar un “árbol verdadero” por la clasificación incompleta de linaje y la duplicación de genes

Entre los estudios que han empleado este gen se encuentran Sullivan, Lundberg y Hardman (2006) realizaron un análisis filogenético de los principales grupos de bagres (Teleostei: Siluriformes) utilizando secuencias de genes nucleares *rag1* y *rag2*. Bufalino y Mayden, 2010 evaluaron la filogenética molecular de *phoxinins* norteamericanas (Actinopterygii: Cypriniformes: Leuciscidae) basada en datos de secuencia de ADN nuclear

- 22 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas
-

RAG1 y S7. Oliveira *et al.*, 2011 estimaron las relaciones filogenéticas dentro de la familia de especies Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) basadas en análisis multilocus y muestreo de endogrupos extensivo. Cramer, Bonatt y Reis, 2011, donde analizaron la filogenia molecular de Neoplecostominae e Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) usando múltiples genes. Chen *et al.*, 2019 exploraron la diversidad taxonómica y la biogeografía de la familia Nemacheilinae (Cypriniformes). Mat Jaafar *et al.*, 2020 examinaron la estructura comparativa del stock genético en tres especies de Carangidae indo-malayo explotadas comercialmente (Teleostei, Perciformes).

1.9 Morfometría

Se deriva de los vocablos griegos “*morphé*” que significa forma o figura, y “*metría*”, cuyo concepto es “métrica” o “medición”, por lo anterior, se infiere que es un análisis cualitativo y/o cuantitativo de la forma y el tamaño de organismos. En el transcurso del tiempo la morfometría desde una perspectiva funcional y evolutiva se ha centrado en un análisis solamente teórico y descriptivo (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018).

Asimismo, se define como una herramienta para la investigación de la forma de estructuras biológicas. Anteriormente esta metodología utilizaba el análisis de ángulos o distancias por medio de dispositivos como el goniómetro y el pie de rey (morfometría tradicional), actualmente con la tecnología avanzada ha dado un cambio en el enfoque de esta área en el plano cartesiano, utilizando las coordenadas de los puntos anatómicos para establecer medidas tradicionales (morfometría geométrica) (Slice, 2001).

En la morfometría tradicional afectan varios factores en las mediciones, influyendo en el análisis de la forma del individuo, en cambio la ventaja de la morfometría geométrica es que solo considera la forma del individuo (Galan, 2016), obteniendo una estimación cuantitativa de las variaciones morfológicas y una estimación cualitativa por medio del restablecimiento de la forma en análisis (Toro *et al.*, 2010).

En ambas metodologías se utilizan análisis multivariados, sin embargo, en la morfometría geométrica los resultados se muestran como variaciones de la forma empleando placas de deformación, esto hace que las explicaciones sean más fáciles que los resultados en la

morfometría tradicional, dichos resultados solo se presentan como graficas de dispersión, coeficientes, matrices y tablas (Galan, 2016).

1.10 Morfometría geométrica

La morfometría geométrica comenzó a finales de la década de los 80, como un área de la morfometría tradicional, que se fundamentaba en evaluaciones lineales empleando calibradores. Esta metodología investiga los cambios, valiéndose del análisis de los movimientos en el plano de un grupo de puntos designados como hitos, puntos o marcas (Van der Molen *et al.*, 2007). Estas evaluaciones se realizan gracias a la utilización de instrumentos, programas informáticos y métodos biométricos que permiten reflejar y estudiar la información en forma de matrices de coordenadas morfométricas que representan la geometría de un individuo (Toro *et al.*, 2010).

En la taxonomía, la morfometría geométrica es una disciplina que estima diferencias entre especies por medio de la estadística multivariante (García-Alzate *et al.*, 2010), adicionalmente, la diferencia entre forma y talla permite correlacionar especies a través de sus estructuras equivalentes, estimar la variación de la estructura en diversas escalas del espacio e investigar las probables comparaciones entre la diversidad y otros indicadores tanto ambientales como morfológicos (Ruiz y Cipriano, 2006).

El análisis en la morfometría geométrica se da en tres fases principales: extracción de la información primaria, extracción de las variables de la forma y análisis estadísticos (Toro *et al.*, 2010).

Algunos estudios con aplicaciones en morfometría geométrica como la radiación adaptativa en peces africanos débilmente eléctricos (Teleostei: Mormyridae: *Campylomormyrus*): un enfoque combinado molecular y morfológico (Feulner *et al.*, 2007). La variación morfológica entre poblaciones de *Hemigrammus coeruleus* (Characiformes: Characidae) en un afluente del río Negro, Amazonia brasileña (Lazzarotto *et al.*, 2017). La evaluación intraespecífica en la morfología de *Glossogobius guiris* mediante análisis morfométrico geométrico del lago Mainit, Agusan del Norte, Filipinas (Varona *et al.*, 2019). La variación geográfica en *Prionotus punctatus* (Bloch) (Teleostei, Scorpaeniformes,

Triglidae): un análisis morfométrico geométrico (Cavalcanti y Duarte, 2019). Los efectos de la especie invasora *Poecilia gillii* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) sobre *Pseudopoecilia fría* en ríos costeros de la región del Chocó, Ecuador (Jiménez-Prado *et al.*, 2020).

1.11 Hitos

Se conocen con puntos homólogos debido a que se ubican en el mismo punto anatómico en todos los especímenes de la investigación. Se emplean para determinar la forma en la Morfometría Geométrica (Zelditch *et al.*, 2012). Por ser considerados como puntos específicos en la anatomía de un individuo se definen y determinan de manera precisa (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018).

Según Bookstein (1997), los hitos, conocidos en inglés como *landmarks*, se dividen en tres grupos:

- **Hitos de tipo I:** son puntos anatómicos específicos, ya que la ubicación es evidente y reiterativa.
- **Hitos de tipo II:** se encuentran en un punto de curva y de diferentes campos morfogenéticos, se relaciona por medio de puntos anatómicos específicos.
- **Hitos de tipo III:** también son llamados *semilandmarks*, se localizan en una curvatura o área y tienen descripciones como “el más craneal/rostral” o “el más distal/proximal”. Son de apoyo en el análisis de estructuras difíciles, sin embargo, no son de ubicación objetiva.

La información empleada en la morfometría geométrica para el análisis concierne a un conjunto de hitos relevantes de una forma. Un punto homólogo corresponde a un punto del espacio que contiene un nombre (Zelditch *et al.*, 2012), por ejemplo (Lazzarotto *et al.*, 2017) definió 11 hitos en una población de peces de la especie *Hemigrammus coeruleus*: 1- punta del hocico; 2- inserción dorsal de la aleta pectoral; 3- inserción anterior de la aleta pélvica; 4- inserción anterior de la aleta anal; 5- inserción ventral de la aleta caudal; 6- inserción dorsal de la aleta caudal; 7- inserción anterior de la aleta adiposa; 8- inserción anterior de la aleta dorsal; 9- supraoccipital; 10- punto final del opérculo; 11- punto central del ojo.

1.12 Bibliografía

- Abe, K. T., Mariguela, T. C., Avelino, G. S., Foresti, F., y Oliveira, C. (2014). Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 152. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-152>
- Aguirre, W. E., y Jiménez-Prado, P. (2018). *Guía práctica de morfometría geométrica. Aplicaciones en la ictiología*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Esmeraldas (PUCESE).
- Arboleda Chacón, L., Olivera Ángel, M., Tabares Serna, C. J., Echeverri Echeverría, A., y Serna Vélez, D. F. (2005). Maduración gonadal en hembras de sabaleta (*Brycon henni*) y su relación con variables medioambientales. *Politécnica*, 1(1), 95–103. <https://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/7>
- Arias, M. C., Francisco, F. D. O., y Silvestre, D. (2003). O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. *Apoidea Neotropica* (GAR Mello y I. Alves-Dos-Santos, Eds.) Universidade Do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 305-309.
- Arruda, P. S., Ferreira, D. C., Oliveira, C., y Venere, P. C. (2019). DNA barcoding reveals high levels of divergence among mitochondrial lineages of *Brycon* (Characiformes, bryconidae). *Genes*, 10(9), 639. <https://doi.org/10.3390/genes10090639>
- Antunes RS, Gomes VN, Prioli SM, Prioli RA, Júlio HF Jr, Prioli LM, Agostinho CS, Prioli AJ. (2010). Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. *Genet Mol Res*. 9 (2): 674-84. doi: 10.4238/vol9-2gmr759. PMID: 20449799.
- Baker, M. L., Wares, J. P., Harrison, G. A., y Miller, R. D. (2004). Relationships among the families and orders of marsupials and the major mammalian lineages based on recombination activating gene-1. *Journal of Mammalian Evolution*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1023/B:JOMM.0000029143.39776.ec>
- Bingpeng X, Heshan L, Zhilan Z, Chunguang W, Yanguo W, y Jianjun W. (2018). DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. *PLoS One*. 13 (6): e0198109. doi: 10.1371/journal.pone.0198109. PMID: 29856794; PMCID: PMC5983523.
- Bookstein, F. L. (1997). Chapter 3: Landmarks. En *Morphometric Tools for Landmark Data*

- 26 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas
-

Geometry and Biology. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.48-1788>

- Botero-Botero, A., y Ramírez-Castro, H. (2011). Ecología trófica de la sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae) en el río Portugal de Piedras, Alto Cauca, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 16(1), 2349–2355.
- Bufalino, A. P., y Mayden, R. L. (2010). Molecular phylogenetics of North American phoxinins (Actinopterygii: Cypriniformes: Leuciscidae) based on RAG1 and S7 nuclear DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(1), 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.12.017>
- Carmona, L. M., y Schatz, D. G. (2017). New insights into the evolutionary origins of the recombination-activating gene proteins and V(D)J recombination. *The FEBS Journal*, 284(11), 1590–1605. <https://doi.org/10.1111/febs.13990>
- Cavalcanti, M. J., y Duarte, P. R. (2019). Geographic variation in *Prionotus punctatus* (Bloch) (Teleostei, Scorpaeniformes, Triglidae): a geometric morphometric analysis. *Tropical Diversity*, 1(2), 48–56.
- Chen W, Yang J, Li Y y Li X. (2019). Exploring taxonomic diversity and biogeography of the family Nemacheilinae (Cypriniformes). *Ecol Evol*. 9 (18): 10343-10353. doi: 10.1002/ece3.5553. PMID: 31624553; PMCID: PMC6787813.
- Chiari Y, van der Meijden A, Madsen O, Vences M, Meyer A. (2009). Base composition, selection, and phylogenetic significance of indels in the recombination activating gene-1 in vertebrates. *Front Zool*. 6: 32. doi: 10.1186/1742-9994-6-32. PMID: 20015384; PMCID: PMC2803162.
- Chowdhury LM, A K, Pr D, Vs B, Shanis R, Chelath M, Pavan-Kumar A, Krishna G. (2019). Molecular identification and phylogenetic assessment of species under genus *Parapenaeopsis* Alcock, 1901, from Indian waters. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 30 (2): 191-200. doi: 10.1080/24701394.2018.1472249. Epub 2018 Jul 10. PMID: 29989478.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Coenye, T., y Vandamme, P. (2003). Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiology Letters*, 228(1), 45–49. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00717-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00717-1)
- Cramer, C. A., Bonatto, S. L., y Reis, R. E. (2011). Molecular phylogeny of the

- Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.01.002>
- CVC- FUNAGUA (ed.). (2011). Planes de manejo para la Conservación de 16 especies focales de vertebrados en el departamento del Valle del Cauca. https://ecopedia.cvc.gov.co/sites/default/files/archivosAdjuntos/pm_sp_focales_fauna_2010.pdf
- De Luna, E. (2020). Integrando análisis morfométricos y filogenéticos: de la sistemática fenética a la morfometría filogenética. *Acta Botánica Mexicana*, 127(e1640), 1–50. <https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1640>
- De Oliveira Sartori, A. G., y Amancio, R. D. (2012). Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 19(2), 83–93. <https://doi.org/10.20396/san.v19i2.8634613>
- DNA Learning Center, C. S. H. L. (2014). Using DNA Barcodes to Identify and Classify Living Things. <https://dnabarcoding101.org/files/using-dna-barcodes.pdf>
- DoNacimiento, C., Herrera Collazos, E. E., y Maldonado-Ocampo, J. A. (2018). Lista de especies de peces de agua dulce de Colombia / Checklist of the freshwater fishes of Colombia. v2.10. Asociación Colombiana de Ictiólogos. Dataset/Checklist. <https://doi.org/10.15472/NUMRSO>
- Elias Marianne, Hill Ryan I, Willmott Keith R, Dasmahapatra Kanchon K, Brower Andrew V.Z, Mallet James y Jiggins Chris D (2007). Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proc. R. Soc. B.* 274: 2881–2889 <http://doi.org/10.1098/rspb.2007.1035>
- Epitashvili G, Geiger M, Astrin JJ, Herder F, Japoshvili B, Mumladze L. (2020). Towards retrieving the Promethean treasure: a first molecular assessment of the freshwater fish diversity of Georgia. *Biodivers Data J.* 8: e57862. doi: 10.3897/BDJ.8.e57862. PMID: 33177949; PMCID: PMC7599205.
- Esquivel, M. A., Merino, M., Restrepo, J., Narváez, A., Polo, C., Plata, J., y Puentes, V. (2014). Estado de la Pesca y la Acuicultura en Colombia. En Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP).
- FAO. (1996). *Informe de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Recuperado el 28 de octubre, 2019, de http://www.fao.org/wfs/index_es.htm
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad*

- 28 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas
-

- alimentaria y la nutrición para todos*. <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018*. Recuperado el 25 de enero, 2020, de <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/es/>
- Feulner, P. G. D., Kirschbaum, F., Mamonekene, V., Ketmaier, V., y Tiedemann, R. (2007). Adaptive radiation in African weakly electric fish (Teleostei: Mormyridae: Campylomormyrus): A combined molecular and morphological approach. *Journal of Evolutionary Biology*, 20(1), 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01181.x>
- Galan, A. L. (2016). Morfometría geométrica: el estudio de la forma y su aplicación en biología. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 19(55), 53-59.
- Gangan SS, Pavan-Kumar A, Jahageerdar S y Jaiswar AK. (2020). A new species of *Stolephorus* (Clupeiformes: Engraulidae) from the Bay of Bengal, India. *Zootaxa*. 27; 4743 (4): zootaxa.4743.4.6. doi: 10.11646/zootaxa.4743.4.6. PMID: 32230314.
- García-Alzate, C. A., Román-Valencia, C., y González, M. I. (2010). Morfogeometría de los peces del género *Hyphessobrycon* (Characiformes: Characidae), grupo *heterorhabdus*, en Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58(3), 801–811.
- Goldstein PZ, DeSalle R. (2011). Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays*. 33(2):135-47. doi: 10.1002/bies.201000036. PMID: 21184470.
- Hare, M. P. (2001). Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(12), 700–706. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02326-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02326-6)
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., y Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- HLPE (2014). *La pesca y la acuicultura sostenibles para la seguridad alimentaria y la nutrición. Un informe del Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición del Comité de Seguridad Alimentaria Mundial*. <http://www.fao.org/3/a-i3844s.pdf>
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., Burrige, M., ... Bernatchez, L. (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS One*, 3(6), e2490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002490>
- Hurtado-Alarcón, J. C., Mancera-Rodríguez, N. J., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2011). Variabilidad genética de *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en la cuenca

- media de los ríos Nare y Guatapé, sistema río Magdalena, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 59(1), 269–282. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442011000100023yscript=sci_arttext
- Jennings, S., Stentiford, G. D., Leocadio, A. M., Jeffery, K. R., Metcalfe, J. D., Katsiadaki, I., ... Verner-Jeffreys, D. W. (2016). Aquatic food security: insights into challenges and solutions from an analysis of interactions between fisheries, aquaculture, food safety, human health, fish and human welfare, economy and environment. *Fish and Fisheries*, 17(4), 893–938. <https://doi.org/10.1111/faf.12152>
- Jiménez-Prado, P. J., Vásquez, F., Rodríguez-Olarte, D., y Taphorn, D. (2020). Efectos de la especie invasora *Poecilia gillii* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) sobre *Pseudopoecilia fria* en ríos costeros de la región del Chocó, Ecuador. *Revista de Biología Tropical*, 68(1), 122–138. <https://doi.org/10.15517/rbt.v68i1.36000>
- Kim, S., Eo, H.-S., Koo, H., Choi, J.-K., y Kim, W. (2010). DNA barcode-based molecular identification system for fish species. *Molecules and Cells*, 30(6), 507–512. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0148-2>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., y Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.008>
- Landínez-García, R. M., Alzate, J. F., y Márquez, E. J. (2014). Complete mitogenome of the neotropical fish *Brycon henni*, Eigenmann 1913 (Characiformes, Bryconidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(3), 2259–2260. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.984170>
- Landínez-García, R.M. y Márquez, E.J. (2020). Population genetics of the fish *Brycon henni* (Characiformes: Bryconidae) using species-specific polymorphic microsatellite loci. *Revista de Biología Tropical*, 68(3), 847-861.
- Lanteri, A. (2007). Código de Barras de ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la entomología. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 66 (3-4): 15–25.
- Lasso, C. A., Gutiérrez, F. de P., Morales-Betancourt, M. A., Agudelo Córdoba, H., Ajiaco-Martínez, R. E., y (Editores). (2011). *II. Pesquerías Continentales de Colombia: cuencas del Magdalena-Cauca, Sinú, Canalete, Atrato, Orinoco, Amazonas y vertiente del Pacífico.* (Serie Edit).

- 30 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas
-

- http://awsassets.panda.org/downloads/pesquerias_cuencas_2.pdf
- Lazzarotto, H., Barros, T., Louvise, J., y Caramaschi, É. P. (2017). Morphological variation among populations of *Hemigrammus coeruleus* (Characiformes: Characidae) in a Negro River tributary, Brazilian Amazon. *Neotropical Ichthyology*, 15(1).
- Lenis, G. A., Restrepo, L. F., y Cruz-Casallas, P. E. (2009). Evaluación de tres protocolos de tratamiento hormonal sobre el diámetro de ovocitos de sabaleta *Brycon henni*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(2), 131–142.
- Lenis, G., Restrepo, L. F., Rivera, J. C., Monsalve, F., y Casallas, P. C. (2009a). Reproducción inducida y producción de alevinos de Sabaleta *Brycon henni*: determinación del tiempo de latencia utilizando extracto de hipófisis de carpa. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(2), 143-155.
- Lenis, G. A., Cruz, P. E., y David, C. A. (2015). Reproducción inducida de la sabaleta *Brycon henni*: revisión bibliográfica. *Revista Lasallista de Investigación*, 12(1), 211-220. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=695/69542290020>
- Lima, F. (2003). Subfamily Bryconinae. En Reis RE, Kullande SO, Ferraris CJ, eds. *Check list of the fresh water fishes of south and central America*. (Edipucrs, pp. 174–178).
- Lima, F. C. T. (2017). A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: Characidae). En *Zootaxa* (Vol. 4222). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4222.1.1>
- MacLeod, N. (2017). Morphometrics: History, development methods and prospects. *Zoological Systematics*, 42(1), 4–33. <https://doi.org/10.11865/zs.201702>
- Maldonado-Ocampo, J. A., Ortega-Lara, A., Usma, J. S., Galvis, G., Villa-Navarro, F. A., Vásquez, L., (2005). *Peces de los Andes de Colombia*. Instituto Humboldt Colombia.
- Mancera, N., Marquez, E., & Hurtado, J. (2013). Uso de citogenética y técnicas moleculares en estudios de diversidad genética en peces colombianos. En J. Zamora, A. Ortega, & C. Ortiz (Eds.), *Biología molecular aplicada a la producción animal y la conservación de especies silvestres* (pp. 237-312). Colombia: Centro de publicaciones Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín
- Mancera-Rodríguez, N. J. (2017). Biología reproductiva de *Brycon henni* (Teleostei: Bryconidae) y estrategias de conservación para los ríos Nare y Guatapé, cuenca del río Magdalena, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 65(3), 1105-1119.
- Martínez-Orozco, H. J., y Vásquez-Zapata, G. L. (2001). Aspectos reproductivos de la sabaleta *Brycon henni* (Piscis: Characidae) en el embalse de la salvajina, Colombia.

- Revista Asoc Colomb Ictiol.*, 4, 75–82.
- Mateus, L. A. F., Penha, J. M. F., y Petreire, M. (2004). Fishing resources in the rio Cuiabá basin, Pantanal do Mato Grosso, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 2(4), 217–227. <https://doi.org/10.1590/s1679-62252004000400004>
- Mat Jaafar, T. N., Taylor, M. I., Mohd Nor, S. A., Bruyn, M. D., y Carvalho, G. R. (2020). Comparative genetic stock structure in three species of commercially exploited Indo-Malay Carangidae (Teleostei, Perciformes). *Journal of fish biology*, 96(2), 337-349. doi: 10.1111/jfb.14202. Epub 2019 Dec 15. PMID: 31721192.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biol* 3(12): e422. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>.
- Merino, M., Bonilla, S. P., y Bages, F. (2014). *Plan Nacional para el Desarrollo de la Acuicultura Sostenible en Colombia (PlaNDAS)*. <http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/Plan-Nacional-para-el-Desarrollo-de-la-Acuicultura-Sostenible-Colombia.pdf>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). *Estrategia de política para el sector de pesca y acuicultura*. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Documentos/6>. Documento de Política pesca y acuicultura Abril8de2019 31 Jul 2019.pdf
- Mojica, J. I., Usma, J. S., Álvarez-León, R., y Lasso, C. A. (Eds). (2012). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia 2012. Bogotá, D.C. Colombia.: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales.
- Montoya López, A. F., Carrillo, L. M., y Olivera Ángel, M. (2006). Algunos aspectos biológicos y del manejo en cautiverio de la Sabaleta *Brycon henni* Eigenmann, 1913 (Pisces: Characidae). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.*, 19(2), 180–186.
- Montoya Páez, J. D., Pineda Santis, H., y Restrepo-Betancur, G. (2018). Maduración in vitro de ovas de *Brycon henni* (Pisces: Characidae) con dos preparaciones hormonales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4), 1355-1363.
- Moreno, L. T. (2018). La Pesca e los Pescadores Artesanales en Colombia. PEGADA - A Revista Da Geografia Do Trabalho, 19(2). <https://doi.org/10.33026/peg.v19i2.5514>
- Moritz, C. y C. Cicero. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PloS. Biol.* 2: 1529–1531. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020354>
- Muñoz-A., L. E., Arredondo-B., J. V., y Carranza-Quiceno, J. A. (2019). Estructura genética poblacional del pez *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en la región andina de

32 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

- Colombia utilizando marcadores microsatélites. *Revista de Biología Tropical*, 67(4), 733-744.
- Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguela, T. C., Benine, R. C., Ortí, G., ... Corrêa e Castro, R. M. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 275. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-275>
- Oliveira, J. A., Crispim, B. D. A., Martins, N. M., Silva, A. O., Dourado, P. L. R., Rocha, M. P., y Grisolia, A. B. (2013). Sequências de gene mitocondrial para identificação de espécies animais. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(2), 396–407. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4732888.pdf>
- Pardo, B. G., Machordom, A., Foresti, F., Porto-Foresti, F., Azevedo, M. F. C., Bañon, R., ... Martínez, P. (2005). Phylogenetic analysis of flatfish (Order Pleuronectiformes) based on mitochondrial 16s rDNA sequences. *Scientia Marina*, 69(4), 531–543. <https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69n4531>
- Paz, A., Gonzalez, M., y Crawford, A. J. (2011). DNA Barcode of Life: An Introduction and Perspective. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161–176. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319027888011.pdf>
- Pereira, L. H., Hanner, R., Foresti, F., y Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20>
- Pineda Santis, H., Arboleda Chacón, L., Echeverry Echavarria, A., Urcuqui Inchima, S., Pareja Molina, D., Olivera Ángel, M., y Builes Gómez, J. (2007). Caracterización de la diversidad genética en el pez *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en Colombia central por medio de marcadores RAPD. *Revista de Biología Tropical*, 55(3–4), 1025–1035.
- Polly, P. D. (2018). Geometric Morphometrics. *The Encyclopedia of Archaeological Sciences*, 1–5. <https://doi.org/10.1002/9781119188230.saseas0258>
- Rach, J., Desalle, R., Sarkar, I. N., Schierwater, B., y Hadrys, H. (2008). Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings. Biological sciences*, 275(1632), 237–247. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1290>
- Rahman MM, NorÉn M, Mollah AR, Kullander S. (2018). The identity of *Osteobrama cotio*,

- and the status of "Osteobrama serrata" (Teleostei: Cyprinidae: Cyprininae). *Zootaxa*, 23; 4504 (1): 105-118. doi: 10.11646/zootaxa.4504.1.5. PMID: 30486037.
- Ratnasingham, S., y Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364. Recuperado de <http://www.ibol.org/phase1/about-us/what-is-dna-barcoding/>
- Restrepo-Betancur, G., Montoya Páez, J. D., y Arboleda Chacón, L. (2017). Evaluación de dos crioprotectores y tres curvas de congelación programable en la criopreservación de semen de *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(3), 597-605.
- Rosa, R. S., y Lima, F. C. T. (2008). Os peixes ameaçados de extinção. In: Machado, A.B.M., Drummond, G.M. y Paglia, A.P. (Eds.). *Livro Vermelho Da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*, 2, 1–278.
- Ruiz, R., y Cipriano, R. (2006). Morfometría geométrica de *Astyanax siapae* (pisces: characidae). *Dahlia*, 9, 63–75.
- Russell, P. (2010). *Genetics*. Harper Collins Publishers.
- Sanabria Boudri, F. S. (2019). *Importancia del pescado en la nutrición humana: Aporte de macro y micronutrientes, formas de consumo*. Universidad Nacional de Educación Enrique Guzmán y Valle.
- Shimabukuro-Dias, C. K., Oliveira, C., Reis, R. E., y Foresti, F. (2004). Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1), 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.11.010>
- Slice, D. E. (2001). Landmark coordinates aligned by procrustes analysis do not lie in Kendall's shape space. *Systematic Biology*, 50(1), 141–149. <https://doi.org/10.1080/10635150119110>
- Springer, M. S., DeBry, R. W., Douady, C., Amrine, H. M., Madsen, O., de Jong, W. W., & Stanhope, M. J. (2001). Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. *Molecular biology and evolution*, 18(2), 132-143. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003787>
- Sullivan, J. P., Lundberg, J. G., y Hardman, M. (2006). A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(3), 636–662. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.044>
- Tabares, C. J., Montoya, A. F., Arboleda, L., Echeverri, A., Restrepo, L. F., y Olivera-Angel,

34 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

- M. (2006). Efecto de la pluviosidad y el brillo solar sobre la producción y características del semen en el pez *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Revista de Biología Tropical*, 54(1), 179-187.
- Tognelli, M. F., Lasso, C. A., Bota-Sierra, C. A., Jiménez-Segura, L. F., Cox, N. A., y (Editores). (2016). *Estado de conservación y distribución de la biodiversidad de agua dulce en los Andes tropicales*. UICN. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2016.02.es>
- Toro Ibacache, María Viviana, Manriquez Soto, Germán, & Suazo Galdames, Iván. (2010). Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 28(4), 977-990. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022010000400001>
- Van der Molen, S., Martínez, N. A., y González, J. R. (2007). *Introducción a la morfometría geométrica curso teórico-práctico*. Universidad de Barcelona.
- Varona, J. M. D., Ruales, J. J., y Corporal, R. T. (2019). Intraspecific evaluation in the morphology of *Glossogobius guiris* using geometric morphometric analysis from Lake Mainit, Agusan del Norte, Philippines. <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/14.1.379-387>
- Vélez Sinisterra, E., y Velandia Rodríguez, E. S. (2014). Caracterización molecular de la especie íctica *Brycon henni* mediante la técnica RAMS en la Reserva Natural de Yotoco y el río Sonso.
- Wang T, Zhang YP, Yang ZY, Liu Z, Du YY. (2020). DNA barcoding reveals cryptic diversity in the underestimated genus *Triplophysa* (Cypriniformes: Cobitidae, Nemacheilinae) from the northeastern Qinghai-Tibet Plateau. *BMC Evol Biol.* 20 (1): 151. doi: 10.1186/s12862-020-01718-0. PMID: 33183225; PMCID: PMC7663858.
- Ward, R. D., Hanner, R., y Hebert, P. D. N. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74(2), 329–356. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02080.x>
- Ward, Robert D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., y Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847–1857. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- Wikstrom, M. K. (1977). Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature*, 266(5599), 271–273. <https://doi.org/10.1038/266271a0>
- Wong, L. L. (2011). *DNA Barcoding and Related Molecular Markers for Fish Species Authentication, Phylogenetic Assessment and Population Studies*. Auburn University.
- Zaniboni, E., Reynalte-Tataje, D., y Weingartner, M. (2006). Potencialidad del género

- Brycon* en la piscicultura brasileña. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2), 233–240.
- Zhang, D. X., y Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3), 563–584.
- Zhang L, Zhang J, Song P, Liu S, Liu P, Liu C, Lin L, Li Y. (2020). Reidentification of *Decapterus macarellus* and *D. macrosoma* (Carangidae) reveals inconsistencies with current morphological taxonomy in China. *Zookeys*. 995: 81-96. doi: 10.3897/zookeys.995.58092. PMID: 33281469; PMCID: PMC7688621.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., y Sheets, H. D. (2012). Geometric morphometrics for biologists: a primer. *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386903-6.00001-0>

2. Capítulo 2. Código de barras de la especie *Brycon henni* en las cuencas hidrográficas de Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

2.1 Resumen

Brycon henni (sabaleta) es un pez endémico de Colombia que habita en las cuencas de los ríos Cauca, Magdalena, San Juan, Patía. Se colectaron 40 muestras de tejido animal, fueron tomadas de la aleta caudal, en las cuencas hidrográficas de Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas del departamento del Valle del Cauca, amplificadas por PCR empleando los cebadores específicos para las regiones RAG1, 16S y COI. El objetivo de esta investigación fue identificar a nivel molecular la especie *Brycon henni*, así como los haplotipos relacionados con determinadas cuencas hidrográficas por medio de la utilización de código de barras de ADN. Los resultados evidenciaron la identificación de cuatro especies *Brycon henni*, *Brycon sp.*, *Bryconamericus caucanus* y *Creagrutus sp.*, además para las regiones COI y RAG1 se encontraron 22 haplotipos y para la región 16S siete haplotipos.

Palabras clave: Haplotipos, RAG1, 16S y COI.

2.2 Abstract

Brycon henni (Sabaleta) is an endemic fish from Colombia that lives in the Cauca, Magdalena, San Juan, Patía river basins. 40 samples of animal tissue were collected, taken from the caudal fin, in the Yotoco, Sonso, Guabas and Sabaletas watersheds of the Valle del Cauca department, amplified by PCR using the specific primers for the RAG1, 16S and COI regions. The objective of this research was to identify the *Brycon henni* species at the molecular level, as well as the haplotypes related to certain hydrographic basins by means of the use of DNA barcodes. The results showed that four species *Brycon henni*, *Brycon sp.*, *Bryconamericus caucanus* and *Creagrutus sp.* Were identified, in addition for the COI and RAG1 regions 22 haplotypes were found and for the 16S region seven haplotypes.

Keywords: Haplotype, RAG1, 16S y COI.

2.3 Introducción

Colombia tiene buenas condiciones para desarrollar actividades pesqueras, ya que cuenta con diversos pisos térmicos con clima estable a lo largo del año, gran variedad de sistemas hídricos de agua, superficies aptas para el cultivo de especies vegetales y animales en agua dulce o marina, un amplio sistema fluvial y alta biodiversidad (Esquivel *et al.*, 2014).

Los pescadores y la pesca en Colombia tienen un impacto negativo a consecuencia del turismo, la excesiva pesca, la contaminación del medio, entre otros, adicionalmente, los pobladores ribereños no tienen buenas condiciones de vida, ya que moran en los estratos más bajos (Moreno, 2018).

El pescado es una fuente de proteína para el consumo del hombre, además, cuenta con nutrientes esenciales. Este puede provenir de acuícolas o de poblaciones naturales, es el caso de la especie *Brycon henni*, conocida comúnmente como sabaleta, que es capturada en su hábitat natural por moradores ribereños, es una especie endémica de Colombia, oportunista, ya que consume alimentos tanto del fondo del río como de la superficie. La sabaleta es apetecida por los pescadores dado que presenta un comportamiento agresivo al momento de la pesca y por las características organolépticas de su carne.

Por la disminución de diversidad biológica en el planeta a causa de las malas acciones antrópicas, las gestiones de los recursos naturales (aprovechamiento, explotación, conservación y restauración) se han apresurado en obtener un registro de la biodiversidad, con el objetivo que la población conozca el funcionamiento y utilidad en el desarrollo sostenible (Chandra e Idrisova, 2011).

Por lo anterior, los códigos de barras o el DNA barcoding son una herramienta importante para los especialistas que trabajan con especies de difícil identificación morfológica (Kerr *et al.*, 2007). Es un método estandarizado y la información es de libre acceso (Paz *et al.*, 2011). La utilización de esta metodología favorece a la seguridad alimentaria, la biogeografía, a las investigaciones de biodiversidad, especies sin determinar y a las invasoras (Gong *et al.*, 2018). En la identificación genética de peces se ha empleado una extensa diversidad de metodologías con base en ADN y proteínas, esta determinación se

ha realizado en pescados y subproductos pesqueros, a partir de huevos hasta adultos (Ward *et al.*, 2005).

Brycon henni es una especie autóctona de Colombia importante en la alimentación de las comunidades aledañas a los ríos donde habita (Montoya *et al.*, 2006), en el *Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia* esta especie no se encuentra en las categorías de riesgo (Mojica *et al.*, 2012).

La sabaleta habita en aguas con oxígeno disuelto alto entre 7 a 10 mg/L, con una reducción en los niveles esta especie puede estar en estado susceptible (Builes y Urán, 1974; Botero-Botero y Ramírez-Castro, 2011; Zapata-Restrepo *et al.*, 2017), de la misma manera que por la contaminación de los ríos, que origina pérdidas en el número de especímenes (Hurtado-Alarcón *et al.*, 2011).

Planteamiento del problema

La especie *Brycon henni* es autóctona de Colombia, esta especie no se encuentra reportada en el *Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia*, sin embargo, las comunidades cercanas a los ríos la siguen capturando por el alto valor nutricional que les aporta, adicionalmente sus hábitats han sido contaminados por acción antrópica, por lo cual las poblaciones naturales han disminuido considerablemente (Lenis *et al.*, 2009).

La sabaleta está adaptada a aguas limpias y templadas, por tal razón es una especie que puede llegar a ser cultivada aprovechando espacios de agua para su conservación, estas condiciones son importantes en lo referido a la seguridad alimentaria de las regiones donde está la especie, toda vez que la utilizan para consumo y pesca deportiva, esto último por la agresividad que presenta en el momento de la captura (Montoya *et al.*, 2006).

Las investigaciones en peces de las cuencas hidrográficas de Colombia son importantes para conocer la evolución de la ictiología dulceacuícola (Carvalho y Galetti, 2008). La especie *Brycon henni* se encuentra en los afluentes del río Cauca en mayor proporción, pero puede haber una reducción de la población por contaminación en los afluentes (Botero-Botero y Ramírez-Castro, 2011).

Se escogieron cuatro cuencas hidrográficas (ríos Sonso, Yotoco, Guabas y Sabaletas) del departamento del Valle del Cauca porque la distribución de *B. henni* es amplia, comprende afluentes de la zona alta del río Cauca y afluentes del río Anchicaya.

El río Sonso, se ubica en el municipio de Guacarí, cuenta con 69,95 km², este afluente tiene contaminación orgánica moderada por recibir las aguas residuales de la población de Sonso, desechos de producciones pecuarias y del ingenio Pichichi (CVC y Univalle, 2001).

El río Yotoco se encuentra en el municipio de Yotoco y tiene un área de 10 458 hectáreas, aporta materia orgánica con aproximadamente 252 mg/L de concentración de oxígeno disuelto, el alcantarillado es vertido directamente al río Yotoco por no tener planta de tratamiento de aguas residuales. El río Guabas, ubicado en el municipio de Ginebra, es el principal proveedor hídrico para las actividades económicas de los municipios de Ginebra y Guacarí. Esta cuenca se encuentra afectada por la degradación del aire, del agua, del suelo, de la calidad de vida y de la diversidad biológica (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, 2014).

En Buenaventura, el río Sabaletas se ubica en el corregimiento de Sabaleta, por las malas prácticas en la minería y la agricultura, el bosque presenta altos niveles de deterioro (Brown y Venté, 2008).

En pro de la conservación de la diversidad y por la inclemencia del cambio climático, es una tarea fundamental realizar una identificación más detallada del ADN de la especie que pueda ser eventualmente afectada, para ello se emplean los códigos de barras (Center, 2014), esta metodología ofrece registros minuciosos, específicos y bioinformáticos, al usar bases cortas de ADN con marcadores moleculares (Hubert *et al.*, 2008).

El código de barras de ADN es una herramienta de identificación de especies con un sistema rápido y preciso. Se utiliza genes estándares y cortos para producir bancos de secuencias de organismos conocidos y desconocidos que al final logran ser identificados (J. Zhang y Hanner, 2012). Esta metodología ha sido importante para la estimación de la diversidad biológica y de su preservación, eficiente para caracterizar diferentes especies y solucionar los inconvenientes en la identificación por medio de la taxonomía convencional (Akram *et al.*, 2017).

Hipótesis

Existe alta diversidad genética en *Brycon henni* y hay estructura genética en donde los haplotipos se asocian a cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas.

Justificación

Para la subsistencia del hombre son importantes los ecosistemas acuáticos continentales por la diversidad de servicios y bienes indispensables, tales como: agropecuario, alimentación, industrial, transporte, suministro de agua para uso doméstico, suministro de energía, captura de carbono, recreación y servicios culturales.

En los Andes tropicales se tiene poco conocimiento sobre la diversidad biológica de agua continental, por lo que es importante recolectar información sobre los estados de conservación, hábitat y distribución de las especies de agua dulce en las distintas regiones (Tognelli *et al.*, 2016).

La cuenca del río Cauca se encuentra desde los 950 m s.n.m., cuenta con una alta variabilidad de peces comparada con otras regiones localizadas a la misma altura.

Por el aislamiento causado a partir del levantamiento del valle geográfico del río Cauca, en la cuenca se halla una proporción elevada de endemismos (Maldonado-Ocampo *et al.*, 2005).

En Colombia, la construcción de embalses en la cuenca Magdalena-Cauca ha ocasionado modificaciones en los ecosistemas de agua dulce, especialmente afectando a las especies de peces y sus procesos de migración-reproducción, fundamentalmente para la pesca comercial y artesanal (Jiménez-Segura *et al.*, 2014). Por esto, las poblaciones aledañas a los ríos tienen repercusiones negativas en cuanto a la economía y a seguridad alimentaria, por lo que dependen de la pesca (Tognelli *et al.*, 2016).

La variación genética afirma la habilidad de las poblaciones para subsistir y adaptarse a las modificaciones del ambiente. La información empírica indica que hay una disminución de la variación genética en poblaciones reducidas y separadas a causa de la deriva genética, lo que produce una disminución en la adaptación y la capacidad física y un aumento de la endogamia (Pavlova *et al.*, 2017). Numerosas investigaciones han analizado la variación genética por medio de secuenciación de ADN (Templeton, 2004). El objetivo del código de barras de ADN es determinar especies por medio de un fragmento corto y estandarizado de un gen específico (P. Hebert y Gregory, 2005). El código de barras de ADN se emplea para ayudar a la conservación de la diversidad biológica de los peces y al aprovechamiento sostenible del medio piscícola (Chang *et al.*, 2017). La historia evolutiva de la diversidad genética se puede reconstruir mediante una red de haplotipos

(Templeton, 2004). Esta red es un gráfico donde se observa las conexiones genéticas entre los haplotipos, las frecuencias, la división por medio de los pasos mutacionales, incluso se puede estudiar sobre la estructura genética, el flujo genético, el origen geográfico y obtener datos respecto a la historia de la población (Clement *et al.*, 2000).

Por lo anterior fue necesario investigar sobre la especie endémica *B. henni* en las cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas del departamento del Valle del Cauca, con el método de código de barras de ADN utilizando las regiones mitocondriales 16S, COI y la región nuclear RAG1.

Objetivo general

Identificar la diversidad genética de los grupos dentro de la especie *Brycon henni*, en las cuencas hidrográficas de los ríos Sonso, Yotoco, Guabas y Sabaletas, por medio de la secuenciación del gen nuclear RAG1 y las regiones mitocondriales 16S rRNA y COI.

Objetivos específicos

- Evaluar los marcadores moleculares RAG1, COI y 16S, para la caracterización de la especie *B. henni* provenientes de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas.
- Diferenciar y evaluar la diversidad genética de la especie *Brycon henni* de acuerdo con el origen geográfico de los ríos Sabaletas, Sonso, Yotoco y Guabas.
- Identificar por medio de la utilización de código de barras de ADN los haplotipos relacionados con los ríos Sonso, Yotoco, Guabas y Sabaletas para la especie *Brycon henni*.

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Sitios de recolección de muestras

Los individuos de sabaletas se compraron a los pescadores aledaños a las zonas geográficas, estos fueron capturados con diferentes artes de pesca, diez especímenes en Sonso (Guacarí), con la mano; diez especímenes en Yotoco, con anzuelo y nasas; diez especímenes en Guabas (Ginebra) y diez especímenes en Sabaletas (Buenaventura), con anzuelo, para un total de 40 especímenes. Y se realizó la georreferenciación en los puntos

Tabla 2-1: Georreferenciación para los puntos de colecta.

Población	Latitud	Longitud	Altura m s.n.m.
Sonso	N 3° 48' 21,8"	W 76° 17' 29,3"	992
Yotoco	N 3° 52' 18,7"	W 76° 24' 11,6"	1017
Guabas	N 3° 45' 56"	W 76° 14' 4,5"	1160
Sabaletas	N 3° 45' 9,5"	W 76° 57' 13,6"	53

2.4.2 Material experimental

La colecta consistió principalmente de muestras de fragmentos de aletas caudales, se conservó el cuerpo completo o las aletas en tubos plásticos con alcohol al 90 %, debidamente etiquetados, las muestras fueron transportadas en una nevera plástica portátil, hasta ser refrigerados a 4° C en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. La información tomada en campo quedó registrada en la base de datos del grupo de investigación en Diversidad Biológica, de la misma sede universitaria.

2.4.3 Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico a partir de aleta caudal, haciendo uso del protocolo de fenol cloroformo y alcohol isoamílico propuesto por Bardakci y Skibinski (1994), modificado en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, con el fin de disminuir el tiempo en la obtención del ADN y aumentar la concentración del mismo, el ADN así extraído fue conservado a -80° C en el laboratorio de biología molecular, grupo de investigación en Diversidad Biológica.

1. Tomar 50 mg de tejido y pasarlo a un tubo plástico de 1,5 mL.
1. Adicionar 500 µL de buffer STE* pH 8 autoclavado.
2. Adicionar 30 µL de proteinasa K 10 mg/mL.
3. Agitar en vórtex e incubar a 50 °C por 3 horas, cada 15 minutos agitar.
4. Añadir 30 µL de SDS 10 %
5. Mezclar suavemente e incubar a 50 °C durante 10 min.
6. Añadir Fenol Cloroformo Isoamílico F: C: I (24:24:1).
7. Agitar fuertemente.
8. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min.
9. Rescatar el sobrenadante y verter en un tubo nuevo.
10. Agregar 500 µL de cloroformo isoamílico. (24:1)
11. Agitar.

- 44 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas
-

12. Centrifugar a 8100 rpm durante 5 minutos.
13. Rescatar el sobrenadante y verter en un nuevo tubo.
14. Adicionar 50 µL de acetato de aluminio al 5M y mezclar suavemente.
15. Añadir 50 µL de isopropanol.
16. Dejar reposar por 2 horas a temperatura ambiente.
17. Centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos.
18. Desechar el sobrenadante con cuidado.
19. Adicionar 1000 µL de etanol al 70 %.
20. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos.
21. Desechar el sobrenadante.
22. Dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
23. Resuspender el pellet en 50 µL de TE 1X + (1ul) RNAsa.
24. Incubar a 37 °C por 60 minutos en baño maría.
25. Almacenar a -20 °C.

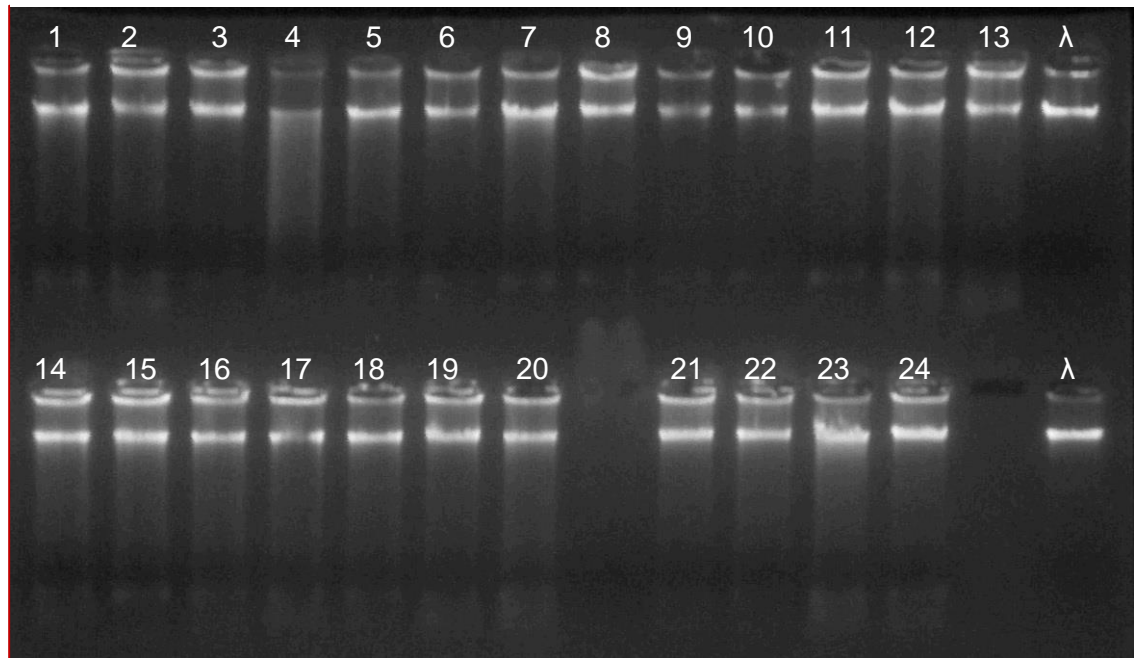
*** Buffer STE (Sodium Chloride-Tris-EDTA)**

Reactivo	Concentración final
H ₂ O	
Tris 1M pH 8	0,05 M
NaCl 5M	0,1 M
EDTA 0,5 M Ph	0,01 M

2.4.4 Medición de la calidad y cantidad de ADN

La calidad y cantidad de ADN se analizó en el espectrofotómetro para microvolúmenes COLIBRI (Titertek-Berthold ®) e igualmente se elaboró gel de Agarosa a una concentración del 1 % corrida en TBE 0,5 % a 100 voltios por 30 minutos. El ADN genómico se visualizó empleando el intercalante de ADN GelRed, en el trasiluminador Cleaver View (Cleaver Scientific Ltd), con luz ultravioleta de 254/312 nanómetro de longitud de onda.

Figura 2-1: Gel de agarosa al 1 %, 1 - 24 algunas muestras de peces con buena calidad de ADN para los procesos moleculares, concentraciones del bacteriófago λ .



2.4.5 Amplificación de ADN, purificación y secuenciamiento

Se evaluaron tres regiones, dos mitocondriales (COI y 16S) y una nuclear (RAG1) (Tabla 2-2.) como medio efectivo para el código de barras de ADN de las sabaletas.

Tabla 2-2: Cebadores usados para la amplificación de diferentes fragmentos de genes de ADN mitocondrial y ADN nuclear.

Marcador	Cebador	Secuencia Cebador 5'-3'	Autor
16S	16Sa-L	5'-ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	Palumbi, 1996
	16Sb-H	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	
COI	FishF1	5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	Hubert <i>et al.</i> , 2008
	FishR1	5'-TAGACTTCTGGTGGCCAAAGAAT-3'	
RAG1	2510F	5'-TGGCCATCCGGGTMAACAC-3'	Li y Ortí, 2007
	4090R	5'-CTGAGTCCTTGTGAGCTTCCATRAAYT-3'	
RAG1	2535F	5'-AGCCAGTACCATAAGATGTA-3'	Li y Ortí, 2007
	4078R	5'-TGAGCCTCCATGAACTTCTGAAGRTAYTT-3'	

Y: C, T.

R: A, G.

M: A, C.

46 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

De la región COI fueron amplificadas aproximadamente 650 pares de bases utilizando los cebadores FishF1 y FishR1 (Hubert *et al.*, 2008), las reacciones de PCR con volumen final de 25 µl, contenía: 8,9 µl de agua mili-Q, 2,5 µl de Buffer (NH₄)₂SO₄ con concentración inicial (10X), 2,5 µl de MgCl₂ con concentración inicial (25 mM), 4 µl de dNTPs con concentración inicial (20 mM), 1 µl de cada cebador con concentración inicial (10 mM), 0,1 µl de Taq Pol. con concentración inicial (5 U/ µl), 1 µl de BSA con concentración inicial (5X), 3 µl de Trehalosa 10 % y 1 µl de ADN con concentraciones entre 20 ng/µl a 2000 ng/µl. Las condiciones térmicas para la amplificación de la región COI fue un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 40 S., hibridación a 52° por 70 S., extensión a 72 °C por 1 min, finalmente un ciclo de extensión a 72 °C por 10 min. (Hubert *et al.*, 2008).

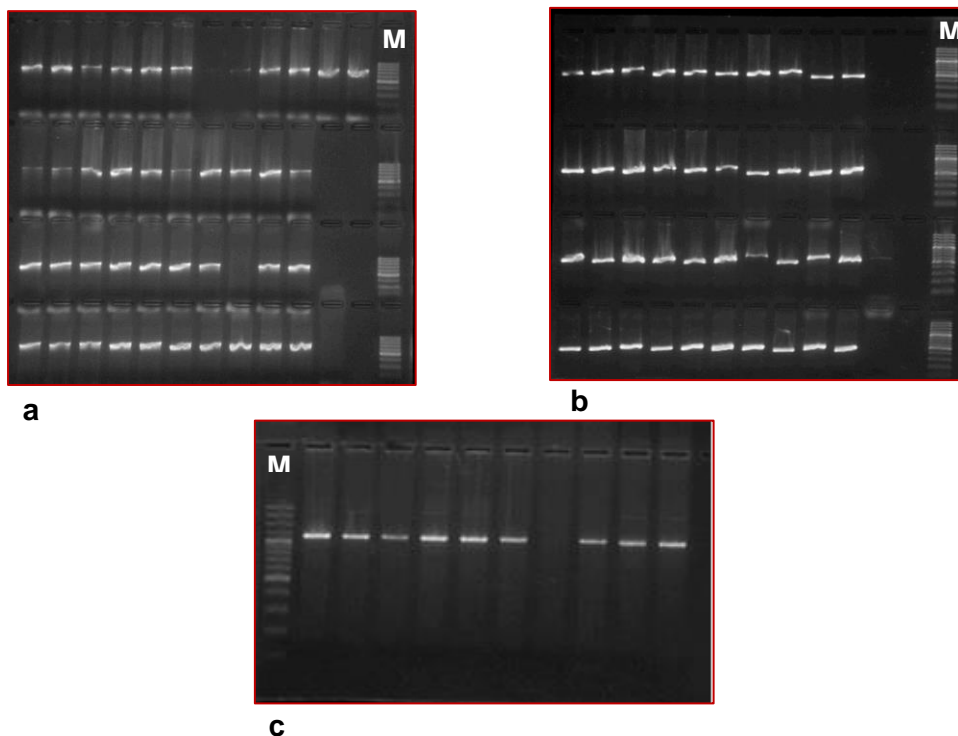
En la región 16S se amplificaron aproximadamente 584 pares de bases empleando los cebadores 16Sa-L y 16Sa-L (Palumbi, 1996), las reacciones de PCR con volumen final de 25 µl contenía: 8,9 µl de agua mili-Q, 2,5 µl de Buffer (NH₄)₂SO₄ con concentración inicial (10X), 2,5 µl de MgCl₂ con concentración inicial (25 mM), 4 µl de dNTPs con concentración inicial (20 mM), 1 µl de cada cebador con concentración inicial (10 mM), 0,1 µl de Taq Pol. con concentración inicial (5 U/ µl), 1 µl de BSA con concentración inicial (5X), 3 µl de Trehalosa 10 % y 1 µl de ADN con concentraciones entre 20 ng/µl a 2000 ng/µl. Las condiciones térmicas para la amplificación de la región 16S fue un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 45 S., hibridación a 52 °C por 45 S., extensión a 72 °C por 1 min, finalmente un ciclo de extensión a 72 °C por 10 min (Palumbi, 1996).

En la región RAG1 se amplificaron aproximadamente 1492 pares de bases utilizando una PCR anidada con cebadores externos 2510F y 4090R, la reacción de PCR con volumen final de 25 µl contenía: 7,9 µl de agua mili-Q, 2,5 µl de Buffer KCl con concentración inicial (10X), 3,5 µl de MgCl₂ con concentración inicial (25 mM), 4 µl de dNTPs con concentración inicial (20 mM), 1 µl de cada cebador con concentración inicial (10 mM), 0,1 µl de Taq Pol. con concentración inicial (5 U/ µl), 1 µl de BSA con concentración inicial (5X) y 4 µl de ADN con concentraciones entre 20 ng/µl a 2000 ng/µl (Li y Ortí, 2007); condiciones térmicas para la amplificación fue un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 S., hibridación a 50 °C por 30 S., extensión

a 72 °C por 2 min, finalmente un ciclo de extensión a 72 °C por 10 min, se continuó con la PCR anidada con los cebadores internos 2535F y 4078R, las reacciones de PCR con volumen final de 50 µl contenía: 21,8 µl de agua mili-Q, 5 µl de Buffer KCl con concentración inicial (10X), 5 µl de MgCl₂ con concentración inicial (25 mM), 8 µl de dNTPs con concentración inicial (20 mM), 2 µl de cada cebador con concentración inicial (10 mM), 0,2 µl de Taq Pol. con concentración inicial (5 U/ µl), 2 µl de BSA con concentración inicial (5X) y 4 µl del purificado de la primer PCR (Li y Ortí, 2007); condiciones térmicas para la amplificación fue un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min., seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 40 S., hibridación a 45 °C por 40 S., extensión a 72 °C por 1 min. y 40 S., finalmente un ciclo de extensión a 72 °C por 10 min.

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en dos termocicladores PeQSTAR de PeQLAB y Multigene optimax de LABNET. Se evaluó la amplificación en un gel de agarosa a 1,5 %, se empleó el protocolo para la purificación descrito por Schmitz y Riesner (2006) a todos los productos de PCR. Los fragmentos de las regiones mitocondriales (COI y 16S) fueron enviados a secuenciar a la empresa MACROGEN USA y la región nuclear (RAG1) se envió a secuenciar a BIONEER KR. Las cuales consistieron en secuenciaciones por ambos sentidos (*forward* y *reverse*), empleando los cebadores de la amplificación de PCR (Tabla 2-2.).

Figura 2-2: Gel de agarosa 1,5 %, para las regiones **a)** COI I, **b)** 16S y **c)** RAG1. (M) Marcador molecular.



2.4.6 Análisis de datos

2.4.6.1 Alineación de datos

Con el programa Geneious v8.05 para Windows se realizaron las alineaciones de las matrices de datos COI, 16S y RAG1 independientes, igualmente se editó manualmente para eliminar los cebadores de PCR, bases añadidas en el proceso de hibridación y para mejorar la alineación final; por último, se generó una secuencia única de consenso para cada individuo en cada una de las regiones.

2.4.6.2 Análisis de las distancias genéticas

Se empleó el programa Mega7 (Kumar *et al.*, 2016) basado en el modelo de evolución kimura 2-parámetros (K2P) con el cual se estimaron las distancias evolutivas teniendo en cuenta el número de sustituciones de nucleótidos (Kimura, 1980), por lo tanto se calcularon las distancias genéticas inter e intraespecíficas de *Brycon henni*, *Brycon sp.*, *Bryconamericus caucanus* y *Creagrutus sp.*, para cada locus de código de barras de ADN, se descartaron todas las posiciones que tenían huecos y datos faltantes.

Asimismo, se obtuvieron los árboles de Vecindad, Neighbor-Joining (NJ), el algoritmo del vecino más cercano con un *bootstrap* de 10 000 permutaciones, basados en las divergencias de secuencia K2P estimadas.

2.4.6.3 Análisis de redes de haplotipos

Con el *software* TCS 1.21 que considera la parsimonia estadística se estimó el número de haplotipos y las redes filogenéticas a partir de las secuencias de ADN alineadas para cada una de las regiones COI, 16S y RAG1, se construyeron con un 95 % de confianza y el tratamiento se estableció como el quinto estado para los datos faltantes (Clement *et al.*, 2000).

2.4.6.4 Análisis filogenético

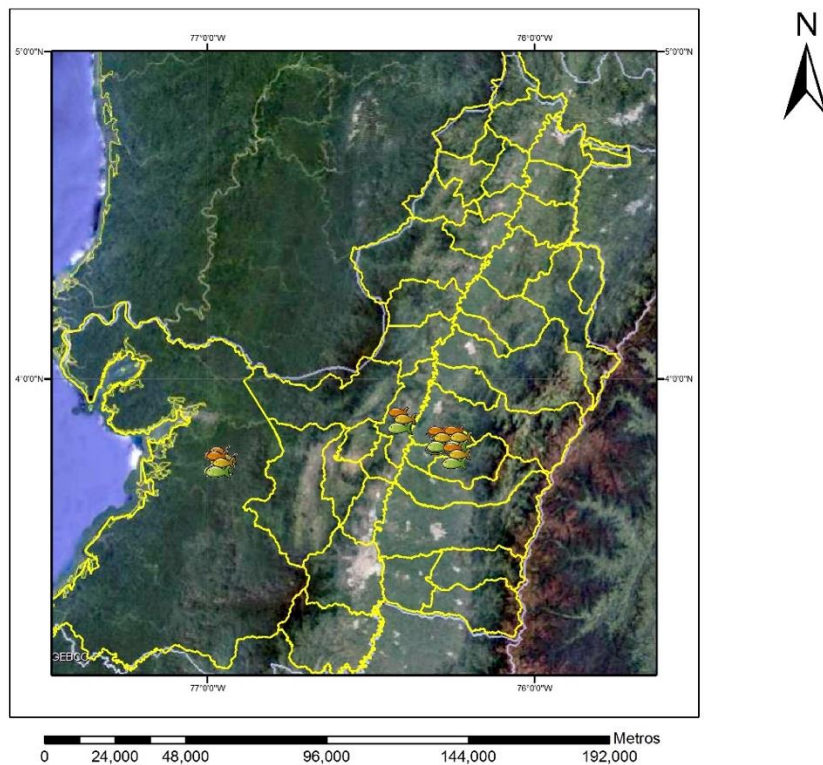
Para todas las muestras secuenciadas de *B. henni*, *Brycon sp.*, *B. caucanus*, y *Creagrutus sp.*, se efectuaron los análisis independientes, los árboles se enraizaron porque las especies son distantes.

A través del programa jModelTest 2.1.10 se escogió el mejor modelo de sustitución de nucleótidos para cada una de las regiones secuenciadas, por medio de la prueba de razón de probabilidad jerárquica y el criterio de información Akaike. Se estimó la búsqueda de inferencia bayesiana que estableció los parámetros $nst=5$ y $rates=gamma$ a la división de la secuencia de nucleótidos y el *software* continuo para calcular los parámetros faltantes (Darriba *et al.*, 2012).

2.5 Resultados

De cuatro sitios geográficos: Guacarí (Sonso), Yotoco, Buenaventura (Sabaletas) y Ginebra (Guabas), se obtuvieron 40 muestras, identificadas y distribuidas después de los análisis así: *Brycon henni* (n=23); *Brycon sp.* (n=10); *Bryconamericus caucanus* (n=2); *Creagrutus sp.* (n=5) (Figura 2-3). Se amplificaron y secuenciaron las regiones: COI (n=39, 100%), 16S (n=39, 97,5%) y RAG1 (n=33; 94,3%), (Tabla 2-7).

Figura 2-3: Mapa de coordenadas geográficas de Guabas, Yotoco, Sonso y Sabaletas-Buenaventura.



Fuente: Google Earth, elaborado por la Ing. Adriana Martínez Arias (2020).

50 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

Los resultados en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) arrojaron un porcentaje de identidad promedio de 96,67, un valor esperado (Expect value- E-Value) de cero lo que indica que las alineaciones no son al azar, para el caso de la especie *Brycon henni* se identificó teniendo en cuenta que las alineaciones presentaron una puntuación de similitud alta, en la población del río Sonso se obtuvo un porcentaje de identidad y cobertura de 100, para las poblaciones de los ríos Yotoco y Guabas se obtuvo un porcentaje de identidad y de cobertura de 99.

Para la población del río Guabas se identificaron dos individuos para la especie de *Bryconamericus caucanus* y para la población del río Yotoco se identificaron cinco individuos de la especie *Creagrutus sp.* estas dos especies se utilizaron como grupos externos para un análisis más completo.

Es importante destacar que para cada zona geográfica se obtuvieron 10 ejemplares.

Tabla 2-3: Resultados de alineamiento en BLAST para las secuencias.

Población	Blast	% Identidad	% Cobertura	E- value	Score	Accesión
Sonso	<i>Brycon henni</i>	100	100	0	1162	KP027535.1
Guabas	<i>Brycon henni</i>	99	99	0	1152	KP027535.1
Guabas	<i>Bryconamericus caucanus</i>	99	79	0	954	KF210045.1
Yotoco	<i>Brycon henni</i>	99	99	0	1219	KP027535.1
Yotoco	<i>Creagrutus sp.</i>	90	99	0	852	HM144046.1
Sabaletas¹	<i>Brycon sp.</i>					

En las Tablas 2-4, 2-5 y 2-6 se observa que la identificación por medio del alineamiento en BLAST no es clara para la población del río Sabaletas-Buenaventura, debido a que en cada región se alineó con diferentes especies, por lo tanto, se le designó como *Brycon sp.*

¹ Para este sitio geográfico, en las regiones genética: COI, 16S y RAG1, se obtuvo diferentes identidades y coberturas, como se muestra en (Tabla 2-4, 2-5 y 2-6).

En la tabla 2-4, se aprecia que para la región COI la alineación se obtuvo una puntuación alta con mayor similitud para la especie *Brycon argenteus*, sin embargo, no se consiguió una cobertura completa: solo el 98 % y una identidad del 97,38 %.

Tabla 2-4: Resultados de alineamiento de la región COI en BLAST para las muestras del río Sabaletas-Buenaventura.

COI					
Descripción	Max Score	Query Coverage	E-value	% Identity	Accesión
<i>Brycon argenteus</i> voucher stri-3896 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1103	98 %	0,0	97,38	MG936800.1
<i>Brycon argenteus</i> voucher stri-4548 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1101	98 %	0,0	97,37	MG936798.1
<i>Brycon argenteus</i> voucher stri-4061 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1098	98 %	0,0	97,22	MG936799.1
<i>Brycon argenteus</i> voucher stri-7594 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1096	98 %	0,0	97,22	MG936797.1
<i>Brycon petrosus</i> voucher stri-16207 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1092	98 %	0,0	97,07	MG936812.1
<i>Brycon petrosus</i> voucher stri-7407 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1092	98 %	0,0	97,07	MG936811.1
<i>Brycon argenteus</i> voucher stri-11804 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1092	98 %	0,0	97,07	MG936796.1
<i>Brycon argenteus</i> voucher stri-3708 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1092	98 %	0,0	97,07	MG936795.1
<i>Brycon obscurus</i> voucher stri-1340 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1086	98 %	0,0	96,91	MG936810.1
<i>Brycon argenteus</i> voucher stri-11266 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1086	98 %	0,0	96,91	MG936794.1
<i>Brycon sp. nov. Acla</i> stri-1722 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1081	98 %	0,0	96,76	MG936816.1
<i>Brycon obscurus</i> voucher stri-1385 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1081	98 %	0,0	96,76	MG936807.1
<i>Brycon obscurus</i> voucher AM-27 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1075	98 %	0,0	96,60	MG936808.1

52 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

Tabla 2-4: (Continuación)

<i>Brycon</i> sp. nov. Acla stri-3856 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1068	97 %	0,0	96,87	MG936815.1
<i>Brycon henni</i> voucher YTR-32 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	948	99 %	0,0	92,81	MK355252.1

En la tabla 2-5, para el gen 16S, se obtuvo un score de alineación bajo para la especie *Brycon henni*, a pesar que la cobertura fue de un 100 %, el porcentaje de identidad fue de 96,54 %, por lo tanto, se infiere que esta especie no corresponde para las secuencias de las muestras del río Sabaletas.

Tabla 2-5: Resultados de alineamiento de la región 16S en BLAST para las muestras del río Sabaletas-Buenaventura.

16S					
Descripción	Max Score	Query Coverage	E-value	% Identity	Accesión
<i>Brycon henni</i> voucher Bhen-UNAL-001 mitochondrion, complete genome	955	100 %	0,0	96,54	KP027535.1
<i>Brycon petrosus</i> voucher LBP2750-18504 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	955	100 %	0,0	96,71	KF780001.1
<i>Brycon hilarii</i> voucher LBP2766-17634 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	946	100 %	0,0	96,37	KF779984.1
<i>Brycon henni</i> voucher LBP2857-18984 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	941	100 %	0,0	96,19	KF779982.1
<i>ChiloBrycon deuterodon</i> voucher LBP9334-45002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	902	100 %	0,0	94,99	KF780004.1
<i>ChiloBrycon deuterodon</i> voucher LBP9334-45001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	900	100 %	0,0	94,99	KF780003.1

Tabla 2-5: (Continuación)

<i>Brycon aff. atrocaudatus</i> KTA-2014 voucher LBP1356-17096 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	889	100 %	0,0	94,65	KF779971.1
<i>Pseudocorynopoma heterandria</i> voucher LBP2862-18570 16S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	841	100 %	0,0	92,96	HQ171268.1
<i>LophioBrycon weitzmani</i> voucher LBP1225-38090 16S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	824	100 %	0,0	92,45	HQ171411.1
<i>Mimagoniates rheocharis</i> voucher MCP 28770, caixa II-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	824	98 %	0,0	92,72	FJ748993.1
<i>Mimagoniates lateralis</i> voucher AMNH233402 16S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	822	100 %	0,0	92,28	AY788051.1
<i>Brycon chagrensis</i> voucher LBP2749-18510 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	821	100 %	0,0	92,29	KF779972.1
<i>Mimagoniates lateralis</i> voucher UFRGS 8998, Tec 710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	819	98 %	0,0	92,55	FJ748998.1
<i>Planaltina sp. k</i> CO-2018 voucher LBP18902 75270 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	813	100 %	0,0	92,08	KY671259.1

54 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

Tabla 2-5: (Continuación)

<i>Planaltina</i> sp. k CO-2018 voucher LBP18902 75269 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	813	100 %	0,0	92,08	KY671258.1
<i>Corynopoma riisei</i> isolate S418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	813	96 %	0,0	93,05	KF209792.1

En la alineación para el gen RAG1 se observa que la especie *Brycon petrosus* obtuvo mayor porcentaje de *score*, no obstante, el porcentaje de cobertura fue del 90 % y el porcentaje de identidad del 99,37 %, por lo tanto, no se designa como la especie homóloga (ver Tabla 2-6).

Tabla 2-6: Resultados de alineamiento de la región RAG1 en BLAST para las muestras del río Sabaletas-Buenaventura.

RAG1					
Descripción	Max Score	Query Coverage	E- value	% Identity	Descripción
<i>Brycon petrosus</i> voucher LBP2750-18504 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2294	90 %	0,0	99,37	KF780109.1
<i>Brycon</i> sp. UFRGS11377 recombination activating protein 1 (rag1) gene, partial cds	2231	97 %	0,0	96,26	KF210893.1
<i>Brycon henni</i> voucher LBP2857-18984 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2228	90 %	0,0	98,42	KF780097.1
<i>Brycon vermelha</i> voucher LBP9066-42508 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2202	87 %	0,0	99,18	KF780110.1
<i>ChiloBrycon deuterodon</i> voucher LBP9334-45002 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2183	87 %	0,0	98,94	KF780111.1

Tabla 2-6: (Continuación)

<i>Brycon pesu</i> voucher OS 18361 PE10072 recombination activating protein 1 (Rag1) gene, partial cds	2152	98 %	0,0	94,85	KX086967.1
<i>Brycon nattereri</i> voucher LBP8101- 37541 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2067	90 %	0,0	96,13	KF780103.1
<i>Brycon opalinus</i> voucher LBP6306- 29349 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2050	90 %	0,0	95,90	KF780106.1
<i>Brycon opalinus</i> voucher LBP6303- 29001 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2045	90 %	0,0	95,82	KF780105.1
<i>Brycon orbignyianus</i> voucher LBP82746-18004 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2034	90 %	0,0	95,66	KF780104.1
<i>Brycon amazonicus</i> voucher LBP2187-15567 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2028	90 %	0,0	95,58	KF780085.1
<i>Hepsetus odoe</i> voucher LBP7527- 35373 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2028	90 %	0,0	95,58	HQ289288.1
<i>Brycon amazonicus</i> voucher LBP2187-15565 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2028	90 %	0,0	95,58	HQ289158.1
<i>Brycon orthotaenia</i> voucher LBP249-4215 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2023	90 %	0,0	95,50	KF780107.1
<i>Brycon ferox</i> voucher LBP8100- 37529 recombination activating protein 1 (RAG1) gene, partial cds	2023	90 %	0,0	95,50	KF780095.1

56 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

Con el método de parámetro de Kimura 2 mostraron valores de divergencia genética interespecífica altas y valores intraespecíficos bajos, la distancia intraespecífica más alta fue para la especie *Brycon sp.* (COI=1,2%, 16s= 0,44% y RAG1= 0,31 %).

La mayor distancia interespecífica se obtuvo en la región COI para las especies *Brycon sp.* y *Creagrutus sp.* (10,37 %) y la menor entre *B. henni* y *Brycon sp.* (3,38 %) (Tabla 2-7).

Para la región 16S la mayor divergencia también se presentó para las especies *Brycon sp.* y *Creagrutus sp.* (3,6 %) y la menor para las especies *B. henni* y *Brycon sp.* (1,12 %), (Tabla 2-7).

En la región de origen nuclear, RAG1, se percibió similitud con los dos marcadores mitocondriales. Mostrando valores interespecíficos bajos y valores intraespecíficos altos comparados con los marcadores mitocondriales: 0,18 % para *B. henni*; 0,31 % para *Brycon sp.*; 1,16 % para *B. caucanus* y 0,21 % para *Creagrutus sp.* La distancia genética interespecífica mayor se evidenció entre las especies *Brycon sp.* y *Creagrutus sp.* (4,59 %) y la menor entre *B. henni* y *Brycon sp.* (0,71 %) (Tabla 2-7).

Tabla 2-7: Variación de la secuencia y poder de discriminación de tres regiones estudiadas para el Código de Barras de ADN.

ÍTEMS	REGIONES		
	COI	16S	RAG1
Número de especies	4	4	4
Número de nucleótidos alineados	657	584	1404
% éxito de amplificación	97,5	100	87,5
% éxito de secuenciación	100	97.5	94.3
% especies identificadas exitosamente (<i>B. henni/Brycon sp./B. caucanus/Creagrutus sp.</i>)	100	100	100
% De sitios de nucleótidos variables	25,11	10,27	13,82
% Diagnóstico de sitios de nucleótidos (Parsimonia-informativo sitio)	24,50	10,10	10,32

Tabla 2-7: (Continuación)

Distancia media intraespecífica media (Mín. - Máx.)	0,0859 (0,0 - 0,2203)	0,0835 (0,0 - 0,0797)	0,0319 (0,0 - 0,0964)
Distancia media intraespecífica de <i>B. henni</i> (Mín. - Máx.)	0,004(0,0-0,0046)	0,000 (0,0-0,0)	0,0018 (0,0 - 0,0085)
Distancia media intraespecífica de <i>Brycon sp.</i> (Mín. – Máx.)	0,0120 (0,0-0,0249)	0,0044 (0,0 - 0,0087)	0,0031 (0,0 - 0,0068)
Distancia media intraespecífica de <i>Bryconamericus caucanus</i> (Mín. – Máx.)	0,0031 (0,0-0,0031)	0,0017 (0,0 – 0,0017)	0,0116 (0,0 - 0,0116)
Distancia media intraespecífica de <i>Creagrutus sp.</i> (Mín. – Máx.)	0,00 (0,0-0,00)	0,00 (0,0-0,00)	0,0021 (0,0 - 0,0034)
Distancia interespecífica media entre <i>B. henni- B. caucanus</i> . (Mín. – Máx.)	0,0361 (0,0 - 0,2127)	0,0121 (0,0-0,0797)	0,0171 (0,0-0,0960)
Distancia interespecífica media entre <i>B. henni- Creagrutus sp.</i> (Mín. – Máx.)	0,0677 (0,0 - 0,2073)	0,0225 (0,0-0,0739)	0,0264 (0,0 - 0,0913)
Distancia interespecífica media entre <i>B. henni- Brycon sp.</i> (Mín. – Máx.)	0,0338 (0,0 - 0,0806)	0,0112 (0,0-0,0326)	0,0071 (0,0 - 0,0212)
Distancia interespecífica media entre <i>Brycon sp.- B. caucanus</i> . (Mín. – Máx.)	0,0781 (0,0 - 0,2203)	0,0290 (0,0-0,0835)	0,0346 (0,0 - 0,0964)
Distancia interespecífica media entre <i>Brycon sp.- Creagrutus sp.</i> (Mín. – Máx.)	0,1037 (0,0 - 0,2008)	0,0360 (0,0 – 0,0719)	0,0459 (0,0 - 0,0951)

En la secuenciación de ADN para la Región COI se generaron 657 pares de bases de los cuales presentó 165 (25,1 %) sitios variables (Tabla 2-7), se encontraron 22 haplotipos totales de 39 secuencias (Tabla 2-8), en la red de haplotipos se observan cuatro grupos de haplotipos separados por 20, 20 y 40 pasos mutacionales respectivamente. Esta región mitocondrial es la que tuvo un mayor número de sitios variables. El haplogrupo 1, lo compone el tipo *Brycon henni* (n=16, 72,73 %) fue el más representativo con respecto al

haplogrupo 2 de tipo *Brycon sp.* (n=3, 13,64), haplogrupo 3 de tipo *Bryconamericus caucanus* (n=2; 9,1 %) y al haplogrupo 4 de tipo *Creagrutus sp.* (n=1; 4,5%). En el primer haplogrupo se obtuvieron tres grupos (h1, h2 y h16) que son una combinación de individuos de las zonas geográficas de Sonso, Guabas y Yotoco, el resto corresponden a haplotipos individuales, el segundo haplogrupo abarcó dos grupos (h18 y h19) y un haplotipo individual (h17), individuos de la zona geográfica de Sabaletas-Buenaventura, el tercer haplogrupo contenía dos haplotipos individuales (h20 y h21) y al cuarto haplogrupo pertenece un solo grupo (h22) (Tabla 2-8 y Figura 2-4-a).

Para la región 16S se obtuvieron 584 pares de bases, 60 (10,3 %) fueron sitios variables (Tabla 2-7), en la red de haplotipos se observó que presenta una estructura similar a la región COI, pero con un menor número de haplotipos (siete haplotipos) de 39 secuencias (Tabla 2-8) y los mismos cuatro haplogrupos separados por 14, 7 y 14 pasos mutacionales, se observó que es el marcador más conservado, ya que presenta el menor porcentaje en los sitios variables. El haplogrupo 1 lo compone el tipo *Brycon henni* (n=2; 28,57 %), el haplotipo (h1) está compuesto por un grupo, siendo el más representativo abarca los sitios geográficos: Sonso, Guabas y Yotoco, en tanto que el haplotipo (h2) es individual, el haplogrupo 2 de tipo *Brycon sp.* (n=2; 28,57 %) está compuesto por dos grupos (h3 y h4) individuos de la zona geográfica de Sabaletas-Buenaventura; el haplogrupo 3, por dos haplotipos individuales (h5 y h6) de tipo *Bryconamericus caucanus* (n= 2; 28,57%), y el haplogrupo 4 de tipo *Creagrutus sp.* (n=1; 14,29%), por un grupo (h7) (Tabla 2-8 y Figura 2-4-b).

La Región RAG1 cuenta con un total de 1404 pares de bases, de los cuales 194 (13,82 %) presentaron variaciones (Tabla 2-7) un total de 22 haplotipos de 33 secuencias (Tabla 2-8) y cuatro haplogrupos separados por 15, 107 y 52 pasos mutacionales, se observa una estructura similar comparado con las regiones mitocondriales; el primer haplogrupo lo representa el tipo *Brycon henni* (n=8; 36,36%), con tres grupos (h1, h3 y h5), en el haplotipo h1 se observa una combinación de individuos de las zonas geográficas de Guabas, Sonso y Yotoco, y el resto con haplotipos monofiléticos (h2, h4, h6, h7 y h8); el segundo haplogrupo es el tipo *Brycon sp.* (n=8; 36,36%), conformado por haplotipos individuales de la zona geográfica de Sabaletas-Buenaventura (h9, h10, h11, h12, h13, h14, h15 y h16); el tercer haplogrupo de tipo *Bryconamericus caucanus* (n=2; 9,1%), compuesto por los

haplotipos individuales (h17 y h18), y el cuarto haplogrupo está compuesto por el tipo *Creagrutus sp.* (n=4; 18,2%), con los haplotipos individuales (h19, h20, h21 y h22) (Tabla 2-8 y Figura 2-4-c).

Tabla 2-8: Lista de haplotipos de *Brycon henni*, *Bryconamericus caucanus*, *Brycon sp.* y *Creagrutus sp.*, obtenidos del análisis estadístico de parsimonia (TCS) para las secuencias parciales de COI, 16S y RAG1.

LOCUS COI		
Haplotipo	Cantidad	Individuo
h1-Bhenni	4	Bhenni11 Bhenni14 Bhenni37 Bhenni39
h2-Bhenni	3	Bhenni10 Bhenni2 Bhenni40
h3-Bhenni	1	Bhenni7
h4-Bhenni	1	Bhenni38
h5-Bhenni	1	Bhenni1
h6-Bhenni	1	Bhenni9
h7-Bhenni	1	Bhenni17
h8-Bhenni	1	Bhenni18
h9-Bhenni	1	Bhenni31
h10-Bhenni	1	Bhenni19
h11-Bhenni	1	Bhenni8
h12-Bhenni	1	Bhenni4
h13-Bhenni	1	Bhenni6
h14-Bhenni	1	Bhenni5
h15-Bhenni	1	Bhenni12
h16-Bhenni	3	Bhenni16 Bhenni20 Bhenni3
h17- <i>Brycon</i>	1	<i>Brycon</i> 25
h18- <i>Brycon</i>	5	<i>Brycon</i> 21 <i>Brycon</i> 26 <i>Brycon</i> 27 <i>Brycon</i> 29 <i>Brycon</i> 30
h19- <i>Brycon</i>	3	<i>Brycon</i> 22 <i>Brycon</i> 23 <i>Brycon</i> 24
h20-Bcauca	1	Bcauca13
h21-Bcauca	1	Bcauca15
h22-Creag	5	Creag32 Creag33 Creag34 Creag35 Creag36

- 60 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

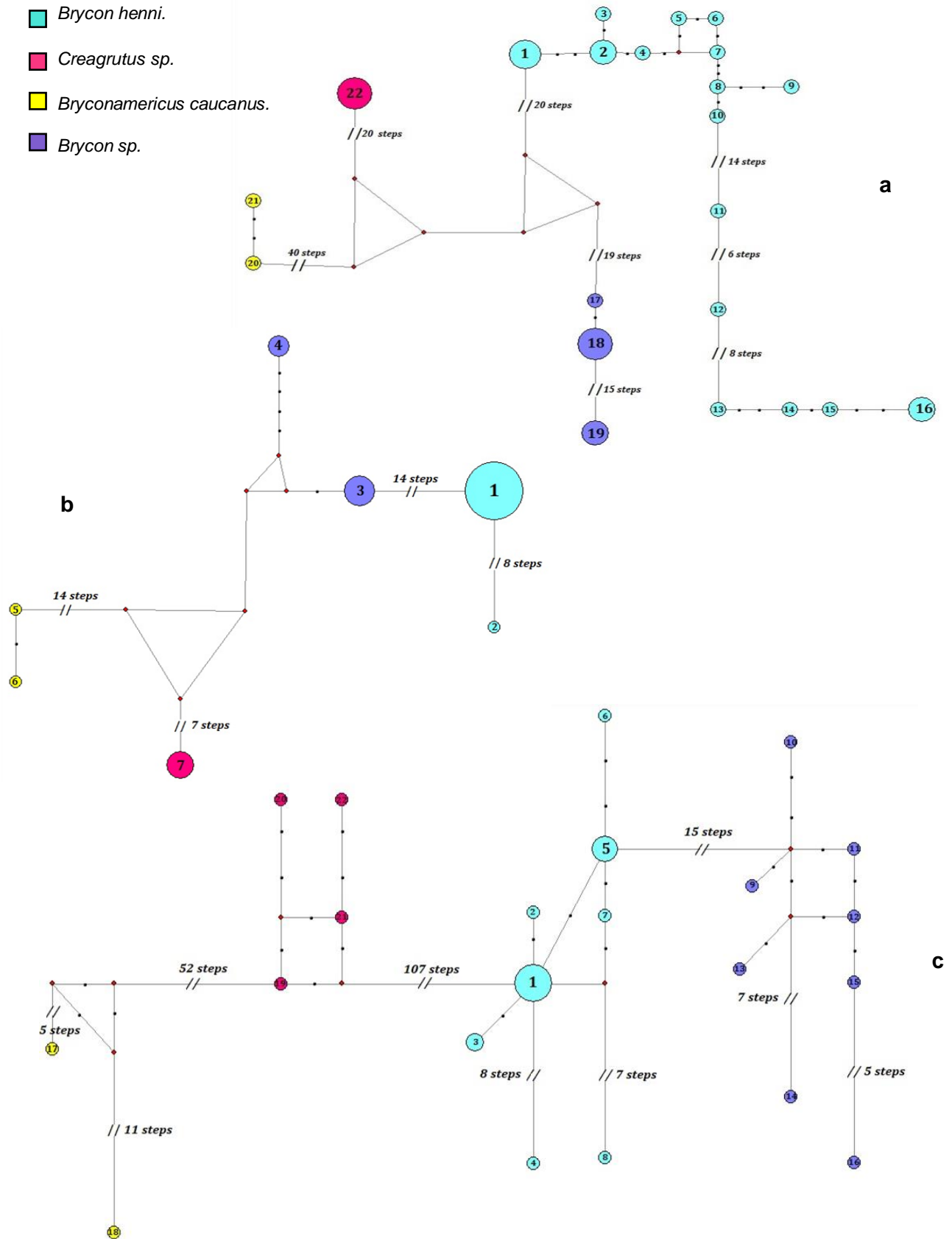
Tabla 2-8: (Continuación)

LOCUS 16S		
Haplotipo	Cantidad	Individuo
h1-Bhenni	22	Bhenni1 <i>Brycon</i> 10 Bhenni11 Bhenni12 Bhenni14 Bhenni16 Bhenni17 Bhenni19 Bhenni2 Bhenni20 Bhenni3 Bhenni31 Bhenni37 Bhenni38 Bhenni39 Bhenni4 Bhenni40 Bhenni5 Bhenni6 Bhenni7 Bhenni8 Bhenni9
h2-Bhenni	1	Bhenni18
h3- <i>Brycon</i>	6	<i>Brycon</i> 21 <i>Brycon</i> 25 <i>Brycon</i> 26 <i>Brycon</i> 27 <i>Brycon</i> 28 <i>Brycon</i> 30
h4- <i>Brycon</i>	3	<i>Brycon</i> 22 <i>Brycon</i> 23 <i>Brycon</i> 24
h5-Bcauca	1	Bcauca15
h6- Bcauca	1	Bcauca13
h7-Creag	5	Creag32 Creag33 Creag34 Creag35 Creag36
LOCUS RAG1		
Haplotipo	Cantidad	Individuo
h1-Bhenni	8	Bhenni12 Bhenni1 Bhenni20 Bhenni2 Bhenni37 Bhenni39 Bhenni5 Bhenni8
h2-Bhenni	1	Bhenni10
h3-Bhenni	2	Bhenni18 Bhenni19
h4-Bhenni	1	Bhenni31
h5-Bhenni	4	Bhenni11 Bhenni14 Bhenni16 Bhenni3
h6-Bhenni	1	Bhenni40
h7-Bhenni	1	Bhenni17
h8-Bhenni	1	Bhenni7
h9- <i>Brycon</i>	1	<i>Brycon</i> 25
h10- <i>Brycon</i>	1	<i>Brycon</i> 24
h11- <i>Brycon</i>	1	<i>Brycon</i> 26
h12- <i>Brycon</i>	1	<i>Brycon</i> 28
h13- <i>Brycon</i>	1	<i>Brycon</i> 23
h14- <i>Brycon</i>	1	<i>Brycon</i> 30
h15- <i>Brycon</i>	1	<i>Brycon</i> 21

Tabla 2-8: (Continuación)

h16- <i>Brycon</i>	1	<i>Brycon</i> 22
h17-Bcauca	1	Bcauca13
h18-Bcauca	1	Bcauca15
h19-Creag	1	Creag32
h20-Creag	1	Creag34
h21-Creag	1	Creag35
h22-Creag	1	Creag36

Figura 2-4: Red de haplotipos para las regiones a) COI, b) 16S y c) RAG1.



Los marcadores que presentan mayor variabilidad genética fueron COI y RAG1 con 22 haplotipos diferentes para cada región (Tabla 2-8).

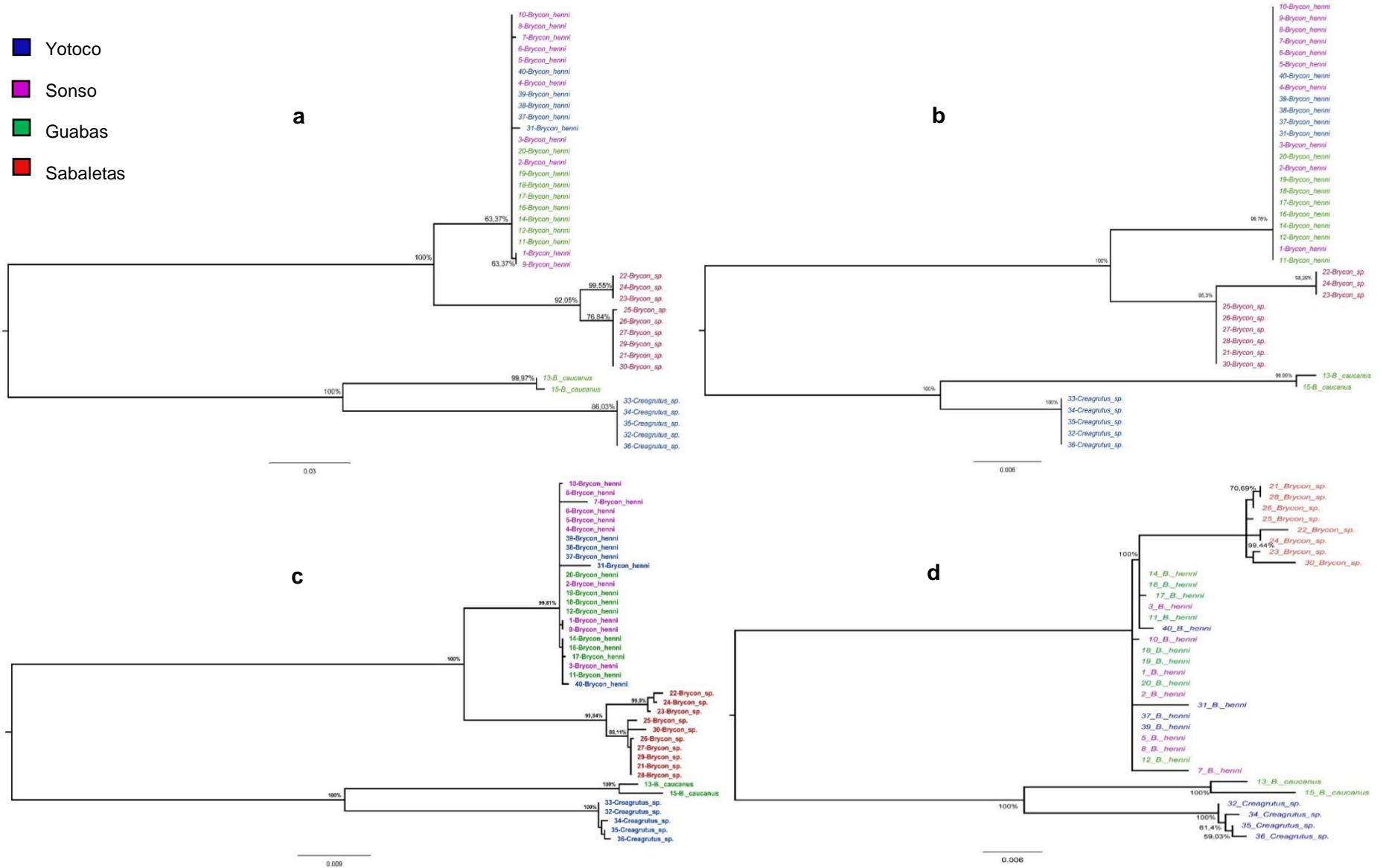
En el dendrograma obtenido a partir del método NJ para la región mitocondrial COI se observaron dos grandes grupos que presentan un soporte alto (100 %), en el primer grupo se evidencian dos subgrupos; en el primer subgrupo se agrupan individuos de la especie *B. henni* de tres zonas geográficas cercanas que son: Guacarí-río Sonso (Violeta), Ginebra-río Guabas (verde) y río Yotoco (azul), donde se indica que hay flujo genético entre estas poblaciones. En el segundo subgrupo están los individuos de la especie *Brycon sp.* colectados en el río Sabaletas-Buenaventura (rojo), con un porcentaje de *bootstrap* de 92,05 %; y para el grupo externo o segundo grupo con un porcentaje de *bootstrap* de 100 se observa que se agrupan en el tercer clado los individuos de la especie *Bryconamericus caucanus* (verde) colectados en Guabas y en el cuarto clado los individuos de la especie *Creagrutus sp.* (azul) de Yotoco (Figura 2-5-a).

En el caso del fragmento 16S, en el dendrograma originado se observó la ocurrencia de dos grupos evidentemente diferenciados, se destaca que en el primer grupo hay una división cercana entre *Brycon henni* y *Brycon sp.* y la distinción entre *Brycon henni* y *Creagrutus sp.* (Figura 2-5-b).

El dendrograma resultante de las secuencias de la región nuclear RAG1, de igual forma, establece la diferencia de los mismos dos grupos analizados en los anteriores dendrogramas, la mayor distinción para las especies *Brycon henni* y *Creagrutus sp.* y una cercanía entre *Brycon henni* y *Brycon sp.* dentro del primer grupo (Figura 2-5-c).

Con relación al dendrograma estimado a partir de los tres fragmentos, y en lo que se refiere al análisis molecular de la especie *Brycon henni*, se observaron estructuras similares, donde se identifican dos grupos en los tres marcadores; en el primer grupo se observan dos subgrupos compuestos por las especies: *Brycon henni*, individuos provenientes de las zonas geográficas de Yotoco, Sonso y Guabas y *Brycon sp.* especímenes colectados de Sabaletas-Buenaventura. Finalmente, se contempla el segundo grupo donde se reúnen los dos grupos externos constituidos por dos subgrupos pertenecientes a las especies *Bryconamericus caucanus* procedentes del río Guabas y *Creagrutus sp.* colectados en el río Yotoco (Figura 2-5-d).

Figura 2-5: Árboles generados por el método de Neighbor-Joining, empleando las distancias de K2P (Kimura, 1980), con base en las secuencias de las regiones: a) COI, b) 16S, c) RAG1 y d) Datos combinados (COI-16S-RAG1).



2.6 Discusión

Colombia cuenta con las vertientes Pacífico, Caribe, Orinoco y Amazonas. Alrededor de las cuencas hidrográficas de la vertiente del Caribe habita aproximadamente el 70 % de la población; los ríos Cauca y Magdalena son los más importantes (Gualdrón, 2016).

Los individuos colectados en esta investigación provienen de tres ríos, tributarios del río Cauca, por el margen derecho están los ríos Sonso y Guabas; en el costado izquierdo, el río Yotoco y el cuarto río, el río Sabaletas que es tributario del río Anchicaya, ubicado en el municipio de Buenaventura, pertenece a la vertiente del Pacífico.

En esta investigación el código de barras utilizado en las regiones COI, 16S y RAG1 fue eficiente para la identificación de las especies de peces *Brycon henni*, *Brycon sp.*, *Bryconamericus caucanus* y *Creagrutus sp.* con lo que se demostró su pertinencia, asimismo se apoya en que la comunidad FISH-BOL presenta un código de barras para el gen de la subunidad I del Citocromo C Oxidasa (COI); de las 31 000 especies de peces reconocidas se han identificado alrededor de 8000, aproximadamente el 98 % para especies marinas y el 93 % de agua dulce, son distinguibles por código de barras (Ward, 2012). Los investigadores Landínez-García, Alzate y Márquez (2014) reportaron el genoma mitocondrial completo que abarca 16 885 pares de bases para la especie *B. henni*.

En un análisis filogenético con el gen 16S para los géneros *Brycon* y *Henochilus*, los resultados mostraron que el género *Brycon* es parafilético, *Henochilus* es el grupo hermano de *B. ferox* y *B. insignis* y las especies más basales analizadas fueron las especies transandinas *B. henni*, *B. petrosus* y *B. chagrensis* (Hilsdorf *et al.*, 2008). Otro estudio de filogenética molecular usando el gen COI en el Complejo de Midas cichlidae en peces que habitan lagos y lagunas de Nicaragua, Páiz-Medina y Huete-Pérez (2012) determinaron que en estos cuerpos de agua se encuentran varias especies de *Midas cichlidae*, en tanto que el gen discriminó las especies de las diversas lagunas, para las relaciones entre estas se concluyó que se requiere el uso de más genes para tener resultados más específicos.

Para esta investigación se emplearon las regiones mitocondriales COI y 16S, con lo que se obtuvo una mayor información con la región COI, que presentan un porcentaje del 100 en el éxito de la secuenciación, más polimorfismo y una mayor información en la red de haplotipos, con ello se confirma la utilización de este marcador como código de barras

empleado en múltiples estudios de peces, por ejemplo, Mohanty *et al.* (2015) expusieron que el gen COI es más útil que 16S rRNA para el código de barras de ADN de carpas indias, argumentando que el marcador de código de barras estándar, COI, identificó especies de carpas cultivables, en cambio, 16S rRNA no logró hacerlo completamente por los bajos niveles de divergencias genéticas. En Taiwán Bingpeng *et al.* (2018) emplearon el código de barras de ADN (COI) para la identificación de especies de peces, donde concluyen la alta eficacia de la técnica. En Brasil en las cuencas altas de los ríos Munim y Preguiças se identifica una nueva especie de *Hyphessobrycon* con la metodología de código de barras (Guimarães *et al.*, 2018). En aguas marinas de China por medio de código de barras Zhang, Zhang, Zhang, y Gao, en 2013, identificaron y diferenciaron ocho especies pertenecientes a cuatro subgéneros diferentes del género *Sebastes*. En un análisis filogenético de ADN para los genes 16S, COI, MYH6 y el intrón S72 se determinó que las especies de Bryconinae en el sureste de Brasil son monofiléticas (Travenzoli *et al.*, 2015). En la investigación sobre códigos de barras de ADN de Rosy Tetras y especies relacionadas (Characiformes: Characidae: *Hyphessobrycon*) de la cuenca amazónica brasileña, no hubo un diagnóstico completo, pero descubrieron unidades evolutivas distintas en ciertas especies de *Hyphessobrycon*, también observaron el intercambio de haplotipos entre diferentes especies (Castro *et al.*, 2014). En el análisis de la filogenia molecular mediante el gen COI para *Siluriformes*, revelaron que este marcador molecular fue altamente efectivo para evaluar la relación evolutiva de cada especie en peces Siluriformes (Indu *et al.*, 2012).

En este estudio la región nuclear RAG1 evidenció los menores porcentajes en cuanto al éxito de la amplificación y la secuenciación de 87,5 y 94,3 respectivamente, es importante destacar que para la amplificación (PCR anidada) se utiliza una mayor cantidad de técnicas y por ende materiales, en la red de haplotipos se observó un número sobresaliente de haplotipos que los identificados con el gen COI, pero con aportes diferentes en cuanto a la estructura de los grupos, también fue útil para la corroboración en la identificación por medio de Blast de los individuos (*Brycon sp.*) colectados en el río Sabaletas. Con lo anterior se constata la utilidad de la región nuclear RAG1 para identificación de peces, algunas investigaciones como la de Bufalino y Mayden (2010) describen que el análisis de las secuencias de ADN nuclear RAG1 y S7 para evaluar las relaciones filogenéticas de *Phoxinus* en América del Norte mostraron que hubo un alto grado de variabilidad topológica similar a varios estudios con ADN mitocondrial.

En otro análisis filogenético de bagres usando secuencias de genes nucleares RAG1 y RAG2 Sullivan, Lundberg y Hardman (2006) confirman la monofilia de Siluriformes. Los *Loricarioidei* sudamericanos se recuperan como el grupo hermano de otros bagres que se dividen en Diplomystidae y Siluroidei, antecedente que indica que estos marcadores moleculares son efectivos para detallar las relaciones filogenéticas.

Múltiples investigaciones develan la importancia de utilizar los dos tipos de regiones, tanto mitocondriales como nucleares, como es el caso de un estudio sobre especies de peces del grupo *Stellifer* (Sciaenidae, Perciformes) del Atlántico sur occidental basado en genes mitocondriales (16S rRNA y COI) y nucleares (Rodopsina, TMO-4C4, RAG-1), Barbosa, *et al.* (2014) presentaron la filogenia molecular más completa producida para el género *Stellifer*, los análisis encontraron relaciones cercanas entre los taxones del grupo, así como dos linajes distintos de *Stellifer*. Además, se halló una marcada diferenciación genética entre las poblaciones de *O. punctatissimus* del norte y sur de Brasil; igualmente, Cramer, Bonatt y Reis (2011), en una investigación para el análisis de la filogenia molecular de Neoplecostominae e Hypoptopomatinae aplicaron los genes COI, RAG1 y RAG2 y F-Reticulon 4 y determinaron que Hypoptopomatini, Otothyri y Neoplecostominae y varios géneros ricos en especies, no eran monofiléticos, además, Oliveira *et al.* (2011) estudiaron las relaciones filogenéticas dentro de la familia *Characidae* basadas en genes mitocondriales (16S rRNA, Cytb) y nucleares (Myh6, RAG1, RAG2), donde señalaron un nuevo marco filogenético para un grupo especial, morfológicamente diverso de peces de agua dulce de importancia ecológica y evolutiva significativa en todo el Neotrópico y partes de África.

La red de haplotipos señaló una disimilitud genética entre las poblaciones de *Brycon sp.* capturados en el río Sabaletas con las poblaciones de los ríos de Yotoco, Guabas y Sonso para la especie *Brycon henni*, también se observó el conjunto de especies externas que corresponden a *Bryconamericus caucanus* y *Creagrutus sp.* Estudios recientes con especies de peces *Brycon*, como es el caso de Arruda *et al.* (2019), evidenciaron que cuando hay diferenciación geográfica de las poblaciones, también se presenta diferencias entre los haplotipos, así las cosas, confirmaron que las distancias moleculares entre pares de haplotipos de diferentes cuencas hidrográficas son mucho mayores que las registradas dentro de una región.

Con la metodología de NJ para las regiones mitocondriales (COI y 16S) como para la nuclear (RAG1) se observó que se presentaron dos grandes grupos, en el primer grupo se identificó dos clados; el primer clado correspondió para los individuos colectados en los ríos de Sonso, Yotoco y Guabas concerniente a la especie *B. henni* de acuerdo con la alineación en BLAST y el segundo clado, para los especímenes capturados en el río Sabaletas y se le designó como *Brycon sp.* ya que en la alineación por medio de BLAST no se obtuvo resultados concluyentes en las tres regiones utilizadas. En el segundo grupo se identificaron dos clados que equivalieron a dos especies que se identificaron como *Bryconamericus caucanus* y *Creagrutus sp.* colectadas en los ríos Guabas y Yotoco respectivamente, estas especies se incluyeron en el análisis como grupos externos. Estos resultados son similares a los de Abe *et al.* (2014) donde encontraron que *Bryconidae* está compuesto por cinco clados principales, incluidos los géneros *Brycon*, *Chilobrycon*, *Henochilus* y *Salminus*, sus resultados apuntan a una posible invasión antigua de América Central, para explicar la ocurrencia de *Brycon* allí, sugiriendo una nueva reorganización de sus géneros. De igual forma los expertos Ashikaga *et al.* (2015) indicaron que la especie *Brycon orbignyanus*, en peligro de extinción, estaba estructurada en diferentes subpoblaciones en la cuenca del río La Plata, además, en las zonas con mejores condiciones ambientales, mostró subgrupos con mayores tasas de variabilidad genética, igualmente Pereira *et al.* (2013) identificaron correctamente 252 especies de peces de agua dulce neotropical a través de secuencias de código de barras y en contraste, 14 especies exhibieron distancias K2P intraespecíficas que excedieron el 2 %, al dividirse en dos a seis subgrupos en el dendrograma de Unión de Vecinos (NJ).

2.7 Conclusiones

- La técnica de código de barras basada en secuencias de las regiones COI, 16S y RAG1 demostraron su eficiencia para este estudio de identificación de las especies *Brycon henni*, *Brycon sp.*, *Bryconamericus caucanus* y *Creagrutus sp.*
- La especie *B. henni* fue caracterizada en tres sitios geográficamente cercanos: el río Sonso, río Yotoco y río Guabas, donde se observó por medio del dendrograma de Unión de Vecinos y la red de haplotipos un continuo flujo génico entre tales grupos de individuos. Se determinó, además, que los individuos provenientes del río sabaletas-Buenaventura, identificados como *Brycon sp.*, son diferentes a los

individuos procedentes de los ríos Yotoco, Guabas y Sonso identificados como *B. henni*, de otra parte, como grupos externos, se observó la presencia de la especie *Bryconamericus caucanus* en el río Guabas y la especie *Creagrutus sp.* en el río Yotoco.

- Se demostró por medio de los genes COI y RAG1 una alta diversidad haplotípica, que se evidenció en los 22 haplotipos, pero con estructuras diferentes.

2.8 Recomendaciones

Continuar con la investigación para la identificación de los individuos de *Brycon sp.* en el río Sabaletas-Buenaventura con el fin de llevar a cabo una caracterización completa y detallada de la especie, por medio de técnicas moleculares como las realizadas en el presente estudio, para obtener una base amplia de su diversidad genética o genotipado por secuenciación que permite analizar varias muestras de ADN simultáneamente.

2.9 Bibliografía

- Abe, K. T., Mariguela, T. C., Avelino, G. S., Foresti, F., y Oliveira, C. (2014). Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 152. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-152>
- Akram, S., Arshan, K. M. L., y Abdul, J. H. (2017). DNA barcoding and phylogenetic analysis of five ascidians (Phlebobranchia) distributed in Gulf of Mannar, India. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 29(4), 581–586. <https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1325479>
- Arruda, P. S., Ferreira, D. C., Oliveira, C., y Venere, P. C. (2019). DNA barcoding reveals high levels of divergence among mitochondrial lineages of Brycon (Characiformes, bryconidae). *Genes*, 10(9), 639. <https://doi.org/10.3390/genes10090639>
- Ashikaga, F. Y., Orsi, M. L., Oliveira, C., Senhorini, J. A., y Foresti, F. (2015). The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. *Environmental Biology of Fishes*, 2015, 1845–1855. <https://doi.org/10.1007/s10641-015-0402-8>
- Barbosa Barreto, A. J., Sampaio, I., Schneider, H., y Santos, S. (2014). Molecular phylogeny of weakfish species of the *Stellifer* group (Sciaenidae, Perciformes) of the western South Atlantic based on mitochondrial and nuclear data. *PLoS ONE*, 9(7), e102250.

- 72 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas
-

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102250>
- Bardakci, F., y Skibinski, D. O. (1994). Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73(2), 117–123. <https://doi.org/10.1038/hdy.1994.110>
- Bingpeng, X., Heshan, L., Zhilan, Z., Chunguang, W., Yanguo, W., y Jianjun, W. (2018). Dna barcoding for identification of fish species in the taiwan strait. *PLoS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198109>
- Botero-Botero, A., y Ramírez-Castro, H. (2011). Ecología trófica de la sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae) en el río Portugal de Piedras, Alto Cauca, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 16(1), 2349–2355.
- Brown, K., y Vénte, H., (2008). Formulación del Diagnóstico Participativo en el Territorio Colectivo del Consejo Comunitario de Sabaletas, Bogotá y La Loma (Anteproyecto). Instituto técnico agrícola establecimiento público de educación superior especialización técnica profesional en Agroecología Guadalajara de Buga. <http://www.gipag.org/archivos/sabaletas.pdf>
- Bufalino, A. P., y Mayden, R. L. (2010). Molecular phylogenetics of North American phoxinins (Actinopterygii: Cypriniformes: Leuciscidae) based on RAG1 and S7 nuclear DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(1), 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.12.017>
- Builes, J., y Urán, A. (1974). Estudio del ciclo sexual de la sabaleta *Brycon henni* Eigenmann. Su comportamiento y fecundación artificial. *Actualidades Biológicas*, 7(3), 2–12.
- Castro Paz, F. P., Da Silva Batista, J., y Rebelo Porto, J. I. (2014). DNA barcodes of rosy tetras and allied species (Characiformes: Characidae: Hyphessobrycon) from the Brazilian Amazon basin. *PLoS ONE*, 9(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098603>
- Center, C. S. H. L. DNA Learning (2014). *Using DNA Barcodes to Identify and Classify Living Things*. <https://dnabarcoding101.org/files/using-dna-barcodes.pdf>
- Chandra, A., y Idrisova, A. (2011). Convention on Biological Diversity: a review of national challenges and opportunities for implementation. *Biodiversity and Conservation*, 20(14), 3295-3316.
- Chang, C. H., Shao, K. T., Lin, H. Y., Chiu, Y. C., Lee, M. Y., Liu, S. H., y Lin, P. L. (2017). DNA barcodes of the native ray-finned fishes in Taiwan. *Molecular Ecology Resources*,

- 17(4), 796–805. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12601>
- Clement, M., Posada, D., y Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657–1659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Cramer, C. A., Bonatto, S. L., y Reis, R. E. (2011). Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.01.002>
- CVC y Universidad del Valle. (2001). Caracterización de la calidad del agua del río Cauca y sus tributarios. Capítulo 6. 94-95. <http://www.cvc.gov.co/cvc/Mosaic/dpdf1/volumen6/6-caracterizacioncartrcv6f1.pdf>.
- Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (2014). *Definir los criterios e identificar cartográficamente las áreas estratégicas para el abastecimiento hídrico en los municipios del Valle del Cauca*. http://asamblea.valledelcauca.gov.co/info/tmp/P.O._001-2018_Ene.24__Anexo_Areas_Estrategicas_CVC.pdf
- Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (2014a). *Audiencia pública ambiental de seguimiento al plan de acción 2012-2015 y rendición de cuentas 2013*. <https://www.cvc.gov.co/sites/default/files/2018-07/Informe%20Audiencias%20Publicas%202013%20DAR%20Centro%20Sur.pdf>
- Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (2019). *Formulación del plan de ordenación y manejo de la subzona hidrográfica 2631: Arroyohondo, Yumbo, Mulaló, Vijes, Yotoco, Mediacanoa y Piedras*. https://www.cvc.gov.co/sites/default/files/2019-11/P19_%20Documento%20POMCA%20formulado.pdf
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Esquivel, M. A., Merino, M. ., Restrepo, J., Narváez, A., Polo, C., Plata, J., y Puentes, V. (2014). *Estado de la pesca y la acuicultura en Colombia*. Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP).
- Gong, S., Ding, Y., Wang, Y., Jiang, G., y Zhu, C. (2018). Advances in DNA barcoding of Toxic Marine Organisms. In *International journal of molecular sciences*, (Vol. 19, Issue 10, p. 2931). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19102931>
- Gualdrón Durán, L. E. (2016). Evaluación de la calidad de agua de ríos de Colombia usando

74 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

- parámetros físicoquímicos y biológicos. *Revista Dinámica Ambiental*, 1, 83–102. <https://doi.org/10.18041/2590-6704/ambiental.1.2016.4593>
- Guimarães, E. C., De Brito, P. S., Feitosa, L. M., Carvalho-Costa, L. F., y Ottoni, F. P. (2018). A new species of *Hyphessobrycon* Durbin from northeastern Brazil: Evidence from morphological data and DNA barcoding (Characiformes, Characidae). *ZooKeys*, 2018(765), 79–101. <https://doi.org/10.3897/zookeys.765.23157>
- Hebert, P., y Gregory, T. R. (2005). The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852–859. <https://doi.org/10.1080/10635150500354886>
- Hilsdorf, A. W. S., Oliveira, C., Thadeo de Lima, F. C., y Kayoko Matsumoto, C. (2008). A phylogenetic analysis of *Brycon* and *Henochilus* (Characiformes, Characidae, Bryconinae) based on the mitochondrial gene 16S rRNA. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 366–371. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000200034>
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., Burrige, M., Watkinson, D., Dumont, P., Curry, A., Bentzen, P., Zhang, J., April, J., y Bernatchez, L. (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS One*, 3(6), e2490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002490>
- Hurtado-Alarcón, J. C., Mancera-Rodríguez, N. J., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2011). Variabilidad genética de *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en la cuenca media de los ríos Nare y Guatapé, sistema río Magdalena, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 59(1), 269–282. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442011000100023&script=sci_arttext
- Indu, M., Ambili, T. R., y Manimekalan, A. (2012). In silico analysis of the molecular phylogeny of Siluriformes inferred from mitochondrial CO1 gene. *International Journal of Advanced Life Sciences*, 5(1), 71–78. <http://ijals.com/wp-content/uploads/2012/12/8.-In-silico-analysis-of-the-molecular-phylogeny-Ambili.pdf>
- Jiménez-Segura, L. F., Restrepo-Santamaría, D., López-Casas, S., Delgado, J., Valderrama, M., Álvarez, J., y Gómez, D. (2014). Ictiofauna y desarrollo del sector hidroeléctrico en la cuenca del río Magdalena-Cauca, Colombia. *Biota Colombiana*, 15(2), 3–25. http://repository.humboldt.org.co/bitstream/handle/20.500.11761/9452/Biota_152_Em_balses_y_rios_regulados_Jul-dic-2014_Baja_2_p5-27.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Kerr, K. C. R., Stoeckle, M. Y., Dove, C. J., Weigt, L. A., Francis, C. M., y Hebert, P. D. N. (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular*

- Ecology Notes*, 7(4), 535–543. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01670.x>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Landínez-García, R. M., Alzate, J. F., y Márquez, E. J. (2014). Complete mitogenome of the neotropical fish *Brycon henni*, Eigenmann 1913 (Characiformes, Bryconidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(3), 2259–2260. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.984170>
- Lenis, G. A., Restrepo, L. F., y Cruz-Casallas, P. E. (2009). Evaluación de tres protocolos de tratamiento hormonal sobre el diámetro de ovocitos de sabaleta *Brycon henni*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(2), 131–142.
- Li, C., y Ortí, G. (2007). Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(1), 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.10.030>
- Maldonado-Ocampo, J. A., Ortega-Lara, A., Usma Oviedo, J. S., Galvis Vergara, G., Villanavarró, F. A., Vásquez Gamboa, L., Prada-Pedrerós, S., Ardila Rodríguez, C., y Calle V., J. C. (2005). *Peces de los Andes de Colombia*. Instituto Humboldt Colombia.
- Mohanty, M., Jayasankar, P., Sahoo, L., y Das, P. (2015). A comparative study of COI and 16S rRNA genes for DNA barcoding of cultivable carps in India. *Mitochondrial DNA*, 26(1), 79–87. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.823172>
- Mojica, J. I., Usma, J. S., Álvarez-León, R., y Lasso, C. A. (Eds). (2012). *Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia 2012*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales.
- Montoya López, A. F., Carrillo, L. M., y Olivera Ángel, M. (2006). Algunos aspectos biológicos y del manejo en cautiverio de la sabaleta *Brycon henni* Eigenmann, 1913 (Pisces : Characidae). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2), 180–186.
- Moreno, L. T. (2018). La Pesca e los Pescadores Artesanales en Colombia. *PEGADA - A Revista Da Geografia Do Trabalho*, 19(2). <https://doi.org/10.33026/peg.v19i2.5514>
- Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguela, T. C., Benine, R. C., Ortí, G., Vari, R. P., y Corrêa e Castro, R. M. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family

- Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 275. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-275>
- Páiz-Medina, L., y Huete-Pérez, J. (2012). Filogenética molecular de peces del complejo Midas Cichlidae que habitan lagos y lagunas de Nicaragua, utilizando el gen COI. *Encuentro*, 93, 101–116. <https://doi.org/10.5377/encuentro.v0i93.913>
- Palumbi. (1996). Nucleic Acids II : The Polymerase Chain Reaction. *Molecular Systematics*, 205-247.
- Pavlova, A., Beheregaray, L. B., Coleman, R., Gilligan, D., Harrisson, K. A., Ingram, B. A., Kearns, J., Lamb, A. M., Lintermans, M., Lyon, J., Nguyen, T. T. T., Sasaki, M., Tonkin, Z., Yen, J. D. L., y Sunnucks, P. (2017). Severe consequences of habitat fragmentation on genetic diversity of an endangered Australian freshwater fish: A call for assisted gene flow. *Evolutionary Applications*, 10, 531–550. <https://doi.org/10.1111/eva.12484>
- Paz, A., Gonzalez, M., y Crawford, A. J. (2011). DNA Barcode of Life: An Introduction and Perspective. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161–176. <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319027888011.pdf>
- Pereira, L. H., Hanner, R., Foresti, F., y Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20>
- Schmitz, A., y Riesner, D. (2006). Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry*, 354(2), 311–313. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.014>
- Sullivan, J. P., Lundberg, J. G., y Hardman, M. (2006). A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(3), 636–662. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.044>
- Templeton, A. R. (2004). Using haplotype trees for phylogeographic and species inference in fish populations. *Environmental Biology of Fishes*, 69, 7–20. <https://doi.org/10.1023/B:EBFI.0000022870.76912.0c>
- Tognelli, M. F., Lasso, C. A., Bota-Sierra, C. A., Jiménez-Segura, L. F., Cox, N. A., y (Editores). (2016). Estado de conservación y distribución de la biodiversidad de agua dulce en los Andes tropicales. En *Estado de conservación y distribución de la biodiversidad de agua dulce en los andes tropicales*. Gland, Suiza, Cambridge, UK y

- Arlington, USA: UICN. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2016.02.es>
- Travanzoli, N. M., Silva, P. C., Santos, U., Zanuncio, J. C., Oliveira, C., y Dergam, J. A. (2015). Cytogenetic and Molecular Data Demonstrate that the Bryconinae (Ostariophysi, Bryconidae) Species from Southeastern Brazil Form a Phylogenetic and Phylogeographic Unit. *Plos ONE*, 10(9), e0137843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137843>
- Ward, R. D. (2012). FISH-BOL, A Case Study for DNA Barcodes. In: Kress W., Erickson D. (eds) DNA Barcodes. In *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (Vol. 858, pp. 423–439). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_21
- Ward, Robert D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., y Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847–1857. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- Zapata-Restrepo, L. M., Orozco-Jiménez, L. Y., Rueda-Cardona, M., Echavarría, S. L., Mena-Moreno, N., y Palacio-Baena, J. A. (2017). Evaluación genotóxica del agua del río Grande (Antioquia, Colombia) mediante frecuencia de eritrocitos micronucleados de *Brycon henni* (Characiformes: Characidae). *Revista de Biología Tropical*, 65(1), 405-414.
- Zhang, H., Zhang, Y., Zhang, Z., y Gao, T. (2013). DNA barcodes of eight species in genus *Sebastes*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 48, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.11.012>
- Zhang, J., y Hanner, R. (2012). Molecular approach to the identification of fish in the South China Sea. *PLoS ONE*, 7(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.003062>

3. Capítulo 3. Caracterización morfométrica de la especie *Brycon henni* en las cuencas hidrográficas de Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas

3.1 Resumen

La especie *Brycon henni* es endémica de Colombia, tiene importancia para las comunidades ribereñas dado que les aporta a la subsistencia y a la pesca deportiva. Debido al impacto social y económico el objetivo de este estudio fue realizar un análisis morfogeométrico de la especie *Brycon henni* presentes en las cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas, del Valle del Cauca. Los resultados por medio de análisis multivariados (Análisis de componentes principales-PCA, Análisis de Variantes Canónicas-CVA , Regresión Múltiple) indicaron la presencia de cuatro grupos de acuerdo con las especies identificadas tales como *Brycon henni* para las cuencas hidrográficas de Sonso, Yotoco y Guabas; *Brycon sp.* para la cuenca hidrográfica de Sabaletas; *Bryconamericus caucanus* de la cuenca hidrográfica de Guabas y *Creagrutus sp.* para la cuenca hidrográfica de Yotoco, y finalmente se realizó un Análisis de Función Discriminante para *Brycon henni* y *Brycon sp.* donde se obtuvo un 100 % de confiabilidad en la división de las dos especies. Se concluyó que los individuos provenientes de los ríos Sonso, Yotoco y Guabas forman un grupo independiente con relación a la especie *Brycon henni*, asimismo, señalaron que todas las muestras colectadas del río Sabaletas forman un grupo diferenciado que corresponden a la especie de *Brycon sp.*

Palabras claves: Morfometría geométrica, sabaleta y Análisis Multivariado.

3.2 Abstract

The *Brycon henni* species is endemic to Colombia and is important for riverine communities because it contributes to subsistence and sport fishing. Due to the social and economic impact, the objective of this study was to carry out a morphogeometric analysis of the *Brycon henni* species present in the watersheds of the Yotoco River, Sonso River, Guabas River and Sabaletas River, in Valle del Cauca. The results by means of multivariate analysis (Principal Component Analysis-PCA, Canonical Variant Analysis-CVA, Multiple Regression) indicated the presence of four groups according to the identified species such as *Brycon henni* for the Sonso, Yotoco and Guabas, *Brycon sp.* for the Sabaletas river, *Bryconamericus caucanus* from the Guabas river and *Creagrutus sp.* for the Yotoco river, and finally a Discriminant Function Analysis was performed for *Brycon henni* and *Brycon sp.* obtaining 100% reliability in the division of the two species. It was concluded that the individuals from the Sonso, Yotoco and Guabas rivers form an independent group in relation to the *Brycon henni* species, also, they indicated that all the samples collected from the Sabaletas river form a differentiated group that correspond to the *Brycon sp.*

Key words: Geometric Morphometry, Sabaleta and Multivariate analysis.

3.3 Introducción

En el mundo los peces son la especie más representativa de los vertebrados, con un número cercano a los 34 401, dicha diversidad es lo que hace más entendible su clasificación y la parte evolutiva. Los peces habitan en una extensa gama de ecosistemas acuáticos en el planeta (Cala-Cala, 2019).

En el Neotrópico en aproximadamente todos los ambientes acuáticos se presenta gran diversidad de Characiformes especialmente en los continentes de América y África, esta gran diversidad se debe a la evolución tanto en la morfológica como en la fisiología que ostentan las especies de peces (Zapata y Usma, 2013). Los Characiforme se destacan por habitar en diversidad de ecosistemas tanto de aguas lénticas como en aguas lólicas, encontrándose especies de todas las tallas y tamaños (C. Oliveira *et al.*, 2011).

Colombia se ubica en Sur de América en la esquina noroeste, cuenta con 1300 km de costa en el océano Pacífico y 1600 km en el mar Caribe (Ianas, 2019).

En el país la pesca y la acuicultura tienen producción en las costas pacífica y atlántica, asimismo en las cuencas hidrográficas más grandes como son en los ríos Magdalena, Amazonas, Orinoco y Sinú. Los pescados capturados son para el comercio ornamental y el consumo humano (OCDE, 2016). Colombia posee una importante diversidad de peces y los niveles más altos de biodiversidad (Esquivel *et al.*, 2014).

Para los pobladores ribereños, donde se encuentra la especie *Brycon henni*, es de importancia para la seguridad alimentaria, también es un recurso fundamental para algunas áreas, esta especie nativa se encuentra presente en aguas de temperatura media (Montoya *et al.*, 2006). En las cuencas hidrográficas del río Cauca se encuentra en mayor proporción la especie Sabaleta, siendo esta una de las favoritas para pesca deportiva (Botero-Botero y Ramírez-Castro, 2011).

La morfometría estudia la relación de la forma con elementos conexos, siendo una técnica que permite estimar objetivamente la parte cuantitativa de la variación morfológica y la parte cualitativa por medio del restablecimiento de la forma en investigación, lo anterior es factible

con la ayuda de recursos biométricos, herramientas y *software* que favorecen la colección y análisis de información en forma de modelos de coordenadas morfológicas que simboliza la geometría de una especie y no hay restricción en la consecución de información lineal (Toro *et al.*, 2010).

Planteamiento del problema

En los ecosistemas acuáticos la hidrología es un elemento importante, ya que integra factores como la fisicoquímica, hidráulica y geomorfología del agua y, por ende, la ecología. Según varias investigaciones de la hidrografía en Colombia señalan la importancia de la conservación de los ecosistemas acuáticos y sobre la amenaza que afronta (Ianas, 2019).

En América se encuentra Colombia, es el país con mayor abundancia de agua. En las vertientes Pacífico y Amazonas habita la tercera parte de la población humana y las otras dos partes habita en las tres cadenas montañosas andinas y en la costa atlántica, es una zona donde sus actividades principales son industriales, mineras, agrícolas y de deforestación (Ianas, 2019). Los asentamientos humanos alrededor de las cuencas hidrográficas provocan la actividad de la pesca artesanal, siendo un ítem importante para la seguridad alimentaria (OCDE, 2016). La vulnerabilidad de la diversidad biológica dulceacuícola se presenta por ser un recurso que se puede represar, desviar, extraer o contaminar por el hombre, genera un riesgo en el hábitat de las especies (Dudgeon, 2012). En el planeta, Colombia se posiciona como el segundo lugar por área entre los países más biodiversos, por disponer de una variedad geográfica de paisajes y relieves. Su diversidad de vida animal y vegetal es abrumadora (Cala-Cala, 2019).

Se conoce muy poco sobre las especies de peces en Colombia, situación que genera dificultad en el análisis y comparación de las poblaciones, por lo tanto, estudios sobre la ictiología de los afluentes colombianos son fundamentales para entender la evolución de los peces continentales (Carvalho y Galetti, 2008).

La morfometría es una estrategia que permite la identificación taxonómica de las especies de acuerdo con sus características diferenciales, cuya metodología supone la determinación de las medidas geométricas con las que se puedan obtener datos de talla y forma, lo cual puede emplearse para comparar las homologías entre especies relacionadas

y estudiar sus correlaciones con el ambiente (García-Alzate, 2010). En la comparación poblacional se utilizan métodos morfométricos, en los que se establecen técnicas para observar la diferenciación morfológica y su descripción (Monteiro, 2013).

Hipótesis

Existe alta diferenciación fenotípica en la especie *B. henni* de acuerdo con las cuencas hidrográficas de donde provienen.

Justificación

Los peces continentales tienen factores de diferenciación en la forma del cuerpo, al crecer en medios divergentes, dichas variaciones se han asignado de acuerdo con las condiciones ambientales donde habitan (Cocha, 2018).

En el mundo los vertebrados tienen un total de 68 511 especies, de las cuales más de la mitad (34 401) corresponde a especies de peces. La diversidad en la morfología, en el comportamiento, en la fisiología y en el hábitat, es en parte lo que ayuda a comprender la historia evolutiva y la clasificación. Los peces integran un extenso conjunto de adaptaciones en prácticamente todos los ambientes acuáticos del planeta. Actualmente es complejo cuantificar la diversidad en la morfología de los peces continentales, lo que implica que las comparaciones de la variabilidad morfológica de los peces sean principalmente subjetivas (Cala-Cala, 2019).

El análisis de la diferenciación morfológica de acuerdo con el origen geográfico es importante para entender los mecanismos evolutivos y ecológicos que afectan la diversidad biológica y contribuye a saber sobre la conservación y manejo de las especies. La variabilidad fenotípica entre ejemplares probablemente es por la heterogeneidad de procesos naturales (Escanta-Molina y Jiménez-Prado, 2019).

La diferencia en la morfología relacionada al hábitat es amplia en los peces, incluidas las diferencias entre la misma especie aplicadas a las condiciones de los sistemas lénticos y lóticos (Langerhans *et al.*, 2003). De acuerdo con el entorno donde habitan los peces, la alimentación y la capacidad para nadar, se asocia su morfología y comportamiento, mostrando patrones fenotípicos específicos. En las poblaciones naturales de peces la capacidad de los procesos de desarrollo influye en las diferencias morfológicas (Bonini-Campos *et al.*, 2019).

La especie *Brycon henni* se puede encontrar en aguas de características lénticas o lólicas, con temperatura media de 18 a 29° C (Montoya *et al.*, 2006), opta por lugares en los ríos con corrientes rápidas y fuertes, en zonas que tengan rocas y gravas, en plantas sumergidas y en cuevas socavadas por el agua (Maldonado-Ocampo *et al.*, 2005), habita en arroyos de preferencia en aguas claras y usa la columna de agua para conseguir su alimento (Botero-Botero y Ramírez-Castro, 2011). Es omnívoro, su dieta alimenticia es variada debido a que se adapta a consumir los alimentos comunes de su entorno, aprovechando los sitios turbulentos donde los materiales son arrastrados por el río (Maldonado-Ocampo *et al.*, 2005, Montoya *et al.*, 2006).

En esta investigación se utilizó la morfogeometría como técnica para entender las diferencias de la forma en los diferentes individuos de *B. henni* provenientes de las cuencas hidrográficas de los ríos Guabas, Sonso, Yotoco y Sabaletas (Buenaventura), alrededor de dichos afluentes viven comunidades las cuales algunos de sus recursos económicos y alimentarios dependen de la pesca artesanal.

Objetivo general

El objetivo de este estudio fue realizar un análisis morfogeométrico de la especie *Brycon henni* presentes en las cuencas hidrográficas del río Yotoco, río Sonso, río Guabas y río Sabaletas (Buenaventura), del Valle del Cauca.

Objetivos específicos

- Identificar las diferencias fenotípicas de la especie *B. henni* en las cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas (Buenaventura).
- Evaluar la técnica de morfometría geométrica en la caracterización fenotípica de la especie *B. henni*.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Muestra

Esta investigación es un complemento del estudio molecular con el fin de precisar las diferencias morfológicas de la especie *B. henni* de las subcuencas del río Cauca con una

subcuenca del río Anchicayá, además, lo es teniendo en cuenta que se obtuvieron pocas muestras, esto debido a que se observó una baja población en los sitios geográficos escogidos, considerando que se usó entre 48 y 64 horas de trabajo. Se analizó una muestra de 40 individuos de cuatro zonas geográficas de las cuencas hidrográficas de Yotoco (3°52'19,7"N; 76°24'18"O), Guabas (3°45'51,8"N; 76°14'19,8"O), Sonso (3°48'28,3"N; 76°17'18,1"O) y Sabaletas (3°45'9,5"N; 76°57'13,6"O), para cada zona geográfica se colectaron diez individuos en diferentes épocas, así: Yotoco el día 25 de agosto del 2014, Sonso el día 29 de julio del 2015, Sabaletas el día 1.º septiembre del 2015 y, finalmente, Guabas el día 6 de diciembre del 2015. A cada una de las muestras en vista lateral se les tomó registro fotográfico con cámara digital, adicionalmente, se usó cinta métrica, con el fin de tener una referencia de medida, como se muestra en la figura 3-1, estas fotografías se trabajaron desde el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira, para su análisis.

Figura 3-1: *Brycon sp.* del río Sabaletas-Buenaventura.



Fuente: (Rueda, 2015).

3.4.2 Análisis de datos

Se identificaron nueve puntos anatómicamente homólogos (ver figura 3-2.). Se empleó *software* de acceso abierto, que cuenta con un extenso conjunto de herramientas. Para esta investigación se utilizó: TPSUtil32 Version 1.79, se realizó un archivo con todas las imágenes de las muestras, con el fin de crear una matriz de coordenadas, al cual se le añadió la extensión (.tps), que es identificado con el programa tpsDIG2w32 versión 2.31 donde se digitalizó los nueve puntos de referencia o hitos para cada fotografía: (1) Punta del premaxilar, (2) Punto medio de la órbita ocular, (3) Borde anterior de la aleta dorsal, (4)

Borde anterior de la aleta adiposa, (5) Inserción dorsal de la aleta caudal , (6) Inserción ventral de la aleta caudal, (7) Origen de la aleta anal, (8) Origen de la aleta pélvica, (9) Origen de la aleta pectoral, para un total de nueve hitos para cada fotografía, (ver figura 3-2.), con este programa se hizo una transformación en coordenadas polares, posteriormente, se compilaron los archivos adquiridos de los anteriores *softwares* y se creó un documento de Microsoft Excel (. *delimitado por tabulación*), compuesto por la identificación de cada Fotografía el cual contenía la identificación de cada imagen (ID) y el grupo al que pertenecía (Grp).

Por último, se empleó MorphoJ Version 2.0 que está conformado por una serie de programas usados en la estimación de la morfometría geométrica a partir de información de dos dimensiones (Klingenberg, 2011).

Para adquirir una forma consenso de todas las muestras, se empleó una Superposición Procrustes, con el fin de ajustar los desvíos reduciendo las distancias por orientación, tamaño y posición (Klingenberg, 2011).

La Superposición de Procrustes tiene como objetivo disminuir las variaciones entre las configuraciones de los puntos anatómicos homólogos apoyado en los mínimos cuadrados conocido en inglés como Generalized least square superimposition (GLS), traducido como Superposición Generalizada de Mínimos Cuadrados (Schaefer y Bookstein, 2009).

Esta metodología se fundamenta en tres procesos para eliminar los datos no asociados a la forma. La diferencia en el tamaño se suprime al acoplarse cada configuración del punto anatómico homólogo con el fin que tenga un tamaño centroide equivalente a 1. En la posición la diferencia es eliminada por medio del desplazamiento de las configuraciones con el propósito de que coincidan con la posición de su centro de gravedad. Finalmente, las configuraciones se rotan hasta localizar una posición para cada una de las configuraciones. En consecuencia, las coordenadas alineadas contienen la información que muestra en realidad cómo cambia la forma entre especímenes; sin embargo, durante el desarrollo de ajuste de Procusto, se pierden dimensiones de variación (Klingenberg 2013).

Figura 3-2: Individuo mostrando los nueve hitos del análisis morfogeométrico.



Fuente: (Vélez, 2015).

3.4.3 Análisis estadísticos

Cada Punto anatómico homólogo ($K=9$) tiene dos coordenadas (X, Y), de acuerdo con la fórmula $2K$, estas coordenadas alineadas representan $2 * 9 = 18$ variables de coordenadas y para las variables de la forma se obtienen $2K-4$ (se resta cuatro de la multiplicación debido a que en el análisis se reducen dos grados de libertad al mover las configuraciones en las dos coordenadas, se reduce uno al acomodar todas las configuraciones a un único tamaño, y se reduce uno al rotarlas, disminuyendo la suma de las distancias), $2 * 9 - 4 = 14$ variables de conformación o *partial warps*, para 40 muestras en total (Jaramillo, 2011; Aguirre y Jiménez-Prado, 2018).

Con el programa MorphoJ Version 2.0 (Klingenberg, 2011), se generó la matriz de covarianza en la cual los números indican las covarianzas entre las variables, lo que permitió realizar los siguientes análisis morfométricos.

3.4.3.1 Análisis de componentes principales

Se realizó dos Análisis de Componentes Principales (PCA) o Relative Warp, el primero para detallar las diferencias morfológicas de los especímenes según las zonas geográficas y el segundo para establecer las diferencias morfológicas de las especies identificadas por medio de códigos de barras, se utilizó la matriz de varianza-covarianza, que se obtuvo con las coordenadas de la superposición de Procrustes respectivos a las configuraciones de todos los especímenes.

El análisis de Componentes Principales tiene como finalidad analizar las variaciones en el cuerpo entre las muestras colectadas en el espacio multivariado, conformando una serie de

datos multivariados de la forma. Es importante tener en cuenta que dicho análisis no ejecuta pruebas estadísticas y no utiliza datos sobre la identificación de los grupos en el análisis, por esta razón regularmente es el primer paso que se emplea en el estudio de los modelos de variación. El PCA emplea los modelos de covarianza en las variables originales para producir nuevas variables, llamadas componentes principales (PC). Los PC representan las direcciones de más cambio en el espacio multivariado inicial. El espacio es girado en el sentido de los PC y cada muestra es denominada con señales en las nuevas variables (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018). Por lo regular el primer componente principal representa la medición del tamaño; el resto de componentes, como mediciones de la forma. A pesar de ello, el Primer Componente Principal contiene datos del tamaño y la forma, del mismo modo que en los otros componentes principales (Zelditch *et al.*, 2012).

El propósito del PCA es disminuir la matriz de datos, por lo tanto, se usan pocos componentes que son ideales para explicar los datos. Una manera de escoger los componentes principales se basa en estimar el porcentaje de la varianza acumulada y se seleccionan los mínimos PC desde que el aumento no varía considerablemente (Cuadras, 2007).

Para este análisis el programa MorphoJ Version 2.0 (Klingenberg, 2011) generó los Eigenvalues o vector propio (representan la porción de la variación original explicada por cada componente principal), los porcentajes de la varianza, los porcentajes de varianza acumulada y los gráficos.

3.4.3.2 Análisis de Variantes Canónicas

Se empleó un Análisis de Variantes Canónicas (AVC o CVA), con el propósito de observar y entender la diferencia en la forma entre poblaciones. Este análisis potencializa la similitud dentro de los grupos y aumenta las diferencias entre los grupos (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018). El análisis se realizó para hallar las características de forma que mejor diferencian a los grupos predefinidos de los individuos de *Brycon henni*, *Brycon sp.*, *Bryconamericus caucanus* y *Creagrutus sp.*

Las Variantes Canónicas (CV) se usan para discriminar entre grupos, para hacer la evaluación se utiliza la distancia de Mahalanobis de los especímenes de la media del grupo. Las medias se estiman empleando las asignaciones de grupo anteriores.

La distancia de Mahalanobis entre un individuo X y la media M de un grupo depende de:

$$D = \sqrt{(X - M)^T S^{-1} (X - M)}$$

Donde S^{-1} es la inversa de la matriz de varianza-covarianza de las puntuaciones de CV de las muestras y T indica una matriz transpuesta. La pertenencia al grupo de cada espécimen en función de las puntuaciones se estima asignando cada individuo al grupo cuya media está más cercana (por debajo de la distancia de Mahalanobis) al individuo (Zelditch *et al.*, 2012).

Para obtener la distancia de Mahalanobis y el análisis de Procrustes se realizaron 10 000 permutaciones de individuos entre los grupos como test no paramétrico de la significancia, con el propósito de observar la similitud entre las agrupaciones (Mahalanobis, 1936).

3.4.3.3 Regresión múltiple

Se realizó un Análisis de Regresión Múltiple para observar la variación en la estructura o forma de los ejemplares y confirmar la separación de las respectivas agrupaciones, con el objetivo de poder corregir las variaciones en la forma de los individuos, ya que las Superposición Procusto no corrige las variaciones referentes a la alometría (transformación en la forma que acontece normalmente en la fase de crecimiento). Este análisis permite estimar las diferencias en más de una variable dependiente.

Las predicciones se efectúan por medio de la fórmula:

$$Y = mX + b$$

En este caso las variables dependientes (Y) son las de conformación o partial warps (relacionadas con el número de puntos anatómicos homólogos= 14), la variable independiente (X) es el tamaño centroide ya que integra la altura y la longitud del espécimen, la pendiente (m) y el punto en que la función intercepta con el eje Y (b) (Jaramillo, 2011; Aguirre y Jiménez-Prado, 2018).

3.4.3.4 Análisis de Función Discriminante

Se hizo el Análisis de Función Discriminante (AFD o FDA) para determinar el nivel de confiabilidad en la caracterización (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018), entre los individuos de

Brycon henni (colectados en Sonso, Yotoco y Guabas) y *Brycon sp.* (colectados en Sabaletas).

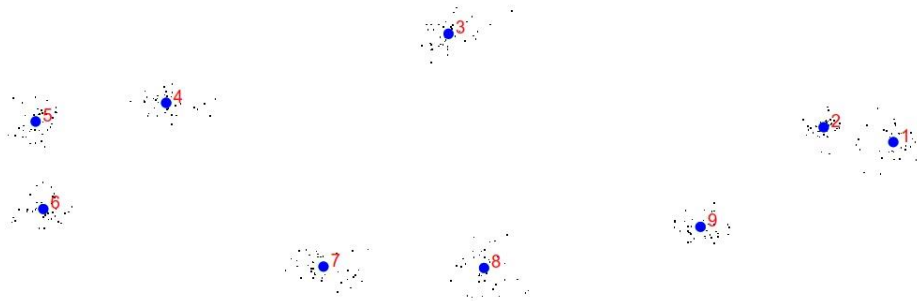
El AFD estima la segregación entre dos grupos seleccionados, los grupos deben ser conocidos con anterioridad. Este análisis se emplea para rechazar o aceptar la hipótesis de que fenotípicamente dos especies son diferentes (Aso, 2017). Esta metodología da como resultado funciones discriminantes que posibilitan agrupar especímenes de origen desconocido al grupo con mayor probabilidad (Jaramillo, 2011). Los individuos nuevos se pueden clasificar según una función discriminante que corresponde a una fórmula de regresión, para las variables dependientes, que contienen los coeficientes a multiplicar por los puntos anatómicos homólogos (después del análisis de Procuste) (Aso, 2017).

La técnica establece una función para clasificar a los individuos y porcentajes de clasificación óptimos para cada individuo. Las probabilidades de clasificación son importantes para la distinción entre grupos. Cuando el porcentaje de clasificación está más próximo al 100 %, mayor es la variación existente entre los dos grupos (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018).

3.5 Resultados

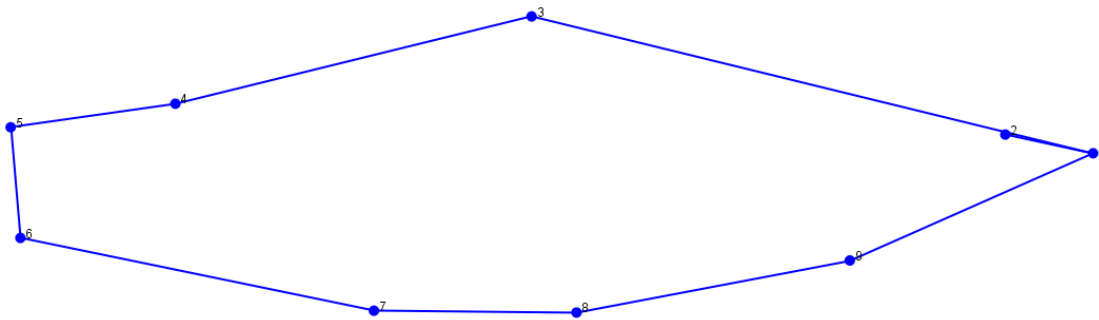
Antes de realizar los análisis multivariante, se realizó un ajuste de superposición de Procrustes. En la figura 3-3 se observa las coordenadas de los 9 hitos o puntos anatómicos homólogos rotados, trasladados y escalados. La dispersión en las nubes de puntos muestra la fluctuación de cada punto de referencia a través de la media de todas las configuraciones.

Figura 3-3: Superposición de Procrustes de los hitos. Los puntos más grandes pertenecen al consenso.



Seguidamente de la superposición de las coordenadas, se obtuvo la configuración promedio de los hitos o puntos de referencia en una muestra de configuraciones (Figura 3-4).

Figura 3-4: Estructura consenso originada a partir de los nueve hitos en los 40 especímenes.



3.5.1 Morfometría geométrica entre zonas geográficas

Para este ítem se realizó un análisis de componentes principales con el propósito de observar las diferencias fenotípicas de acuerdo con la procedencia de los especímenes colectados.

3.5.1.1 Análisis de componentes principales entre zonas geográficas

En el análisis de componentes principales (PCA) se obtuvieron 14 Componentes Principales (PC). Se seleccionaron dos componentes principales, ya que la varianza acumulada en el resto de CP no aumentaba significativamente.

Los dos primeros componentes principales explican el 63,94 % de la varianza total, de los cuales, el PC1, indican un 36,35% de la variación y permite dividir los modelos de diferenciación morfométrica de acuerdo a las zonas geográficas (Tabla 3-1). En la región positiva se traslapan individuos de Sonso, Yotoco y Guabas, por lo que es probable formar un grupo morfotipo o morfométrico, mientras que en la región negativa se agrupan principalmente los puntajes que corresponden a Sabaletas (Figura 3-5).

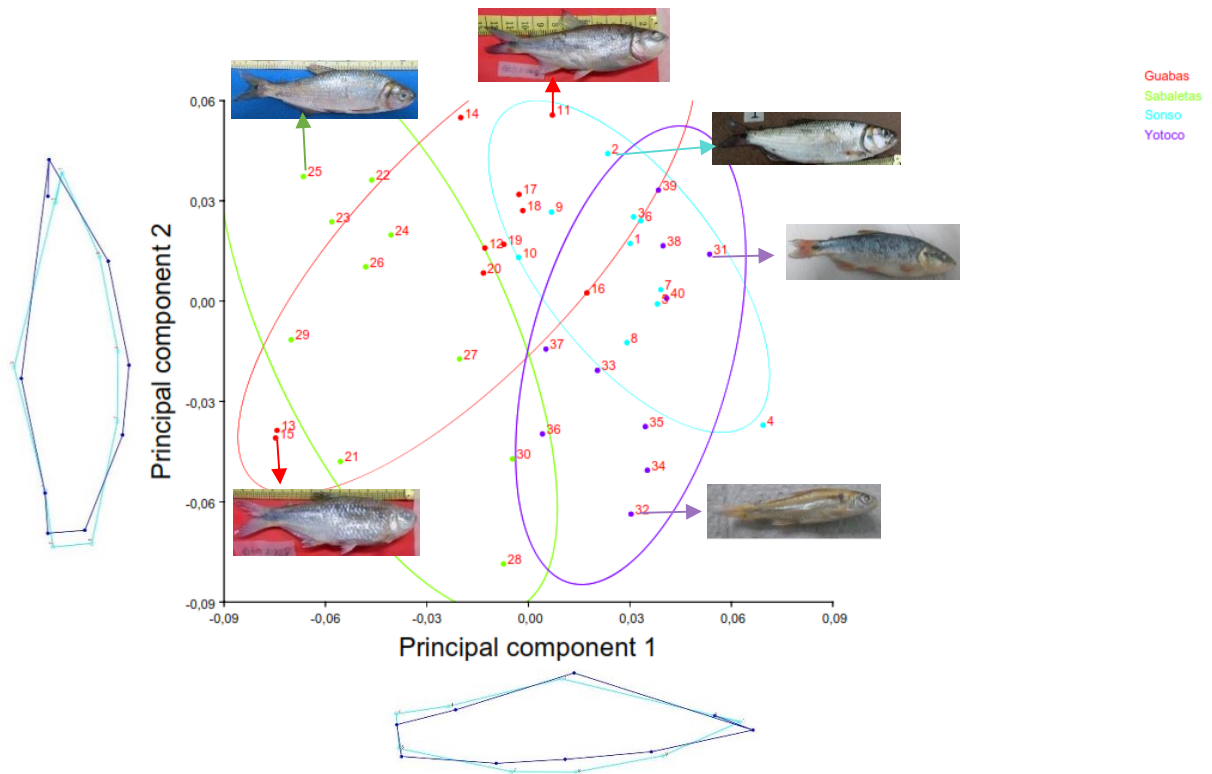
El PC2 de explicó el 27,59% de la variación, mostrando un traslape entre los puntajes de las cuatro zonas geográficas (Tabla 3-1 y Figura 3-5).

Adicionalmente, en la figura 3-5, se detalla los morfotipos (azul oscuro) para cada componente principal, donde para el PC1 se observa una prolongación en la punta del premaxilar (hito 1) y en la parte ventral hay un acortamiento (hitos 7,8 y 9). En el PC2 se muestra una disminución en la longitud (hitos 5 y 6) y el punto medio de la órbita ocular (hito 2) sube.

Tabla 3-1: Valores y porcentajes de los componentes principales.

COMPONENTES PRINCIPALES	VALORES	PORCENTAJE (%)	ACUMULADO (%)
1	0,00149459	36,35	36,35
2	0,00113460	27,59	63,94

Figura 3-5: Diagrama de dispersión de los CP1 y CP2 por zona geográfica.



En la figura 3-5 se observa que con el Análisis de Componentes Principales no fue posible agrupar a los especímenes por zona geográfica. Por consiguiente, se realiza un análisis de componentes principales entre las especies.

3.5.2 Morfometría geométrica entre especies

Los siguientes análisis morfométricos se realizaron con los 40 especímenes, conformados por las especies *Brycon henni*, *Brycon sp.*, *Bryconamericus caucanus* y *Creagrutus sp.* Identificadas a priori mediante código de barras.

A continuación, se describen los resultados para cada uno de los análisis evaluados.

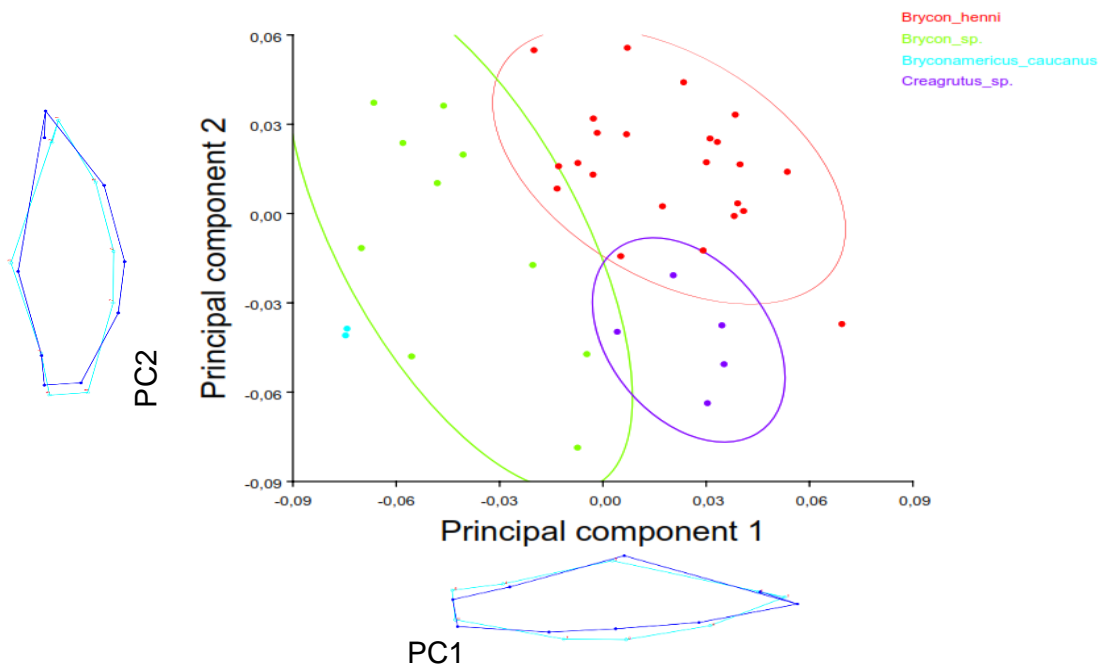
3.5.2.1 Análisis de Componentes Principales entre especies

Al igual que en el Análisis de Componentes Principales (PCA) entre zonas geográficas se estimaron 14 PC. Los resultados muestran que los dos primeros componentes explican el 63,94 % de la varianza total, el PC1, presentó un 36,35 % de la variación. En el área positiva se formaron dos grupos: el de la parte superior la agrupación con los especímenes

provenientes de los ríos Sonso, Yotoco y Guabas identificados con la especie *Brycon henni*, y en la parte inferior, los especímenes identificados como *Creagrutus sp.* Provenientes del río Yotoco (Figura 3-6).

El PC2 presentó el 27,59 % de la variación, en el área positiva se agruparon la mayoría de los individuos *Brycon henni* y la mitad de *Brycon sp.* y en el área negativa se observan los individuos de *Bryconamericus caucanus* y *Creagrutus sp.* (Figura 3-6).

Figura 3-6: Diagrama de dispersión de los CP1 y CP2 por especies.



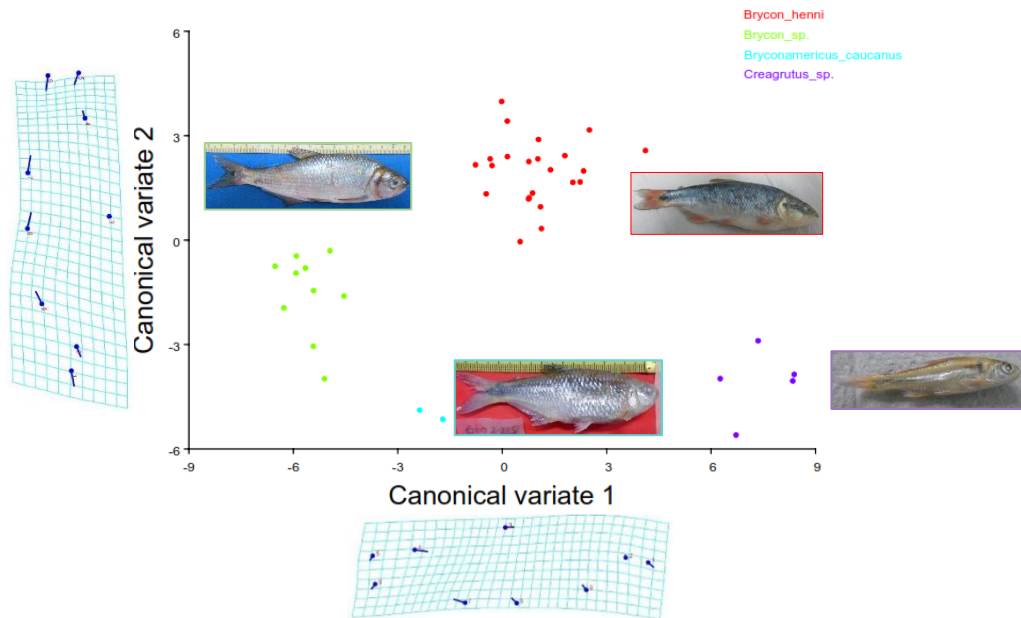
3.5.2.2 Análisis de Variantes Canónicas

Como en el PCA se observó las puntuaciones distribuidas en el morfoespacio con poca separación entre las especies, se decide estimar el Análisis de Variantes Canónicas (CVA) con el objetivo de mostrar una mejor clasificación entre las agrupaciones por especies.

Este análisis detalló una buena separación entre las especies colectadas. Los resultados indican que las dos primeras Variantes Canónicas (CV) representan el 95,34 % de la variabilidad, la CV1 presentó el 68,01 % y la CV2, el 27,33 %. En la figura 3-7 se observa la dispersión del CV1 y el CV2, donde la especie de *Brycon henni* en rojo forma un grupo en la región positiva (superior derecha), en la región negativa (inferior, izquierda) se agrupó los individuos de *Brycon sp.* de color verde y los de *Bryconamericus caucanus* dos individuos

de color azul y finalmente el grupo de cinco individuos de *Creagrutus sp.* la región positiva para CV1.

Figura 3-7: Diagrama de dispersión de los CV1 y CV2 por especies.



Los diagramas de Thin Plate Spline pertenecen a la variación graficada en cada uno de los ejes canónicos. Los puntos que representan a cada uno de los hitos corresponden a la forma promedio de los cuatro grupos, las variables están trazadas por las líneas en azul que señalan el peso y dirección en cada hito en el eje canónico. En la CV1 la mayor variación se presentó en el hito 1 (punta del premaxilar) con alargamiento y en los hitos 7,8 y 9 en la parte ventral una reducción, en la CV2 la variación más destacada fue en la parte caudal en los hitos 5 y 6, indicando una reducción de tamaño y los hitos 1 y 2 que presentan amplitud en su posición (Figura 3-7).

Tabla 3-2: Distancia de Mahalanobis en la matriz triangular inferior y distancias de Procrustes en la matriz triangular superior.

	<i>Brycon henni</i>	<i>Brycon_sp.</i>	<i>Bryconamericus_caucanus</i>	<i>Creagrutus_sp.</i>
<i>Brycon henni</i>	-	0,0681	0,1132	0,0763
<i>Brycon_sp.</i>	7,5140	-	0,0661	0,0974
<i>Bryconamericus_caucanus</i>	8,4954	6,8576	-	0,1094
<i>Creagrutus_sp.</i>	8,8988	13,2333	10,6541	-

Para las distancias de Mahalanobis y Procrustes solamente no fueron significativos para las combinaciones de *Bryconamericus caucanus* con *Creagrutus sp.* ya que en estos grupos solo hay dos y cinco individuos respectivamente (Tabla 3-2).

En la tabla 3-2 se analiza que las especies que presentan menos similitud son *Brycon sp.* y *Creagrutus sp.* y las especies con más similitud son *Brycon sp.* y *Bryconamericus caucanus*. Es de destacar que los individuos colectados en Sabaletas (*Brycon sp.*) y los colectados en Sonso, Yotoco y Guabas (*Brycon henni*) presentan diferencias.

3.5.2.3 Regresión múltiple

Para corroborar los resultados de las variaciones entre la forma de las diferentes especies, se realizó un análisis de regresión múltiple entre los datos de las coordenadas Procrustes (corrección de las variaciones en tamaño) y el tamaño centroide para cada agrupación, es decir, para las cuatro especies identificadas provenientes de los cuatro sitios de colecta, siendo el fundamento para un nuevo análisis de variantes canónicas, debido a que se corrige la alometría de los individuos.

El análisis indica que el 100 % de los especímenes tuvo una clasificación exacta (ver tabla 3-3).

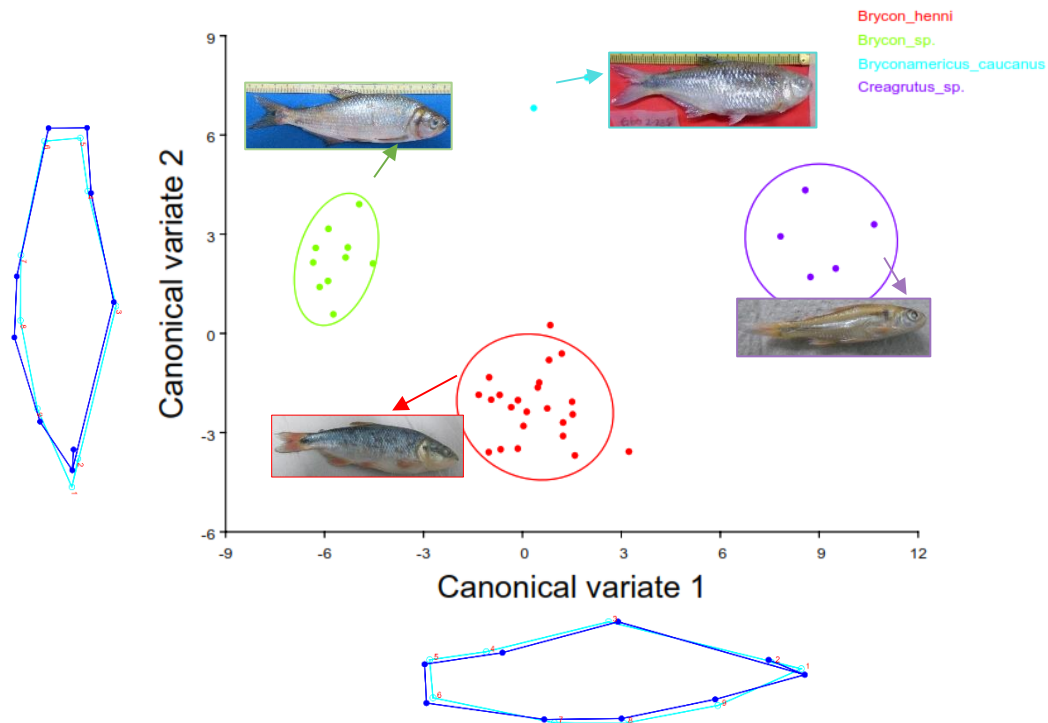
Tabla 3-3: Clasificación de los grupos.

Grupo	Individuos
<i>Brycon_henni</i>	23
<i>Bryconamericus_caucanus</i>	2
<i>Brycon_sp.</i>	10
<i>Creagrutus_sp.</i>	5
Total	40

En la figura 3-8, al igual que en el Análisis de Variables Canónicas, se observa que se forman cuatro grupos de acuerdo con la especie, se insiste en que los individuos colectados en Buenaventura (*Brycon sp.*) son diferentes a los colectados en Sonso, Yotoco y Guabas (*Brycon henni*) (Figura 3-8).

A pesar que se modifica el patrón, la interpretación del análisis persiste, sin embargo hay confiabilidad de que las variaciones son por la forma característica de la especie y no por la alometría en el crecimiento de los especímenes.

Figura 3-8: Diagrama de dispersión análisis de regresión múltiple por especies.



En el VC1 se observa que se mantienen las diferencias presentadas en los anteriores análisis multivariantes, donde la mayor variación se presentó en el hito 1 (punta del premaxilar) con alargamiento, en los hitos 7,8 y 9 en la parte ventral una reducción, pero se observa un alargamiento de longitud en los hitos 5 y 6.

En cambio, en el CV2 si se presentan diferencias en la estructura comparada con los anteriores análisis, en los puntos de referencia 1 y 2 hay una reducción en la posición y en los puntos de referencia 5 y 6 se observa un alargamiento de tamaño.

3.5.2.4 Análisis de función discriminante

El análisis de función discriminante según la especie indica que existe diferencia significativa de forma entre los individuos de *Brycon henni* y *Brycon sp.* Se logra clasificar adecuadamente los individuos de acuerdo con la especie (Tabla 3-4). Como se muestra en la figura 3-9, hay una clara diferenciación acertada según el

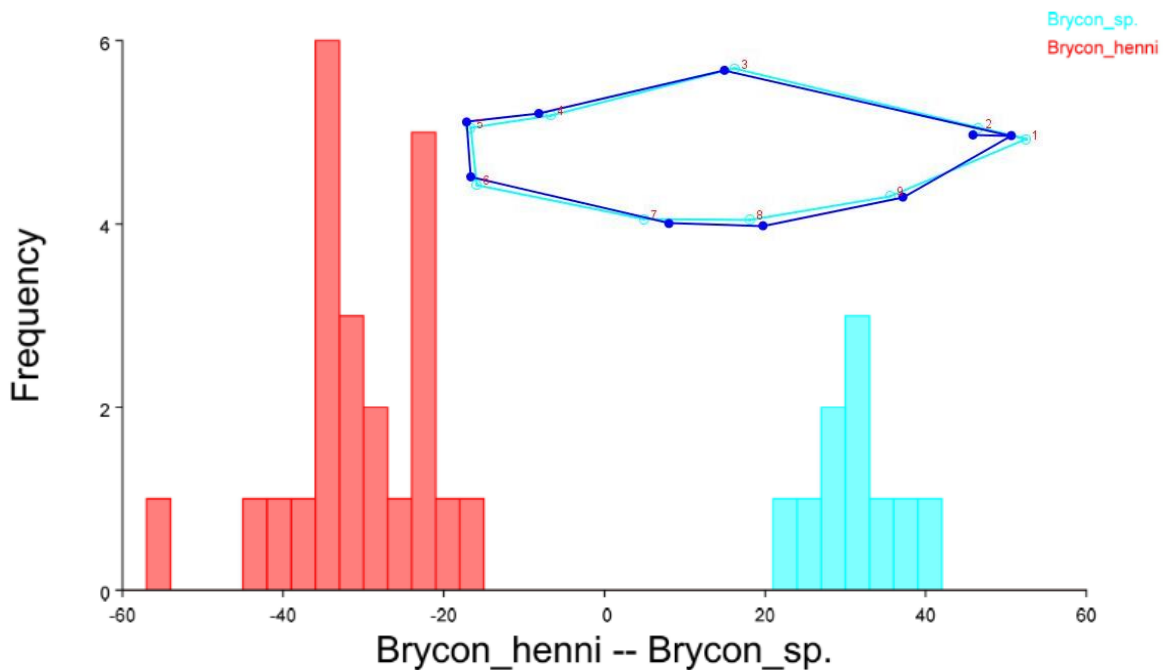
análisis discriminante de las especies. Este análisis estimó un 100 % de confiabilidad en la división de los especímenes (Tabla 3-4).

En la morfología el color azul celeste representa la especie *Brycon henni* y el azul oscuro representa la especie *Brycon sp.* se puede observar una variación de la forma en cada uno de los hitos entre estas dos especies, en *Brycon sp.* se presenta mayor diferenciación en la punta del premaxilar (hito 1), origen de la aleta anal (hito 7), origen de la aleta pélvica (hito 8) y origen de la aleta pectoral (9), con el hocico orientándose hacia arriba y ostentando un cuerpo más ancho (Figura 3-9).

Tabla 3-4: Análisis de Función Discriminante aplicado a *Brycon sp.* y *Brycon henni*.

Grupo	<i>Brycon henni</i>	<i>Brycon sp.</i>	Total
<i>Brycon henni</i>	23	0	23
<i>Brycon sp.</i>	0	10	10

Figura 3-9: Análisis de la variable canónica de *Brycon henni* y *Brycon sp.*



*En la morfología *Brycon henni* azul celeste, *Brycon sp.* azul oscuro.

3.6 Discusión

El objetivo de esta investigación fue realizar un análisis por medio de morfometría geométrica a la especie *Brycon henni* con el fin de detallar las diferencias fenotípicas de los especímenes colectados en cuatro cuencas hidrográficas en el departamento del Valle del Cauca, los ríos Sonso, Guabas y Yotoco son afluentes del río Cauca de la vertiente Caribe y el río Sabaletas del municipio de Buenaventura es afluente del río Anchicaya de la vertiente pacífica.

Los resultados, aplicando dicha técnica, señalan la utilidad de la morfometría geométrica para la obtención de información en la diferenciación de los individuos analizados en base a su forma. A pesar de que no se obtuvieron muestras representativas e igual cantidad de individuos, se logró realizar un estudio preliminar donde se observaron las variaciones en las formas de los peces colectados y mostraron que las formas de los cuerpos son específicos para cada especie, teniendo en cuenta que en río Yotoco se colectó cinco individuos de *Brycon henni* y cinco individuos de *Creagrutus sp.*; en el río Sonso, diez individuos de *Brycon henni*; en el río Guabas, ocho individuos de *Brycon henni* y dos individuos de *Bryconamericus caucanus*, y finalmente en el río Sabaletas, diez individuos de *Brycon sp.*, estos develaron una discriminación fenotípica entre las especies en los análisis multivariados utilizados PCA, AVC y regresión para cuatro grupos según las especies identificadas. La variación entre poblaciones fue confirmada por PCA, AVC y Regresión, los diagramas de dispersión se fundamentaron en estimaciones para cada muestra, presentando grupos de puntos no superpuestos o leves y superpuestos para cada población. El resultado a su vez fue apoyado por el porcentaje de individuos adecuadamente clasificados, expresado en el 100 % de los individuos en los grupos por regresión correspondientes. Las poblaciones de los ríos de Sonso, Guabas y Yotoco evidenciaron superposición entre las poblaciones asignadas que pertenecen a la misma especie, por las cortas distancias geográficas entre ellas y porque posiblemente coinciden con condiciones ambientales semejantes. En cambio, las poblaciones del río Sabaletas no se superpusieron con las de los ríos Sonso, Guabas y Yotoco, porque posiblemente son especies diferentes, respaldado esto con el análisis multivariante utilizado DFA.

A nivel interespecífico, las especies fueron discriminadas efectivamente entre sí ya que en los análisis multivariante (CPA, CVA y Regresión múltiple) no se observaron

superposiciones entre las especies y se clasificaron en cuatro grupos identificados como *Brycon henni*, *Brycon sp.*, *Bryconamericus caucanus* y *Creagrutus sp.*, estos resultados son similares a los de Feulner *et al.* (2007) en los que identificaron seis grupos de peces africanos del género *Campylomormytus* que se relacionaban con adaptaciones en la radiación. Asimismo, coincide con lo que citan Gupta, Dwivedi y Tripathi (2018) en su estudio al examinar las variaciones morfométricas entre los peces de la subfamilia Barbinae en el río Ganges en la India, tras observar variación entre las especies con una clasificación de cinco grupos.

Las poblaciones de los ríos Sonso, Yotoco y Guabas se clasificaron en un solo grupo para la especie *Brycon henni*, debido posiblemente a que el tamaño de la muestra no fue representativo para cada uno de los sitios geográficos, los resultados difieren con los de Restrepo-Escobar *et al.* (2016) donde indicaron diferencias morfológicas fundamentadas mediante la morfometría geométrica en poblaciones de *Brycon henni* de diferentes ríos y arroyos de Antioquia (Colombia).

Los resultados también son distintos a los de Lostrom *et al.* (2015) quienes argumentan que varía la forma del cuerpo de las especies ícticas como *Malacosteus australis* en cuanto a los diferentes ambientes donde estas habitan, al obtener para su estudio fuertes patrones de diferenciación morfológica. Igualmente para Noriega (2015) que caracterizó seis poblaciones de tilapia roja (*Oreochromis sp.*): P1, P2 y P3 fueron brasileñas; P4 y P5, costarricenses, y P6, jamaicana, donde identificó las diferencias entre individuos y dentro de poblaciones; la P4 de Costa Rica fue la más variable. También para Mouludi-Saleh *et al.* (2020) por medio de análisis multivariante evidenciaron variabilidades significativas en la morfología en seis poblaciones de *Squalius turcicus* según las condiciones de sus hábitats. Otro estudio realizado por Cavalcanti y Duarte, en 2019, indicaron que por medio de la variación de la forma del cuerpo de la especie *Prionotus punctatus*, se observaron tres grupos poblacionales, el primero para la agrupación del noreste de Brasil, el segundo para la población del sureste de Brasil y el tercero para los individuos del sur de Brasil.

La morfometría geométrica es así, una herramienta exacta, eficaz, asequible y económica en la cuantificación y en el estudio de la diferenciación morfológica, además facilita la visualización de complejas variaciones entre diferentes estructuras vivas, con la ayuda basada en pruebas estadísticas (Benítez y Püschel, 2014).

Los resultados de la morfometría geométrica fueron consistentes con lo observado en la filogenia molecular, clasificando los grupos por especies y obteniendo una separación significativa entre la especie *Brycon henni* (muestras colectadas en los ríos de: Sonso, Yotoco y Guabas) con la especie *Brycon sp.* (muestras colectadas en el río Sabaletas).

Con la morfometría geométrica las especies que presentan más diferencias son *Brycon sp.* y *Creagrutus sp.* en todos los puntos de referencias presentó diferencias, al mostrar que la especie *Creagrutus sp.* es más angosta y larga, mientras que a nivel molecular lo son las especies *Brycon henni* y *Creagrutus sp.* también se observa que en la morfogeometría las especies menos diferentes son *Brycon sp.* y *Bryconamericus caucanus*, siendo *B. caucanus* ligeramente más ancha (hitos 7,8) y larga en la parte posterior (hitos 4, 5 y 6). Pero a nivel molecular son las especies *Brycon henni* y *Brycon sp.*

3.7 Conclusiones

- Los análisis indicaron diferencias morfológicas entre los individuos provenientes de los ríos Sonso, Yotoco y Guabas, especie identificada como *Brycon henni* y los individuos provenientes del río Sabaleta, especie designada como *Brycon sp.* Con el apoyo del Análisis de Función Discriminante se observó que los grupos de *Brycon henni* y *Brycon sp.* están bien diferenciados de acuerdo con la forma del cuerpo.
- La técnica de morfometría geométrica permitió validar la caracterización fenotípica preliminar, identificando las diferencias morfológicas a nivel de especies en las muestras colectadas de Sabaletas en ríos del Valle del Cauca tales como: río Sonso, río Yotoco, río Guabas y río Sabaletas.

3.8 Recomendaciones

Es importante ampliar la investigación a un mayor número de muestras y de sitios donde hace presencia la especie *Brycon henni* y de *Brycon sp.* en el Valle del Cauca, para así obtener un análisis de morfometría geométrica más específica.

- 10 Caracterización genómica y fenotípica de la especie *Brycon henni* (Characiformes:
2 Characidae) en cuencas hidrográficas de los ríos Yotoco, Sonso, Guabas y Sabaletas
-

3.9 Bibliografía

- Aguirre, W. E., y Jiménez-Prado, P. (2018). *Guía práctica de morfometría geométrica. Aplicaciones en la ictiología*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Esmeraldas (PUCESE).
- Aso Vizán, J. (2017). *Morfometría craneofacial sobre ficheros DICOM. Aplicaciones en ciencias morfológicas, forenses y en cirugía reparadora*. Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/41109/1/T38348.pdf>
- Benítez, H. A., y Püschel, T. A. (2014). Modelando la varianza de la forma: morfometría geométrica aplicaciones en biología evolutiva. *International Journal of Morphology*, 32, (3). 998-1008. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000300041>
- Bonini-Campos, B., Lofeu, L., Brandt, R., y Kohlsdorf, T. (2019). Different developmental environments reveal multitrait plastic responses in South American Anostomidae fish. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 332(7), 238–244. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22905>
- Botero-Botero, A., y Ramírez-Castro, H. (2011). Ecología trófica de la Sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae) en el río Portugal de Piedras, Alto Cauca, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 16(1), 2349–2355.
- Cala-Cala, P. (2019). *Medio ambiente y diversidad de los peces de agua dulce de Colombia*. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
- Carvalho, F., y Galetti, P. (2008). Estudo da diversidade genética e Filogeografia do genero *Pseudoplatystoma Bleeker*, 1862 (Teleostei: Pimlrodidae) em diferentes bacias hidrograficas brasileiras. Doutorado. Unversidade Federal de Sao Carlos. Departamento de Genetica e Evolucao. Sao Carlos.
- Cavalcanti, M. J., y Duarte, P. R. (2019). Geographic variation in *Prionotus punctatus* (Bloch) (Teleostei, Scorpaeniformes, Triglidae): a geometric morphometric analysis. *Tropical Diversity*, 1(2), 48–56.
- Cocha, A. P. (2018). *Análisis de la variación morfológica de Hoplias malabaricus (Bloch 1794), asociada al tipo de hábitat utilizando morfometría geométrica*. Universidad Central del Ecuador.
- Cuadras, C. M. (2007). *Nuevos métodos de análisis multivariante*. CMC editions.
- Dudgeon, D. (2012). Threats to freshwater biodiversity globally and in the Indo-Burma Biodiversity Hotspot. En: D.J. Allen, K.G. Smith, y W.R.T. Darwall (eds.), *The Status*

- and Distribution of Freshwater Biodiversity in Indo-Burma*. Cambridge, UK and Gland. IUCN.
- Escanta- Molina, R., y Jiménez-Prado, P. (2019). Uso de la morfometría geométrica para establecer contrastes biológicos y ambientales en poblaciones de peces del río Teaone. *Rev. Hallazgos* 21, 4(1), 55–69.
- Esquivel, M. A., Merino, M., Restrepo, J., Narváez, A., Polo, C., Plata, J., y Puentes, V. (2014). Estado de la pesca y la acuicultura en Colombia. Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP).
- Feulner, P. G. D., Kirschbaum, F., Mamonekene, V., Ketmaier, V., y Tiedemann, R. (2007). Adaptive radiation in African weakly electric fish (Teleostei: Mormyridae: Campylomormyrus): A combined molecular and morphological approach. *Journal of Evolutionary Biology*, 20(1), 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01181.x>
- García-Alzate, C. A., Román-Valencia, C., y González, M. I. (2010). Morfo geometría de los peces del género *Hyphessobrycon* (Characiformes: Characidae), grupo heterorhabdus, en Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58(3), 801–811.
- Gupta, D., Dwivedi, A. K., y Tripathi, M. (2018). Taxonomic validation of five fish species of subfamily Barbinae from the Ganga river system of northern India using traditional and truss analyses. *PLoS One*, 13(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206031>
- IANAS. (2019). *Water Quality in the Americas Risks and Opportunities*. In *Water quality in the Americas: Risks and opportunities*. <https://www.researchgate.net/publication/331839012>
- Jaramillo, N. (2011). *Morfometría geométrica: principios teóricos y métodos de empleo*. *Fronteras de investigación en enfermedades infecciosas. Modelo enfermedad de Chagas*. Universidad de Antioquia.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Klingenberg, C. P. (2013). Cranial integration and modularity: insights into evolution and development from morphometric data. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1), 43-58. <https://doi.org/10.4404/hystrix-24.1-6367>
- Langerhans, R. B., Layman, C. A., Langerhans, A. K., y Dewitt, T. J. (2003). Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80(4), 689–698. <https://doi.org/10.1111/j.1095->

- 8312.2003.00266.x
- Lostrom, S., Evans, J. P., Grierson, P. F., Collin, S. P., Davies, P. M., y Kelley, J. L. (2015). Linking stream ecology with morphological variability in a native freshwater fish from semi-arid Australia. *Ecology and Evolution*, 5(16), 3272–3287. <https://doi.org/10.1002/ece3.1590>
- Mahalanobis, P. C. (1936). On the generalized distance in statistics. *National Institute of Science of India.*, 2(1), 49–55.
- Maldonado-Ocampo, J. A., Ortega-Lara, A., Usma Oviedo, J. S., Galvis Vergara, G., Villanavarró, F. A., Vásquez Gamboa, L., ... Calle V., J. C. (2005). *Peces de los Andes de Colombia*. Instituto Humboldt Colombia.
- Monteiro, L. R. (2013). Morphometrics and the comparative method: studying the evolution of biological shape. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1), 25–32. <https://doi.org/10.4404/hystrix-24.1-6282>
- Montoya, A. F., Carrillo, L. M., y Olivera, M. (2006). Algunos aspectos biológicos y del manejo en cautiverio de la sabaleta *Brycon henni* Eigenmann, 1913 (Pisces: Characidae). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2), 180–186.
- Mouludi-Saleh, A., Eagderi, S., Cicek, E., y Sungur, S. (2020). Morphological variation of Transcaucasian chub, *Squalius turcicus* in southern Caspian Sea basin using geometric morphometric technique. *Biologia*, 75, 1–6. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00409-6>
- Noriega, A. M. (2015). *Caracterización de seis poblaciones parentales de tilapia roja Oreochromis spp.* Universidad Nacional de Colombia.
- OCDE. (2016). La pesca y la acuicultura en Colombia.
- Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguela, T. C., Benine, R. C., Ortí, G., Vari, R. P., y Corrêa e Castro, R. M. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 275. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-275>
- Restrepo-Escobar, N., Hurtado-Alarcón, J. C., Mancera-Rodríguez, N. J., y Márquez, E. J. (2016). Variations of body geometry in *Brycon henni* (Teleostei: Characiformes, Bryconidae) in different rivers and streams. *Journal of Fish Biology*, 89(1), 522–528. <https://doi.org/10.1111/jfb.12971>
- Schaefer, K., y Bookstein, F. L. (2009). Does geometric morphometrics serve the needs of

- plasticity research? *Journal of Biosciences*, 34(4), 589-599.
- Toro, M. V., Manriquez, G., y Suazo, I. (2010). Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 28(4), 977–990. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022010000400001>
- Zapata, L. A., y Usma, J. S. (2013). *Guía de las especies migratorias de la biodiversidad en Colombia: peces*. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible / WWF-Colombia. http://awsassets.panda.org/downloads/migratoriaspecies_42_web_final.pdf
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., y Sheets, H. D. (2012). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386903-6.00001-0>