

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS



“ Filogeografía comparada de siete especies de peces de agua dulce del Alto Madera (Amazonía Boliviana)”

Tesis de Grado para optar al Título de Master en Ciencias Biológicas y Biomédicas

Autor :Lic. Juan Pablo Torrico B

Tutor: Dr. Jean François Renno (IRD)

Co-Tutor: Dr. Erick Desmarais (GPIA)

Tutor administrativo: Dra. Volga Iñiguez R. (IBMB)

La Paz, Bolivia
2004 ©

El presente trabajo ha sido realizado en el marco del programa de investigación: “Interacción genoma población y Ambiente en peces del Alto Madera, Amazonía Boliviana” conducido en cooperación entre el **Instituto de Cooperación para el Desarrollo de la República de Francia** (IRD), el **Instituto de Biología Molecular y Biotecnología** de la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz, Bolivia) y el Laboratorio **Genome, Population, Interaction, Adaptations** (GPIA) de la Universidad de Montpellier II (Montpellier-Francia)

Las muestras provenientes del Ucayali fueron proporcionadas por la Dra. Carmen Dávila del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP)-Perú

Las secuencias de *C.macropomum* provenientes de la amazonía central fueron facilitadas para este estudio por la Dra. Iseni Farías de la Universidad de Manaus (Brasil)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jean Francois Renno por todo su apoyo orientación y dedicación.

Al Dr. Erick Desmarais por las invaluable enseñanzas y por su gentileza en todo momento

Al Dr. François Bonhomme director del laboratorio "Genome Populations, Interactions, Adaptations"

Al Dr. Marc Legendre responsable de la UR 081

Al IRD en su conjunto, pero principalmente a la UR 081

A la Dra. Volga Iniguez R. Directora del IBMB

A la Unidad de Investigación "Biología Evolutiva" del IBMB

INDICE

Índice de Figuras	i
Índice de Tablas	iii
Índice de Cuadros	iv
Resumen	v
Abstract	vi

Introducción	1
Hipótesis	3
Objetivos	3

Capitulo Primero: Conceptos y Métodos en Filogeografía Comparada

1.1.- Definición	4
1.2.- El genoma mitocondrial en Filogeografía	5
1.2.1.- Origen y Función	5
1.2.2.- Estructura y Herencia	5
1.2.3.- Composición y organización génica	7
1.2.4.- Evolución del genoma mitocondrial	8
1.2.4.1.- Teoría Neutral de la Evolución Molecular	9
1.2.4.2.- Es el genoma mitocondrial un marcador neutral	10
1.2.5.- El genoma mitocondrial en filogeografía	11

Capítulo Segundo: Evolución del ambiente de los peces neotropicales: fenómenos estructurantes de la ictiofauna

2.1.- Hipótesis a cerca de la diversidad específica actual.	12
2.1.1.- Ríos Barrera	14
2.1.2.- Refugios del Pleistoceno	14
2.2.- Historia de la construcción de las cuencas de drenaje actuales	16
2.2.1.- Fragmentación de Gondwana	16
2.2.2.- Primera transgresión marina (83-67 millones de años)	20
2.2.3.- Regresión Marina entre 67 y 61 millones de años	21
2.2.4.- Segundo ciclo de transgresión y regresión marina	22
2.2.5.- Sistemas fluvio-lacustres entre los 43 y los 30 millones de años	24
2.2.6.- Incremento de la tasa de levantamiento de los Andes	25
2.2.7.- Sistema lacustre del Lago Pebas durante el Mioceno	26
2.2.8.- Establecimiento de la configuración actual de los Andes y de las cuencas de drenaje del Orinoco, Amazonas y Paraná (culminación del terciario, 20 millones de años hasta 1.8 Ma.)	27
2.2.9.- Periodo Cuaternario (1.8 millones de años al presente)	29
2.3.- Configuración actual de América del Sur	29
2.3.1.- Geología	29
2.3.2.- El río Amazonas y sus tributarios	30
2.4.- Conclusión	35

Capítulo Tercero: Metodología

3.1.- Área de estudio	37
3.2.- Especies	39
3.3.- Colecta y preservación	43
3.4.- Técnicas de Laboratorio	44
3.4.1.- Extracción y purificación	44
3.4.2.- Amplificación por PCR y Secuenciación.	44
3.5.- Análisis de los datos	44
3.5.1.- Edición y alineamiento de las secuencias	44
3.5.2.- Análisis filogenéticos	46
3.5.2.1.- Medidas de distancia genética y análisis de saturación	46
3.5.2.2.- Test de Neutralidad	47
3.5.2.3.- Reloj Molecular	48

Capítulo Cuarto: Resultados

4.1.- Caracterización de las secuencias	51
4.2.- Composición	53
4.3.- Tratamiento de datos	55
4.3.1.-Distancias genéticas	55
4.3.1.1.- <i>Colossoma macropomum</i>	55
4.3.1.2.- <i>Piaractus brachypomus</i>	57
4.3.1.3.- <i>Pygocentrus nattereri</i>	59
4.3.1.4.- <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	61
4.3.1.5.- <i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	63
4.3.1.6.- <i>Cichla monoculus</i>	64
4.3.2.- Saturación y Homoplasia	65
4.3.2.1.- Saturación	65
4.3.2.2.- Homoplasia	69
4.3.3.- Test de Neutralidad	70
4.4.- Filogeografía	71
4.4.1.- <i>Colossoma macropomum</i>	71
4.4.2.- <i>Piaractus brachypomus</i>	73
4.4.3.- <i>Pygocentrus nattereri</i>	74
4.4.4.- <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	76
4.4.5.- <i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	77
4.4.6.- <i>Cichla monoculus</i>	80

Capítulo Quinto: Discusiones

Bibliografía	88
--------------	----

Índice De Figuras

Figura n ° 1.- Organización linearizada del genoma mitocondrial en peces	7
Figura n ° 2.- Teorías de evolución molecular	9
Figura n ° 3.- Dientes fósiles Asignados a la sub-familia Serrasalminae por Gayet, Marshall, Sempere et al. (2001).	13
Figura n ° 4.- Mapa mostrando algunos de los refugios propuestos para varios grupos taxonómicos Vegetales	15
Figura n ° 5.- Deriva continental desde hace 225 Millones de años (Ma)	17
Figura n ° 6.- Dos filogénias mostrando distintos patrones de diversificación consistentes con la separación de África y Sudamérica.	18
Figura n ° 7.- Inicio de la Separación de África y Sudamérica (aprox.135 Millones de años)	19
Figura n ° 8.- Primer evento de transgresión marina documentada hacia fines del Cretácico.	20
Figura n ° 9.- Restauración de los cursos de agua epicontinentales después de la primera transgresión marina , Paleoceno	21
Figura n ° 10 .- Un nuevo evento de transgresión marina recubre gran parte del continente Sudamericano a fines del Paleoceno.	22
Figura n ° 11.- A lo largo de gran parte del Eoceno, predominan los sistemas de agua dulce continentales	23
Figura n ° 12 .- Formaciones fluvio-lacustres marcaron el Oligoceno temprano en Sudamérica	24
Figura n ° 13.- A fines del Oligoceno e inicio del Mioceno se produjo el periodo orogénico más importante en la historia geológica del continente Sudamericano.	25
Figura n ° 14.- El Mioceno ve la formación de un Sistema Fluvio-Lacustre de magnitud al Norte del continente y el desplazamiento de las cabeceras de los ríos hacia el Este.	26
Figura n ° 15.- Formación del Lago Pebas	27
Figura n ° 16.- Establecimiento actual del Orinoco, Amazonas y Paraná.	28
Figura n ° 17.- Geología General de América del Sur, con énfasis en los arcos cratónicos	30
Figura n ° 18.- Principales cuencas hidrográficas actuales de América del Sur	31
Figura n ° 19.- Cuenca hidrográfica del Amazonas	33
Figura n ° 20.- Representación de las trece áreas tributarias de la cuenca Amazónica	35
Figura n ° 21.- .- Cuenca Hidrográfica del Madera destacando la porción del Alto Madera	37
Figura n ° 22 .- Origen geográfico de las muestras empleadas en el presente estudio	38
Figura n ° 23.- Productos de amplificación de la región de control para las siete especies del presente estudio	51
Figura n ° 24.- Composición nucleotídica promedio de las secuencias obtenidas.	53
Figura n ° 25.- Composición nucleotídica promedio G + C % de las siete especies estudiadas.	54
Figura n ° 26.- UPGMA mostrando la divergencia entre haplotipos de diversos orígenes geográficos	57

Figura n ° 27.- Árbol UPGMA poniendo en evidencia la divergencia entre los diferentes haplotipos de <i>P. brachypomus</i> .	58
Figura n ° 28.- Árbol UPGMA poniendo en evidencia la divergencia entre las secuencias de <i>P. nattereri</i>	60
Figura n ° 29.- Árbol UPGMA demostrando las divergencias entre las secuencias de Dloop de las muestras de <i>P. fasciatum</i>	62
Figura n ° 30.- Árbol UPGMA mostrando la divergencia entre haplotipos de <i>P.tigrinum</i> de orígenes geográficos diversos	63
Figura n ° 31.- Árbol UPGMA ilustrando la divergencia entre las secuencias de <i>C. monoculus</i> de orígenes geográficos distintos	65
Figura n ° 32.- Análisis de Saturación para las secuencias de <i>C. macropomum</i>	66
Figura n ° 33.- Análisis de Saturación para las secuencias de <i>P. brachypomus</i>	67
Figura n ° 34.- Análisis de Saturación para las secuencias de <i>P. nattereri</i>	67
Figura n ° 35.- Análisis de Saturación para las secuencias de <i>P. fasciatum</i> y <i>P.tigrinum</i>	68
Figura n ° 36.- Análisis de Saturación para las secuencias de <i>C. monoculus</i>	69
Figura n ° 37.- Filogeografía de <i>C. macropomum</i> a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método de parsimonia máxima	72
Figura n ° 38.- Filogeografía de <i>P. brachypomus</i> a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método de parsimonia máxima	73
Figura n ° 39.- Filogeografía de <i>P. nattereri</i> a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método de parsimonia máxima	75
Figura n ° 40.- Filogeografía de <i>P. fasciatum</i> a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método de parsimonia máxima	77
Figura n ° 41.- Filogeografía de <i>P. tigrinum</i> a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método de parsimonia máxima	79
Figura n ° 42.- Filogeografía de <i>C. monoculus</i> a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método de parsimonia máxima	80
Figura n ° 43.- Escala temporal de los eventos de divergencia puestos en evidencia en el presente estudio bajo la hipótesis de reloj molecular	85

Índice De Tablas

Tabla n ° 1.- Genes típicamente hallados en los genomas mitocondriales.	7
Tabla n ° 2.- Superficie de cobertura de los principales tributarios del Amazonas	34
Tabla n ° 3.- Mecanismos de especiación y su influencia sobre la diversificación de la fauna Neotropical	36
Tabla n ° 4.- Rasgos de vida característicos de las siete especies de peces involucradas en el presente estudio.	43
Tabla n ° 5.- Comparación de los elementos de las secuencias conservadas del DNA mitocondrial entre varias especies de peces	45
Tabla n ° 6.- Secuencias de la región de control mitocondrial incluidas en el presente estudio.	50
Tabla n ° 7.- Secuencias putativas conservadas para la región Dloop en las siete especies en estudio	52
Tabla n ° 8.- Composición nucleotídica de las secuencias obtenidas	53
Tabla n ° 9.- ANOVA para la comparación de los promedios de composición G + C % entre las secuencias de las siete especies en estudio.	55
Tabla n ° 10.- Distancias genéticas K2P entre haplotipos de <i>C.macropomum</i> provenientes del Alto Madera	56
Tabla n ° 11.- Distancias genéticas K2P entre <i>C.macropomum</i> , <i>P. brachypomus</i> y <i>P nattereri</i>	57
Tabla n ° 12.- Distancias genéticas entre los haplotipos de <i>P.brachypomus</i> provenientes del Alto Madera	58
Tabla n ° 13.- Distancias genéticas que separan los haplotipos del Alto Madera de los provenientes del Río Solimões y del Ucayali.	59
Tabla n ° 14.- Divergencias entre secuencias de la región Dloop de <i>P.brachypomus</i> y las secuencias de <i>C. macropomum</i> y <i>P.nattereri</i>	59
Tabla n ° 15.- Distancias genéticas K2P entre los distintos haplotipos de <i>P. nattereri</i> provenientes Del Alto Madera.	60
Tabla n ° 16.- Distancias genéticas entre haplotipos del Alto Madera y los haplotipos originarios del Río Solimões y Ucayali	61
Tabla n ° 17.- Divergencia entre las secuencias de la región Dloop de <i>P. nattereri</i> y las secuencias de <i>C.macropomum</i> y <i>P. brachypomus</i>	61
Tabla n ° 18.- Distancias genéticas entre los haplotipos de <i>P.fasciatum</i> provenientes del Alto Madera	62
Tabla n ° 19.- Divergencia entre los haplotipos del Alto Madera respecto al haplotipo del Río Ucayali	62
Tabla n ° 20.- Distancias genéticas K2P entre los haplotipos de <i>P.tigrinum</i> provenientes del Alto Madera	63
Tabla n ° 21.- Divergencia genética entre las secuencias del Alto Madera y la única secuencia del Ucayali.	64
Tabla n ° 22.- Distancias genéticas K2P entre haplotipos de <i>C.monoculus</i> provenientes del Alto Madera.	65
Tabla n ° 23.- Comparaciones por pares de las distancias K2P entre haplotipos del Alto Madera y el haplotipo del Ucayali	65
Tabla n ° 24.- Cuantificación del grado de homoplasia existente en los grupos de secuencias Obtenidos para las especies en estudio	69
Tabla n ° 25.- Valores obtenidos para los test de neutralidad de Tajima y Fu & Li	70

Índice de Cuadros

Cuadro sinóptico n ° 1.- <i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier, 1818)	39
Cuadro sinóptico n ° 2.- <i>Piaractus brachypomus</i> (Cuvier, 1818)	40
Cuadro sinóptico n ° 3.- <i>Pygocentrus nattereri</i> (Kner, 1858)	40
Cuadro sinóptico n ° 4.- <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> (Linnaeus, 1766)	41
Cuadro sinóptico n ° 5.- <i>Pseudoplatystoma tigrinum</i> (Valenciennes, 1766)	41
Cuadro sinóptico n ° 6.- <i>Cichla monoculus</i> (Spix & Agassiz, 1831)	42
Cuadro sinóptico n ° 7.- <i>Astronotus ocellatus</i> (Agassiz, 1831)	42

RESUMEN

La filogeografía es una rama naciente del análisis de biogeografía histórica que combina los nuevos desarrollos en el análisis genético y filogenético con el análisis biogeográfico. Su potencial como instrumento analítico pero también como base para implementar nuevas estrategias de conservación de la biodiversidad ha sido ampliamente documentado en la literatura. El presente estudio tuvo por objetivo lograr un estimado preliminar de la filogeografía de siete especies de peces codistribuidos dentro de la Cuenca del Alto Madera (Amazonía Boliviana): *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Pygocentrus nattereri*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudoplatystoma tigrinum*, *Cichla monoculus* y *Astronotus Oscellatus*. A pesar del bajo número de muestras, se puso en evidencia varios puntos importantes para comprender la evolución de la ictiofauna en esta región. Entre las siete especies se encontraron cuatro patrones evolutivos. Dos patrones se refieren a linajes mitocondriales monofiléticos dentro del Alto Madera que pueden ser (*C.monoculus*) o no (*P.nattereri*) estructuradas. Los dos patrones restantes se refieren a su vez a linajes mitocondriales no monofiléticas en el Alto Madera: *P. fasciatum* y *P.tigrinum* presentan un bajo nivel de divergencia y una ausencia de estructuración mientras que *P.brachypomus* y *C.macropomum* representan poblaciones estructuradas. En todos estos casos se han podido poner en evidencia tres eventos (2 Ma., 0.8 Ma. y 0.7Ma.) de diversificación que involucran a por lo menos dos especies (respectivamente *P.brachypomus/C.monoculus*, *C.macropomum/ C.monoculus* y *P.nattereri/C.monoculus*) y un evento (1.1 Ma) que involucra a cuatro especies (*C.macropomum*, *P.brachypomus*, *P.nattereri* y *C.monoculus*). La respuesta a cada uno de estos eventos (relación geográfica de los nuevos linajes) fue diferente en cada especie. No se ha podido identificar ningún evento geológico asociado a estos procesos. Debemos notar que estos sucesos ocurrieron en su conjunto dentro del Pleistoceno incluyendo la transición Plioceno-Pleistoceno, acaso asociados a la formación de refugios o bien al establecimiento definitivo de la cuenca de drenaje del Alto Madera. Solamente se pudo identificar una característica ecológica relacionada con el patrón de diversificación de *C.monoculus*, ya que de manera aparente, la calidad del agua ha sido importante en la evolución de esta especie en la región. Se estableció también que una revisión de su taxonomía es indispensable.

ABSTRACT

Phylogeography is a novel approach to historic biogeography where new developments in genetics and phylogenetics met the biogeographic analysis. Its potential as an analytical instrument but also as a base to implement new strategies of biodiversity conservation has been widely documented on the scientific bibliography. This study aims to achieve a preliminary vision upon the Phylogeography of seven fish species codistributed over the Alto Madera (Bolivian Amazonía): *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Pygocentrus nattereri*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudoplatystoma tigrinum*, *Cichla monoculus* y *Astronotus Oscellatus*. In spite of a small sample size, we evidenced several important aspects that help us understand the evolution of this Neotropical species. Among the seven species we identified four evolutionary patterns. Two patterns are related to monophyletic mitochondrial lineages over the Alto Madera, a structured one (*C.monoculus*) and a non-structured one (*P.nattereri*). The two others correspond to non-monophyletic Alto Madera mitochondrial lineages: *P. fasciatum* and *P.tigrinum* presents a small level of divergence and lacks structure; instead, *P.brachypomus* and *C.macropomum* shows structured populations. Overall we have identified three diversification events (2 Ma., 0.8 Ma. y 0.7Ma.) that involves two species each (*P.brachypomus/C.monoculus*, *C.macropomum/C.monoculus* and *P.nattereri/C.monoculus*), and a particular event (1.1 Ma.) shared by four species (*C.macropomum*, *P.brachypomus*, *P.nattereri* and *C.monoculus*). The geographic pattern of appearance of new lineages is not shared by any one of the former. We couldn't identify a geological process associated with any of those events. But we conclude that they all happened during the Pleistocene including the Pliocene-Pleistocene boundary. These events could be associated with refuges formation or the establishment of the draining pattern of the Alto Madera. We identified ecological features as a potential cause for one of the patterns as water quality has been important on the evolutionary history of *C. monoculus* at least in this region. We also think that a taxonomical review of this species is needed.

INTRODUCCIÓN

La cuenca del Amazonas ofrece un potencial extraordinario para la investigación científica. En primer lugar, la amazonía presenta una diversidad de especies (α -diversidad) muy superior a la esperada en base a su superficie geográfica (Wu & Vankat 1995, Gascon et al. 2000). Esto se hace evidente si comparamos la información actual sobre el número de especies de peces presentes en la cuenca del Amazonas respecto a las presentes en las cuencas fluviales de dos ríos que han sido censados casi en su totalidad. Con una superficie de 7 050 000 Km², la cuenca del Río Amazonas cuenta con cerca de 3000 especies nominadas y descritas formalmente. El río Missisipi-Missouri tiene 375 especies en una superficie de 3.328.000 Km² (Lundberg 2001), es decir, un octavo del número de especies en una superficie cercana a la mitad de la del Amazonas. Por otra parte, el río Congo, equivalente africano del Amazonas, tiene en total 700 especies en una superficie de 3.457.000 Km².

En definitiva, el río Amazonas es desde el punto de vista de su riqueza ictiológica, el río más importante y sin embargo uno de los menos estudiados (Goulding et al. 1996, Lundberg 2001).

De acuerdo a Lundberg (2001), desde 1960 se habían descrito y nominado quince nuevas especies por año y esta tasa se incrementó en la década de los 90's hasta 50 especies por año. Esto es de fundamental importancia en vista de la determinación adecuada del número de especies presentes efectivamente en la cuenca hidrológica del Amazonas. Se han propuesto numerosas estimaciones preliminares de la α -diversidad de peces neotropicales, y en todos los casos se refiere que el recuento actual es severamente subestimado (Goulding et al. 1996, Vari et al. 1998, Martin et al. 2000). Así por ejemplo, Böhlke et al. (En Vari et al. 1998) establecieron un valor estimado de hasta 5600 especies, mientras que Schaefer (En Vari et al. 1998), apoyado en datos de las tendencias de descripción y nominación de especies durante los últimos veinte años, sugiere que el número de especies neotropicales puede llegar hasta las 8000. Esto querría decir que el continente Sudamericano posee el 24% de las especies de peces de agua dulce, concentrado en el 0.003% del agua dulce del planeta (Vari et al. 1998).

Más sorprendente que el nivel de diversidad específica que en todo caso representa la ictiofauna sudamericana, es que los mecanismos de aparición y mantenimiento de esta diversidad son hoy tan oscuros como lo eran en la época de los grandes exploradores como Humbolt y Wallace (Colwell, 2000). Aunque numerosas hipótesis se han propuesto para explicar dichos mecanismos (Haffer 1982, Simpson et al. 1978; Brown et al. 1979, Hooghiemstra et al. 1998, Loughheed et al. 1999, Colinvaux et al. 2000; Gascon et al., 2000; Ron, 2000; Colinvaux et al. 2001; Gascon et al. 2001), pocas han sido efectivamente analizadas y discutidas con objetividad. En muchos casos, la polémica ha primado sobre la voluntad de establecer propuestas sintéticas capaces de incorporar respuestas a casos particulares.

Un factor importante a ser tomado en cuenta es que de acuerdo a los registros fósiles, pero también de acuerdo a los estudios moleculares, la mayor parte de la diversificación de la fauna piscícola Neotropical es antigua. De hecho, mucho antes del Pleistoceno, el Amazonas estaba poblado por especies fuertemente relacionadas con las actuales. Ya a mediados del Mioceno (cerca de 15 millones de años atrás), la fauna piscícola amazónica era similar a la actual, en particular en lo que se refiere las familias **Serrasalminidae**, **Cichlidae** y **Pimelodidae**

(Lundberg, 1993, Gayet, M. et al. 2001), sujetos de investigación del presente trabajo. Se requiere por lo tanto tener en consideración fenómenos anteriores a los dos millones de años para buscar respuestas al grado de diversificación y a la biogeografía de los peces amazónicos a un nivel interespecífico (Lundberg,2001).

En términos de investigación científica, la ictiología Neotropical en general y en particular la de la cuenca del Amazonas, se enfrenta a dos problemas esenciales que son: la escasa disponibilidad de información filogenética entre los grupos taxonómicos superiores y dentro de ellos y la información fragmentaria respecto a la diversidad intraespecífica (polimorfismo). Las razones para esto: la enorme extensión del sistema acuático epicontinental y la escasez de recursos humanos y de infraestructura (Vari et al. 1998).

Esta tendencia se ha venido revirtiendo en los últimos años, a juzgar por estudios extensivos realizados sobre el orden **Perciformes** por Kullander (1998); Martin et al. (1998), Farias et al. (2000), Sides et al. (2000), Wilson et al. (2000), Orti et al.(2001), sobre el orden **Caraciformes** por autores como Vari (1988); Buckup (1991, 1993); Lucena (1993); Lundberg (1993); Ortí et al. (1996a,b, 1997a,b), Sivasundar et al. (2001), Dergam et al., (2002), Jegú et al. (en publicación), Hubert 2003 (datos no publicados), sobre el orden **Siluriformes** por Martin et al. (2000), Coronel (2001), Rivera (2003); así como sobre la familia **Anostomidae** (Renno et al. 1990), entre muchos otros.

Sin embargo, quedan todavía numerosos puntos a ser aclarados dentro de los tres principales ordenes de peces neotropicales: **Siluriformes**, **Caraciformes** y **Perciformes**; así como también en grupos secundarios como los **Gymnotiformes** y **Cyprinodontiformes** (Vari et al. 1998).

Es por esto que el presente estudio, enfocado a estudiar de manera comparativa la biogeografía histórica de siete especies de peces de agua dulce en la Cuenca del Alto Madera (*Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Pygocentrus nattereri*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudoplatystoma. tigrinum*, *Cichla monoculus*, *Astronotus crassipinis*) propone en primer término aportar datos a cerca de la estructuración genética poblacional (nivel intraespecífico) y proponer hipótesis explicativas preliminares a cerca de los patrones de estructuración genética puestos en evidencia.

Para lograr este objetivo se propone emplear genealogías de la región de control mitocondrial. Si bien este es el primer estudio en el cual se aplican estas técnicas analíticas en la Amazonía boliviana, el enfoque es reducido en términos de muestreo. La inclusión de muestras recubriendo toda el área de distribución tiene por objetivo incrementar la representatividad de los análisis.

Del mismo modo, se han elegido especies con rasgos de historia de vida contrastados para poder separar efectos estructurantes ecológicos de los históricos. Finalmente, habiéndose seleccionado tres grupos de especies filogenéticamente alejadas, el análisis de filogeografía comparada pretende enfocarse a fenómenos biogeográficos mayores que hayan podido estructurar la ictiofauna en su conjunto.

Hipótesis:

- H0: Cada una de las siete especies que presentan una distribución similar tienen una historia evolutiva única.
- H1: Las siete especies comparten una historia evolutiva común.

Objetivos:

Objetivo General.

Comparar la filogeografía de siete especies de peces de agua dulce de amplia distribución en la Amazonia boliviana en base a la secuenciación de la región de Control Mitocondrial.

Objetivos específicos

- Establecer las secuencias (aproximadamente entre 1000 y 1200 pares de bases) de la región de control del DNA mitocondrial
- Realizar el análisis molecular de las secuencias obtenidas (saturación, transversiones vs. transiciones).
- Calibrar la tasa de evolución de la región Dloop.
- Aplicar los diferentes modelos de análisis filogeográfico a los siete árboles filogenéticos.
- Establecer los árboles filogenéticos para cada una de las seis especies en función al área de colecta (Cladograma de área)
- Establecer la congruencia topológica de los árboles
- Establecer la congruencia temporal de los árboles obtenidos
- Establecer las mejores hipótesis que expliquen la estructura genética puesta en evidencia por los análisis filogeográficos.

CAPITULO PRIMERO

CONCEPTOS Y METODOS

EN

FILOGEOGRAFIA COMPARADA

La fusión de la filogenética con la genética de poblaciones y la biogeografía ha tenido un gran impacto en varias áreas de la biología evolutiva y de la ecología (Bernatchez & Wilson, 1998). El estudio de los patrones de variación genética en un contexto geográfico a través de árboles de genes (filogeografía), ha contribuido considerablemente a nuestra comprensión de los factores que han influenciado la estructura poblacional y la divergencia de las especies (Knowles & Maddison, 2002).

1.1.- Definición.

La filogeografía es un área de estudio involucrada con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genealógicos, en particular a nivel intraespecífico (Avice, 1998; Schaal & Olsen, 2000, Knowles & Maddison, 2002). Es un área de trabajo nueva cuyas primeras publicaciones remontan al año 1987 (Avice, 1998, Bermingham & Moritz, 1998). Probablemente la mayor contribución de los estudios filogeográficos haya sido el poner en evidencia la influencia dominante de la biogeografía histórica y de eventos demográficos en la formación de los patrones existentes de diversificación biológica (Bernatchez & Wilson, 1998; Moritz & Faith, 1998).

Las inferencias filogeográficas se derivan por lo general del estudio de la historia genealógica reconstituida para un gen y por lo tanto no necesariamente reflejan la historia evolutiva del taxón en investigación (Knowles & Maddison, 2002). En la historia de una especie, muchos eventos pudieron haber ocurrido, como ser fenómenos de expansión poblacional, efectos cuello de botella (Bottleneck), procesos de vicarianza y migración. Del mismo modo muchos linajes pudieron perderse por efectos estocásticos (extinción). Por esto, muchas veces la historia de una especie no es siempre fácil de inferir a partir de una genealogía de un solo gene. El principal reto de los estudios filogeográficos se constituye entonces en presentar una inferencia filogeográfica consistente con otros elementos biológicos y biogeográficos. Es así que un árbol génico puede emplearse directamente para hacer una inferencia o simplemente como una etapa intermediaria hacia la inferencia de un estimado histórico.

Por otra parte, el estudio biogeográfico de grupos de varias especies distribuidas a lo largo de áreas geográficas similares (filogeografía comparada) es un método poderosos para esclarecer eventos de vicarianza compartidos así como para el desarrollo de hipótesis explicativas bajo la forma de cladogramas de área (Bermingham & Moritz, 1998). Esta es la estrategia que seguiremos en el presente estudio

1.2.- El genoma mitocondrial en Filogeografía

1.2.1.- Origen y Función

Hasta donde se sabe, las mitocondrias tienen el mismo papel fundamental en todos los eucariotas que las poseen; participan en el metabolismo, la apoptosis, en el desarrollo de varias enfermedades y en el envejecimiento (Gray, Burger & Lang, 1999, Boore, 1999). Los estudios del DNA mitocondrial y de su expresión han afirmado ampliamente el origen eubacteriano de este genoma. Se han trazado los antecedentes de las mitocondrias hasta un antecesor único relacionado con la división α de las Proteobacterias. Las secuencias de los DNAs mitocondriales de los protistas han revelado un insospechado grado de caracteres primitivos compartidos, lo que ofrece una evidencia sólida de que todos los genomas mitocondriales actuales trazan su origen a un genoma protomitocondrial único (Gray, Burger & Lang, 1999; Gray, Burger & Lang, 2001)

1.2.2.- Estructura y herencia.

Muchos aspectos de la evolución genómica (Evolución de la organización, regulación génica, sistemas de procesamiento de los mensajes, y mecanismos de replicación) pueden ser investigados en las mitocondrias a un nivel de detalle y comprensión que no es todavía posible para los sistemas nucleares.

La biología molecular de los sistemas mitocondriales ha sido estudiada solo en el caso de algunos organismos considerados modelo, la mayor parte de la información proviene de algunos mamíferos y de *Drosophila*. Muchas de las observaciones iniciales se han vuelto casi axiomáticas, pero a medida que nuevas secuencias salen a la luz, se presentan excepciones. Por ejemplo, la premisa de que los DNAs mitocondriales se seleccionan en función a la economía de tamaño aunque probada en muchos casos, ha sido refutada por la descripción de genomas mitocondriales con grandes cantidades de secuencias no codificantes en artrópodos, moluscos y nemátodos (Boore, 1999; Gray, Burger & Lang, 1999)

Los estudios más recientes sobre el genoma mitocondrial han puesto en entredicho muchas de los supuestos casi axiomáticos sobre la estructura organización y funcionamiento del genoma mitocondrial. Aunque su rol genético parece haberse conservado de manera universal, exhibe una sorprendente variación en cuanto a su conformación y tamaño, así como en su contenido génico, la organización de sus componentes y sus patrones de expresión (Gray, Burge & Lang, 1999). Este genoma se halla contenido en una molécula covalente circular cerrada de tamaño pequeño (Meyer, 1993), aunque se han descrito también como moléculas lineales en ciertos grupos como las clases **Cubozoa**, **Schyphozoa** e **Hydrozoa**-cnidarios-(Gray, Burger &Lang, 1999; Boore, 1999). Las dos hebras del genoma mitocondrial se designan Ligera (**L**) y Pesada (**H**) Los nombres reflejan marcadas diferencias en el contenido G + C que resultan en una movilidad diferente en gradientes de Cloruro de Cesio. Con pocas excepciones, los genes que codifican proteínas se hallan en la hebra H . Solo el gen ND 6 junto a ocho tRNA's se codifican en la hebra L (Meyer, 1993; Bielawski & Gold, 2002)

El promedio de tamaño es de menos de $6 \cdot 10^3$ pares de bases (bp) en *Plasmodium falciparum* hasta más de $200 \cdot 10^3$ bp en algunas plantas (Gray, Burger & Lang, 1999); en los animales es de $16\,500 \pm 500$ bp. Las variaciones de tamaño a nivel intraespecífico son posibles y se deben por lo general a duplicaciones parciales o totales de la región no codificante. En los peces, es frecuente que las diferencias de tamaño a nivel intraespecífico sean equivalentes a las diferencias entre especies. Por lo general solo un tipo de DNA mitocondrial se halla en un mismo organismo (homoplasmia) pero se han reportado casos de heteroplasmia. Por lo general estos casos son el resultado de duplicaciones en tandem de alguna porción del genoma, con más frecuencia en la región de control. También se pueden dar reemplazos de bases individuales (Meyer, 1993; Brown et al., 1996; Cesaron et al., 1997; Nesbø et al., 1998; Boore, 1999).

El genoma mitocondrial es en regla general, haploide y no recombinante. En las plantas cuyo genoma mitocondrial es un verdadero mosaico ensamblado por transferencia horizontal existe efectivamente el proceso de recombinación (Meyer, 1993; Boore, 1999; Gray, Burge & Lang, 1999). La transferencia de genes entre las mitocondrias, los cloroplastos y el núcleo en plantas y fungi es común pero en animales se ha evidenciado solo en pocos casos. Todos los casos de transferencia horizontal involucran el paso de genes mitocondriales hacia el núcleo y nunca lo contrario (Meyer, 1993). De acuerdo a los trabajos de Gray et al. acerca de la evolución de este genoma se puede deducir que la existencia de genes mitocondriales en el genoma nuclear podría deberse, no a una transferencia entre ambos organelos sino al estado inicial de la célula eucariota ancestral como la fusión de una arqueobacteria y una proteobacteria (Gray et al., 1999 y Gray et al., 2001). El genoma mitocondrial es casi exclusivamente transmitido por línea materna, aunque se han reportado un promedio de 1/1000 excepciones).

1.2.3.- Composición y organización génica.

En los animales, usualmente se trata de un genoma pequeño (15 a 20 Kb.) que contiene 37 genes (Tabla n ° 1, Figura n ° 1).

Tabla n ° 1.- Genes típicamente hallados en los genomas mitocondriales.
(Meyer,1993 y Boore, 1999)

Elemento	Designación en animales	Sinónimos
Citocromo oxidasa.	COI, COIII, COIII	cox 1, cox2, cox3
Citocromo b	Cytb	cob
NADH	ND1-6, 4L	Nad 1-6, 4L
ATP sintetasa	A6, A8 o ATP6, ATP8	atp6, atp8
Subunidad Larga del	lrRNA	rln , 16S RNA
Subunidad corta del	srRNA	rns, 12S RNA
18 RNAs de transferencia especificando un aminoácido específico	Designación correspondiente del aminoácido en código de una letra	tRNAaa
Dos tRNAs para la	L (Codón CUN) y L	tRNA ^{Leu}
Dos tRNAs para la	S (Codón AGN) y S	tRNA ^{Ser}

El complemento génico típico, codifica 13 subunidades proteicas de las enzimas de la fosforilación oxidativa, dos RNA ribosomales mitocondriales (16SrRNA y 12SrRNA) y los 22 RNA's de transferencia (tRNA's) necesarios para la traducción de dichas proteínas. Los 37 genes hallados en el mtDNA animal, tienen homólogos en los genomas de plantas, fungi y protistas (Meyer, 1993; Boore, 1999); par aclarar algunas excepciones conviene referirse al trabajo de Gray, Burger et al. (1999). La inserción regular de los tRNAs entre los genes proteicos es interesante. Se ha sugerido que la estructura secundaria de estos tRNAs pueden servir como señales de puntuación durante la transcripción (Meyer, 1993)

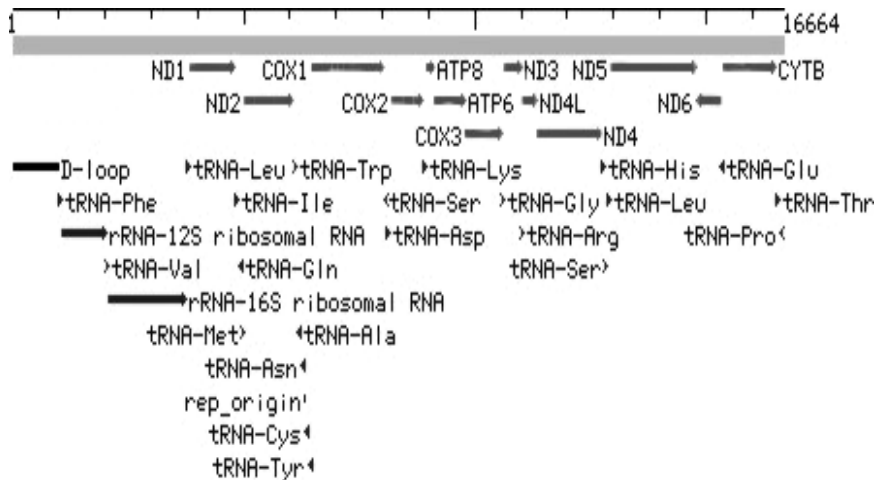


Figura n ° 1.- Organización lineal del genoma mitocondrial de *Salmo salar*
(Genoma mitocondrial de *Salmo salar*, Genbank, Número de acceso NC_001960)

Los genes que codifican proteínas incluyen componentes de los complejos respiratorios I, II, III, IV y V : Siete subunidades de la NADH deshidrogenasa, el Citocromo b, tres subunidades de la Oxidasa del Citocromo c y dos subunidades de la ATP sintetasa. Por lo general, cuando se hallan solo doce genes, el gene faltante corresponde a la subunidad 8 de la ATPasa. El funcionamiento de la mitocondria en realidad requiere de muchos más genes, la mayor parte de las proteínas son importadas desde el citosol. Se cree que esto es resultado de la transferencia progresiva del control genético al núcleo a partir un genoma mitocondrial ancestral más grande y complejo. El código genético es más degenerado y por lo tanto menos restringido que el nuclear. En este aspecto, no todos los códigos mitocondriales son iguales. Una de las principales diferencias se da al nivel del uso del codón TGA para el triptófano (en el genoma nuclear corresponde a un codón STOP) y el uso de ATA para la metionina y no para la Isoleucina (Meyer, 1993)

Existe también una región no codificante amplia y única que, por lo menos en algunos animales, posee los elementos de regulación de la transcripción y la replicación, por ello recibe el nombre genérico de **Región de Control**. Esta región se conoce también como la región del desplazamiento de horquilla o **Loop-D**, particularmente cuando nos referimos a los mamíferos. Muchos DNAs mitocondriales poseen otras regiones no codificantes de menor tamaño y de función aún desconocida (Boore,1999). En los vertebrados, la única secuencia no codificante adicional es una región de entre 31 y 34 bp ubicada entre el tRNA Asp y el tRNA Cys. En este lugar se halla el inicio de la replicación de la cadena liviana (Meyer, 1993).

El DNA mitocondrial de los animales es muy eficiente y raras veces contiene secuencias duplicadas. No contiene intrones y los espaciadores (secuencias cortas ubicadas entre los genes y que tienen una función de puntuación) no son mayores a 10 bp. Se ha sugerido que la compactación del genoma mitocondrial es responsable de la estabilidad en el orden de los genes en vertebrados, ya que la ausencia de intrones y de espaciadores grandes impide los reordenamientos.

Aunque se sabe que las secuencias de DNA mitocondrial en animales evoluciona rápidamente, la organización de los elementos por lo general permanece inalterada por largos periodos de tiempo evolutivo. Con pocas excepciones, esta organización es relativamente estable dentro de los grupos pero variables entre ellos. De hecho el estudio comparativo de los patrones de organización tiene un enorme potencial para resolver algunas de las ramas más profundas de la filogenia en los metazoos. (Meyer, 1993; Boore, 1999).

1.2.4- Evolución del genoma mitocondrial

El DNA mitocondrial ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de la genética de poblaciones y en la genética evolutiva. Durante la primera década de su uso en biología evolutiva, se trabajó bajo la premisa implícita de que el DNA mitocondrial era un marcador molecular neutral. En los años recientes ha habido un interés creciente en la investigación sobre como actúa la selección sobre este marcador (Rand, 2001)

1.2.4.1.- Teoría Neutral de la Evolución Molecular (Kimura, 1968, Kimura & Ohta, 1971, King & Jukes, 1969).

Las teorías Neo-Darwinianas iniciales asumían que todas las mutaciones afectarían la eficacia biológica y por lo tanto serían ya sea ventajosas o deletéreas, pero no neutrales. Por el contrario la Teoría Neutralista considera que, para muchas proteínas, las mutaciones neutrales sobrepasaban en número a aquellas que eran ventajosas pero que las diferencias en las proporciones relativas de los sitios neutrales tendrían influencia en las tasas de evolución molecular (Bromham & Penny, 2003).

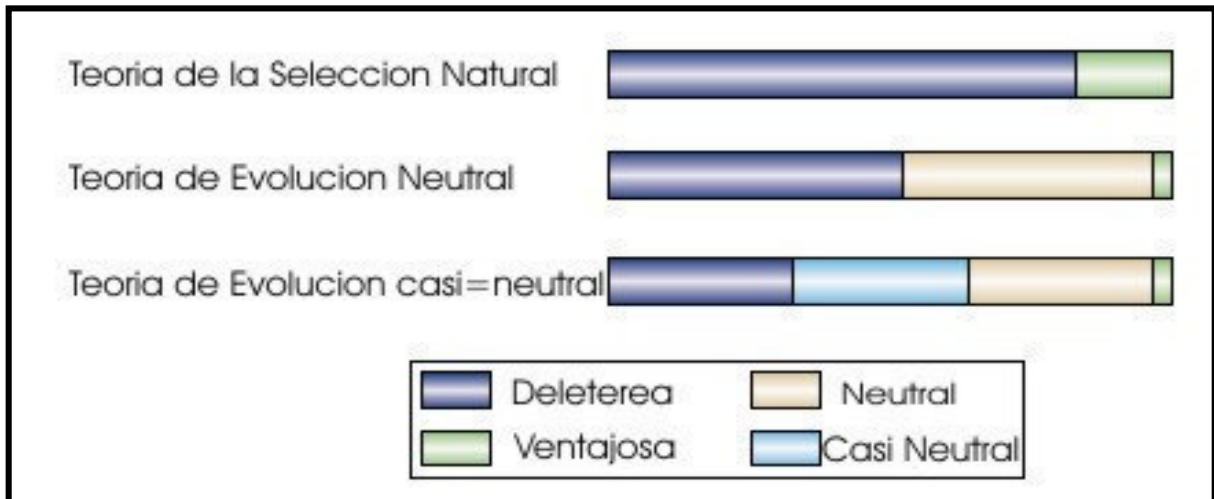


Figura n ° 2.- Teorías de evolución molecular (Tomado de Bronham & Penny, 2003)

Las dos primeras teorías son explicadas en el texto; en la Teoría de Evolución casi-neutral el destino de las mutaciones con un efecto positivo o negativo tenue dependerán de la historia del tamaño poblacional.

La teoría neutral de evolución molecular trata de explicar la magnitud del polimorfismo observado en poblaciones naturales: “una amplia proporción de la variación molecular dentro de las poblaciones es neutral o casi neutral”. Como resultado de ello, las tasas de sustitución de aminoácidos en una proteína o de nucleótidos en una molécula de DNA son casi constantes. Si esto fuese cierto para un amplio número de loci, la evolución de las proteínas y del DNA servirían como relojes moleculares. Entonces, el grado de diferenciación entre las especies sería una medida de su parentesco filogenético y por lo tanto la reconstrucción de filogenias en función a las diferencias genéticas se justificaría (Ayala & Kligler, 1980; Ayala, 1997)

Como quiera que el polimorfismo (nivel intraespecífico) es, en un contexto darwiniano, solo una fase transitoria de la evolución molecular (nivel interespecífico), estas observaciones se aplican tanto a los patrones de variación observados dentro como entre taxa a diferentes niveles.

La neutralidad estricta solo se cumple cuando se considera la evolución de pseudogenes o genes no codificantes. Los procesos evolutivos como la selección positiva, producen patrones no neutrales de variación molecular y son responsables de la evolución no neutral, mientras que patrones debidos a deriva, mutación o selección purificante son consistentes con la teoría neutral de evolución molecular (Gerber, Loggins et al., 2001).

1.2.4.2.- ¿Es el genoma mitocondrial un marcador neutral?

El apoyo inicial para asumir que la evolución neutral del mtDNA fue inferencial, en base a las diferencias entre las tasas de evolución mitocondrial de los genes nucleares y mitocondriales. En uno de los primeros reportes sobre la velocidad de evolución del genoma mitocondrial, Brown et al.(1996) lanzaron la hipótesis de que la tasa acelerada de cambio de secuencias en relación con los genes nucleares surge de las bajas restricciones funcionales de los productos de los genes mitocondriales, también de una elevada tasa de mutación, relajación de la selección purificante o de una combinación de ambos factores.

Avise (1998) por otra parte llegó a la conclusión que no hay una razón de peso para suponer que los marcadores mitocondriales usualmente empleados en los análisis genéticos no puedan ser interpretados como marcadores neutrales de los linajes maternos en los cuales residen. Y así lo entenderemos en el presente trabajo, sin embargo debemos mantener en mente que numerosos estudios de los últimos años han puesto en duda la neutralidad de esos marcadores en determinados linajes evolutivos.

1.2.5.- El genoma mitocondrial en filogeografía

Debido a algunas de sus características particulares, el DNA mitocondrial ha sido el caballo de Troya de los estudios de filogeografía (Bermingham et al., 1998; Gerber et al., 2001). Estas características son: su tamaño pequeño, su conformación covalente circular cerrada, el alto número de copias por cada mitocondria, la conservación de su contenido génico y de su organización interna, su tasa de sustitución nucleotídica superior a la del genoma nuclear, la ausencia de recombinación y su estricta transmisión por línea materna (Meyer, 1993; Bergstrom et al., 1998; Gerber et al., 2001).

Como resultado de esta configuración genómica, el DNA mitocondrial es un marcador molecular ejemplar en diversos niveles taxonómicos: presenta varios loci fácilmente amplificados por PCR incluso al cambiar de grupo de estudio, se pueden obtener datos de frecuencias y establecer genealogías de genes e incluso se puede aislar con cierta confiabilidad de material antiguo como ser muestras de museos, tejidos fijados y pieles secas (Sunnucks, 2000; Parker et al., 1998).

Los análisis de árboles de genes mitocondriales permiten evaluar de manera robusta una historia evolutiva compartida entre taxones. Más aún, debido a que el DNA mitocondrial permite la inferencia de una escala temporal de diversificación, se pueden evaluar hipótesis acerca del desarrollo cronológico de los eventos de vicarianza (Martin et al., 1998).

Muchas de las características antes citadas han sido sin embargo cuestionadas en los últimos tiempos, por el descubrimiento de numerosas excepciones algunas de las cuales ya fueron mencionadas. La reorganización de los genes parece ser más frecuente entre los taxa superiores de lo que se pensaba con anterioridad aunque dentro de los grupos, suele ser poco frecuente. Se han demostrado también algunos casos de transmisión paterna así como de eventos de recombinación intramoleculares aunque siempre en frecuencias muy bajas. También se ha puesto en evidencia que la tasa de sustitución nucleotídica es muy variable entre diferentes linajes lo que hace necesario calibrar con mucho cuidado los relojes moleculares (Gerber, Loggins et al., 2001)

A pesar de lo anteriormente mencionado, el DNA mitocondrial todavía es importante en el análisis de genética de poblaciones (medición del flujo genético, subdivisión poblacional, estimación del número poblacional efectivo) y en los análisis filogenéticos (reconstrucción de parentesco, estimación de tiempos de divergencia). Sin embargo, estos análisis se realizan bajo el supuesto de la variación selectivamente neutral del mtDNA, una suposición no siempre convenientemente evaluada (Gerber, Loggins et al., 2001). En todo caso, el nivel de polimorfismo y la distribución de los diferentes haplotipos del DNA mitocondrial deben ser interpretados en relación con la evolución del medio de vida de las especies, en este caso, la evolución de las cuencas hidrográficas.

CAPITULO SEGUNDO

EVOLUCIÓN DEL AMBIENTE DE LOS PECES NEOTROPICALES : FENÓMENOS ESTRUCTURANTES DE LA ICTIOFAUNA

La deriva continental y el control tectónico de la dinámica de los drenajes epicontinentales constituyen los dos elementos históricos fundamentales en el análisis biogeográfico de la cuenca Amazónica: construyendo la deriva continental el bosquejo general al establecimiento de los niveles taxonómicos superiores (familias y géneros). Bosquejo a partir del cual los eventos geológicos y climáticos ocurridos a lo largo del Mesozoico y del Cenozoico han ido afinando una imagen compleja (niveles taxonómicos inferiores).

Numerosas hipótesis han sido propuestas para tratar de explicar la diversidad específica actual de la cuenca Amazónica. La casi totalidad de dichas hipótesis suponen la existencia de eventos de especiación alopátrica. La polémica principal radica en la identidad, ubicación y datación de las barreras al flujo génico propuestas en cada modelo. Prácticamente ninguna hipótesis ha involucrado efectivamente los modelos de especiación alternativos (especiación parapátrica o simpátrica) en modelos la diversificación de la fauna neotropical. Entre los modelos esencialmente alopátricos, podemos citar por ejemplo el **Modelo de los Ríos Barrera** propuesto por Wallace en 1852, El **Modelo de la Isla**, y el **Modelo de los Refugios** de Haffer -1969, 1997-(En Moritz et al., 2000). Estos dos últimos modelos han sido probablemente los que han recibido mayor atención y aceptación. Otro modelo basado esencialmente en mecanismos alopátricos es el **Modelo de Perturbación-Vicarianza** de Bush (1994) y Colinvaux (1993). Entre los escasos modelos no-alopátricos podemos citar el **Modelo de los Gradientes** de Endler (1977), Rice et al. (1993), Smith et al. (1997), pero dichos modelos solo han sido evaluados en el contexto del estudio de la diversificación de la biota africana (Todas las citas provienen de Moritz et al., 2000).

2.1.- Hipótesis a cerca de la diversidad específica actual.

Como se mencionó anteriormente, se han propuesto numerosas hipótesis para tratar de explicar los patrones de diversidad específica existente en el Neotrópico, sin embargo, solo recientemente se están involucrando las técnicas moleculares al análisis de esta problemática.

Avise et al. (1998) compararon las duraciones de los eventos de diversificación derivadas de los estudios moleculares publicados hasta ese año tanto para linajes intra específicos como para especies gemelas tanto en poiquiloterms como en homeoterms. Pusieron en evidencia que aún siendo muy conservador en cuanto a las velocidades de evolución, la mayor parte de las especies gemelas aparecieron en periodos previos a los 1.8 millones de años.

Un dato interesante que surgió de dicho estudio fue la estimación del tiempo de especiación en los peces. Bajo un reloj molecular estándar (2% de divergencia por cada millón de años) se estima un periodo de especiación comprendido entre 2.3 y 1.8 millones de años, pero con un reloj ajustado a poiquilotermos, este periodo estaba comprendido entre 9.2 y 6.8 millones de años (Avisé et al., 1998). Esto es consistente con la noción de Lundberg (1998, 2001) por la cual 2 millones de años (Pleistoceno) es un periodo muy corto para la evolución de los peces; así mismo es consistente con las evidencias paleontológicas (Lundber et al.,1998; Lundberg,1998 y 2001; Murray, 2001) por las cuales gran parte de la ictiofauna actual ya se hallaba representada por lo menos en los registros fósiles del Mioceno. Incluso Gayet et al. (2001) han identificado en sedimentos de Pajchata (Bolivia) varios dientes fósiles morfológicamente especializados (Figura n ° 3) de aproximadamente 68 millones de años que ellos asignan como perteneciente a un representante de la sub-familia Serrasalminae (pirañas y pacús).

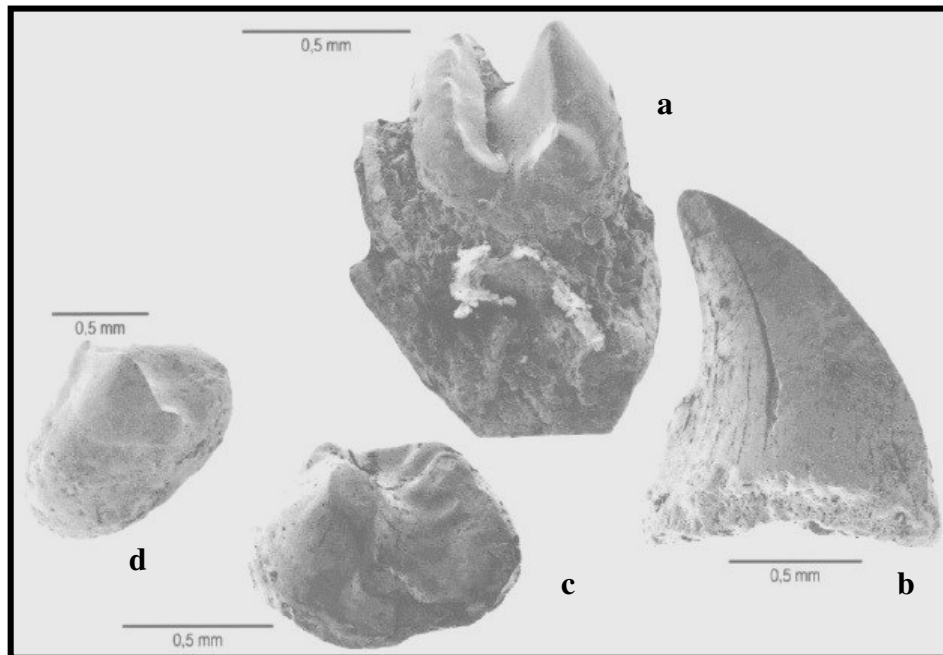


Figura n ° 3 .- Dientes fósiles asignados a la sub-familia Serrasalminae por Gayet et al. (2001).

a,b,c, dientes aislados de Serrasalminae indet.;d, diente premaxilar de Serrasalminae indet..

2.1.1.- Ríos Barrera.

Por otra parte, Cortes-Ortiz, Bermingham et al., (2003) en un estudio a cerca de representantes del género del mono *Alouatta* pusieron en evidencia que la historia de diversificación de este género de primates del nuevo mundo, se inició por efecto de vicarianza andina (6.8 millones de años), con la especiación más reciente fechada en 2.4 millones de años antes del presente. Esto es consistente con el establecimiento definitivo de la cuenca hidrográfica del Amazonas durante este periodo (Mioceno tardío). Un dato interesante que surge de este estudio se refiere al probable papel del Río Madera como barrera al flujo génico ya que este río constituye el límite natural a la distribución de *A.sebniscus* y *A.sara* (al este) y *A.nigerrima* (al oeste). Algo similar podría asumirse para *A. macconeli* y *A.belzebul*, brindando un fuerte apoyo a la Hipótesis de los Río Barrera introducida por Wallace en 1852.

Un estudio similar (Collins et al., 2000) había demostrado también la importancia de cambios geográficos de gran escala asociados con el levantamiento de los Andes y con cambios climáticos asociados a este fenómeno en la diversificación de género de primates neotropicales, *Ateles*. Este estudio sin embargo no pudo demostrar el rol de barrera por parte de ninguno de los ríos analizados.

La hipótesis de los Ríos Barrera, tampoco es consistente con los datos proporcionados por otros estudios, en particular el estudio de Gascon et al., (2000) sobre anfibios y pequeños mamíferos. En este estudio, la hipótesis de los Ríos Barrera es refutada para estas especies a nivel de la Amazonía Occidental (Cuenca del Río Jurúa); los patrones observados son más consistentes con fenómenos orogénicos como el desarrollo de los paleo arcos en dicha región (Räsänen et al., 1987; Räsänen et al., 1990; Räsänen et al., 1992). Resultados similares surgen del trabajo de Loughheed et al. (1999) sobre las ranas del veneno de flecha, *Epidobates femoralis*.

2.1.2.- Refugios del Pleistoceno

La suposición principal asociada a esta hipótesis propone que los cambios climáticos produjeron una contracción de los bosques húmedos en refugios separados por sabanas, resultando en un aislamiento que favoreció la especiación alopátrica (Figura n ° 4).

Inicialmente la hipótesis de los Refugios fue propuesta para los dominios Paleártico y Neártico, donde se aplica casi a la perfección para gran parte de la fauna y flora septentrional. Sin embargo, no ha tenido tanto éxito en el dominio Neotropical (Colinvaux, et al., 1996, Colinvaux et al., 2000; Lessa et al., 2003). Son numerosas las críticas tanto teóricas (Endler, 1982) como empíricas (Colinvaux et al., 1996; Avise et al., 1998; Jonson et al, 1999; Collins et al., 1999; Loughheed et al. 1999; Colinvaux et al., 2000; Eizirik et al., 2001; Lundberg, 2001; Cortes-Ortiz et al., 2003; Lessa et al., 2003).



Figura n ° 4 .- Mapa mostrando algunos de los refugios propuestos para varios grupos taxonómicos vegetales (Tomado de Prance (ed), 1982)

Hemos mencionado los estudios realizados por Avise et al. (1998) en un contexto de diversificación interespecífica. Dicho estudio, al igual que el de Collins et al. (2000) muestran que sin embargo, a nivel intraespecífico el Pleistoceno ha jugado un rol importante. También de acuerdo a Avise, los mecanismos de especiación no alopátricos (Simpatría y Parapatría) permiten que las duraciones de especiación sean menores, razones por las cuales sugerimos que se debería reevaluar el papel de las oscilaciones climáticas del Pleistoceno en un contexto evolutivo más amplio, incorporando dichos modelos alternativos de especiación.

Una variante alternativa a esta hipótesis es la “Vanishin Refuge theory” (Moritz et al., 2000). Mediante esta teoría, algunas poblaciones se diferenciaron al nivel de especie por efecto de selección direccional hacia la tolerancia de ecotonos a medida que las manchas de bosque húmedo se hicieron demasiado pequeñas para contener poblaciones viables. Actualmente el modelo ha sido ampliado para incluir eventos ocurridos durante el Terciario, al haberse determinado que las oscilaciones climáticas dirigidas por los ciclos de Milankovitch (Hays et al., 1976) fueron de magnitud temporal y de amplitud suficientes para promover la especiación (Moritz et al., 2000).

Dada la magnitud espacial y temporal del problema de la ictiología neotropical y la complejidad del sistema hidrogeográfico, no se puede esperar que una sola hipótesis sea capaz de dar respuestas congruentes para cada área geográfica y para cada grupo de organismos analizado. ¿Que implica esto para la ictiología neotropical?

Debido a que los peces de agua dulce dependen de las conexiones directas entre las cuencas para su dispersión y estrategias reproductivas, y dado que la historia de las interconexiones fluviales refleja el desarrollo geológico subyacente al paisaje ecológico, los análisis de biogeografía histórica permiten establecer inferencias importantes con relación a la evolución biótica y geológica de una región (Lundberg, 1993). De hecho, los ríos ofrecen una oportunidad particular debido a que establecen subdivisiones de los taxones en poblaciones discretas y permiten caracterizar la dinámica de dispersión a través de una región y su influencia sobre la diferenciación geográfica a cualquier nivel de organización (Bermingham et al., 1998).

Así para entender la diversificación de los peces de agua dulce en el dominio Neotropical es necesario tener en cuenta la historia natural de formación y establecimiento de las cuencas hidrográficas en el continente Sudamericano. Tres aspectos geológicos fundamentales deben ser analizados en conjunto: (1) la fragmentación del supercontinente Gondwana por deriva continental, (2) la naturaleza dinámica de la historia de formación de los drenajes continentales y (3) la formación de los Andes (Potter, 1997 y Lundberg, 1998). Eventos que detallaremos a continuación.

2.2- Historia de la construcción de las cuencas de drenaje actuales.

La historia de fundación de las cuencas de drenaje actuales abarca desde el Mesozoico (-245 a -68 millones de años, aproximadamente) hasta el Cenozoico (-68 millones de años hasta el presente). Dicho de otra manera, se inicia antes de la separación del supercontinente Gondwana por deriva continental (Potter, 1997).

2.2.1- Fragmentación De Gondwana

Este evento complejo (figura n ° 5) tendrá enorme influencia en la composición de la ictiofauna sudamericana y sobre su diferenciación posterior (Lundberg, 1993).

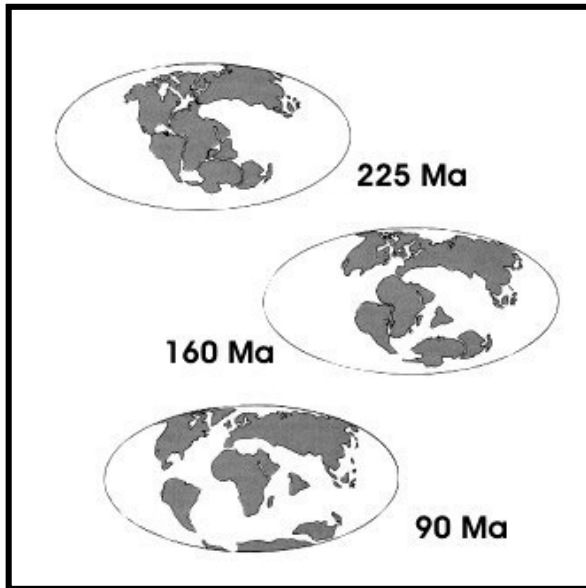


Figura n ° 5.- Deriva continental por efecto de la tectónica de placas desde hace 225 Millones de años (Ma). Se puede apreciar particularmente la asociación de larga duración entre África y América del sur y la insularidad estricta del continente Sudamericano durante casi 90 millones de años.

Biológicamente esto se traduce por la presencia en ambos continentes (África y América del sur) de varios taxa compartidos: **Dipnoos, Polypteridos, Osteoglosomorfos, Caraciformes, Siluriformes, Cyprinodontiformes, Nandidos, Cíclidos, Galaxidos y Sinbranquidos** (Lundberg, 1993). Sin embargo, en estos diferentes grupos esta historia compartida se expresa bajo patrones diferentes. Así por ejemplo, entre los **cíclidos** (figura n ° 6a), los linajes Neotropicales y Africanos constituyen grupos hermanos monofiléticos (Fariás et al., 2000). Por el contrario, entre los Caraciformes (Figura 6b), tanto los linajes Neotropicales como los linajes Africanos actuales son en apariencia polifiléticos. De hecho, aparentemente la elevada tasa de extinción que han sufrido algunos linajes africanos es responsable de este patrón (Orti et al., 1997).

Antes de iniciarse la separación y durante gran parte del Paleozoico hasta el Triásico tardío existieron mares interiores a lo largo del borde occidental de la plataforma sudamericana, algunos de los cuales estuvieron directa o indirectamente conectados al Océano Paleo-Pacífico. Incluso en la parte central de la plataforma, existieron probablemente mares interiores de ubicación cambiante y frecuentemente interrumpidos por periodos de erosión.

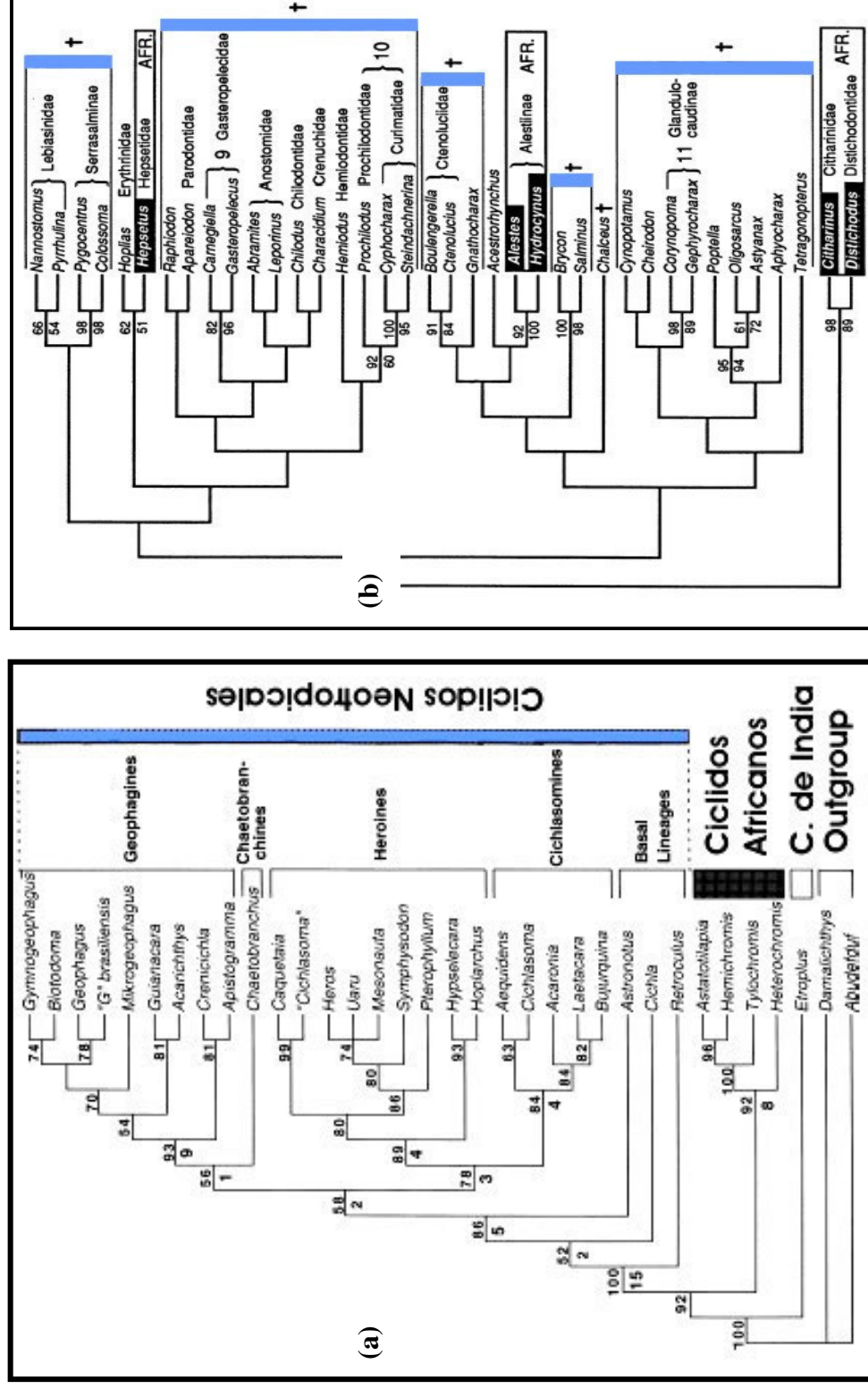


Figura n° 6.- Dos filogenias mostrando distintos patrones de diversificación consistentes con la separación de África y Sudamérica: En (a), Cíclidos: Diversificación posterior a la separación (Farias et al., 2000); En (b) Caraciformes: diversificación previa a la separación con fuertes extinciones de linajes en ambos continentes (Ortí et al., 1997); en azul, linajes neotropicales; † linajes neotropicales que se propone sufrieron fuertes extinciones

Aunque se desconoce la configuración exacta de los sistemas de drenaje durante este periodo, se cree que gran parte de la porción continental se hallaba bajo un clima árido y que no debieron existir grandes cursos de agua (Potter, 1997). Sin embargo, existe evidencia de la formación de cuatro sistemas de drenaje epicontinentales en Sudamérica: el Paraná, el Solimões, el Parnaíba y el Amazonas. Tanto el Solimões como el Paraná se desarrollaron sobre una zona de rift durante el Paleozoico -Figura n ° 7 (Goldblatt, 1993 y Potter, 1997).

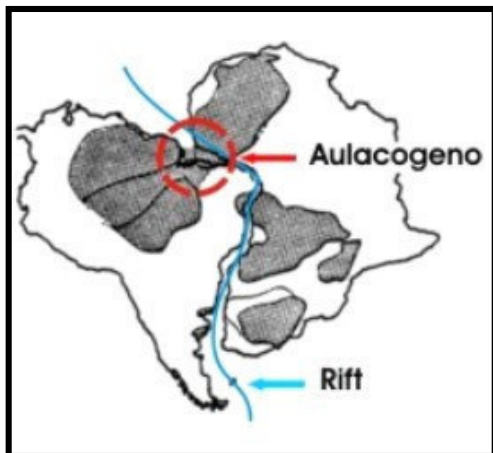


Figura n ° 7.- Inicio de la Separación de África y Sudamérica (aprox.135 Millones de años). Se destaca la separación por Rifting en dirección Sur a Norte y el Aulacógeno al origen de la desembocadura actual del Amazonas.

La separación de Sudamérica y África se acompañó de varios eventos fundamentales. En particular, un aulacógeno (el proceso de rifting involucra tres líneas o brazos de separación, de los cuales solo dos constituyen efectivamente la zona de fragmentación, el tercero permanece como una cicatriz o aulacógeno) estableció el punto actual de descarga del Amazonas hacia el Océano Atlántico (Figura n° 7). Por otra parte, varios eventos de levantamiento de tierra cerca al margen oriental establecieron un patrón de drenaje inusual en los Ríos de la costa sur-oriental de Brasil (caracterizado por un curso paralelo a la costa) así como en los afluentes orientales del Paraguay-Paraná (Potter, 1997). La historia fundamental de la fauna y flora neotropicales tiene entre sus puntos clave el momento en que el aislamiento del continente sudamericano se completa y acentúa por efecto de la deriva continental, hace cerca de 90 millones de años atrás.

Desde ese momento América del Sur se convirtió en un continente-isla de configuración dinámica compleja. Esta masa continental, a diferencia del continente Africano, mantuvo a grandes rasgos su ubicación latitudinal, algo que sin duda debió haber tenido efecto sobre la historia evolutiva de su biota. De hecho uno de los primeros intentos de explicar la diversidad biológica de la Amazonía, la Hipótesis del Museo, sugería que un clima tropical estable acompañado de una baja tasa de extinción sobre una superficie amplia habría permitido la acumulación de especies a lo largo del tiempo (Richardson et al., 2001). Esta supuesta estabilidad es improbable a juzgar por las evidencias actuales algunas de las cuales se verán en las secciones siguientes. Esta hipótesis a sido ocasionalmente retomada (Lessa et al., 2003).

A nivel de las cuencas de drenaje esta porción de historia es gobernada por la alternancia secuencial de cambios en los cursos de los ríos (Ruptura de conexiones antiguas, formación de nuevas conexiones, cambios en la dirección de los cursos de agua entre los más importantes) por efecto ya sea de transgresiones marinas de gran magnitud pero de influencia cada vez menor, o bien por eventos orogénicos ligados al borde de convergencia entre las placas de Nazca y la del Continente Sudamericano (Somoza, 1998).

2.2.2.- Primera Transgresión Marina (83-67 Millones De Años)

En el periodo comprendido entre los 83 y 67 millones de años antes del presente, se produjo una transgresión marina masiva tanto al norte como al sur del continente (figura n ° 8).



Figura n ° 8.- Primer evento de transgresión marina documentada hacia fines del Cretácico.

?, Conexión con el Pacífico propuesta por Nuttall en 1990
(Modificado de Gayet et al., 2001; Gregory-Wodzicky, 2000; Lundberg, 1998;
Potter, 1997).

Esta transgresión alcanzó su máximo aproximadamente hace 70 millones de años. Desde el mar Paleo-Caribe y hacia el sur, el océano penetró hasta la región que actualmente es el norte de la Argentina y Chile. Este proceso fue delimitado al occidente por la cadena proto-andina. Aunque algunos autores sugieren que habría también una conexión con el pacífico a la altura del Ecuador (Nuttall,1990; Potter, 1997). La existencia de esta conexión es todavía incierta (Gayet, 1993, Lundberg, 1998). La mayor parte de los cursos de agua dulce presentes en el continente por aquel periodo drenaban sus aguas hacia este océano somero. Un caso particular es el del Amazonas (figura n ° 8).

Durante todo este periodo y hasta fines del Mioceno el Amazonas estaba dividido en dos cuencas separadas gracias el Arco del Purus. Al este, el Amazonas era un curso de agua que drenaba sus aguas hacia el Océano Atlántico y al Oeste, el Río Solimões-Amazonas (Algunos autores lo denominan SANOZAMA, Amazonas escrito al revés) que descargaba sus aguas en el Océano somero mencionado anteriormente. Esta configuración del drenaje continental de agua dulce permaneció sin cambios hasta hace 8 Ma. Al sur, la transgresión marina alcanzaba el Sur del Brasil y sureste de Bolivia, cubriendo gran parte de la cuenca del Paraguay-Paraná. Sin embargo, la actual cabecera del Río Paraná generaba un curso de agua que liberaba sus aguas hacia el sur. No existe evidencia de conexión alguna entre estos dos océanos en medio de los cuales y delimitándolos se ubicaba la zona conocida como Sierras Pampeanas (Gregory-Wodzicki, 2000).

2.2.3.- Regresión Marina entre 67 y 61 millones de años

A medida que las aguas saladas se retiraban hacia el mar un curso de agua de dirección Sur-Norte se desarrolló colectando las aguas de numerosos afluentes de la región central del continente y descargándolas en el Mar Caribe (Figura n ° 9).



Figura n ° 9.- Restauración de los cursos de agua epicontinentales después de la primera transgresión marina , Paleoceno
(Modificado de Potter, 1997; Lundberg, 1998; Gregory-Wodzicky,2000)

La regresión de las aguas saladas no fue completa y el territorio que actualmente corresponde a Colombia permaneció bajo aguas saladas. Algo similar ocurrió al Sur. Esta fue probablemente una oportunidad importante de expansión para los peces restringidos al agua dulce o primarios (Murray, 2001) que debieron haber visto con anterioridad sus poblaciones fuertemente reducidas y aisladas por efecto de la masiva incursión de agua salada hacia las zonas continentales.

2.2.4.- Segundo ciclo de transgresión y regresión marina entre 61 a 43 millones de años atrás

Un segundo proceso de transgresión marina tuvo lugar hace 60 millones de años (Figura n ° 10). Se trató de un fenómeno de menor extensión que la anterior. Este fue sin embargo, el último evento que alcanzó la parte de los Andes Centrales. Desde entonces hasta el periodo actual, la porción de terreno actualmente asociado a la Amazonía boliviana estuvo libre de la influencia marina.

Figura n ° 10.- Un nuevo evento de transgresión marina recubre gran parte del continente Sudamericano a fines del Paleoceno.

(Modificado de Potter, 1997; Lundberg, 1998; Gregory-Wodzicky,2000)



En los siguientes 20 millones de años, la influencia marina fue mucho más restringida a la excepción de un evento de transgresión en la cuenca del Paraná en el periodo comprendido entre -60Ma y -43Ma (Figura n ° 11). Las características esenciales de este periodo constituyen, en primer lugar el mantenimiento de dos cuencas separadas a nivel del Amazonas y con direcciones de flujo opuestas. En segundo lugar, el establecimiento del Proto-Orinoco.



Figura n ° 11 .- A lo largo de gran parte del Eoceno, predominan los sistemas de agua dulce continentales

(Modificado de Potter, 1997; Lundberg, 1998; Gregory-Wodzicky,2000)

2.2.5.- Sistemas Fluvio-Lacustres entre los 43 y los 30 millones de años.

Durante el Oligoceno temprano, la alternancia de sistemas fluvio-lacustres en el sistema hídrico que drenaba hacia el Océano Paleo Caribe es la característica predominante. Son de fundamental importancia la formación del Lago Santa Lucía en los Andes centrales y del Lago Pozo (Figura n° 12) en la Región Nor-occidental.



Figura n° 12 .- Formaciones fluvio lacustres marcaron el Oligoceno temprano en Sudamérica

(Modificado de Potter, 1997; Lundberg, 1998; Gregory-Wodzicky,2000)

Dos eventos son importantes a nivel de los Andes Centrales y ambos tienen relación con procesos de levantamiento masivo de la cadena de los Andes y con la deformación de la placa continental a ese nivel por efecto de la rotación relativa de la convergencia de las placas de Nazca y de América del Sur. La primera es la pérdida de la influencia de las Sierras Pampeanas como frontera entre el Paleo-Amazonas y el Paleo-Paraná con la aparición del Arco Michicola.

El segundo se caracteriza por la propagación o engrosamiento de los Andes hacia el Este conformando el orocline Boliviano que define hoy en día el borde occidental de la frontera Amazonas-Paraná. En este proceso de desplazamiento surge una nueva frontera Paraná Amazonas más al norte del Michicola, el arco denominado Chapare Buttress.

2.2.6.-Incremento de la tasa de levantamiento de los Andes

El periodo contenido entre -30 y -20 Ma. es una de las principales fases orogénicas a nivel de los Andes (Figura n ° 13).



Figura n ° 13.- A fines del Oligoceno e inicio del Mioceno se produjo el periodo orogénico más importante en la historia geológica del continente Sudamericano.
(Modificado de Potter, 1997; Lundberg, 1998; Gregory-Wodzicky,2000)

Los Andes alcanzaron entonces la mitad de su elevación actual. Este evento no solo afectó el flujo de agua epicontinental, sino también alteró el patrón de dirección de las corrientes de los vientos estableciendo un cambio climático fundamental (Gregory-Wodzicki, 2000). El Altiplano que se había estado conformando como parte de las planicies de sedimentación es incorporado a los Andes (inicio de la construcción del sistema endorreico del altiplano). El Arco del Chapare Buttress reemplaza al Arco Michicola como frontera entre las cuencas del Paleo-Amazonas y Paleo-Paraná. Pero en la cabecera del Paraná se establece un sistema lacustre importante, el Lago Petaca. Existen eventos de transgresión marina pero muy localizadas y de escasa magnitud, particularmente en el Norte (Colombia-Venezuela) y en la desembocadura Atlántica de la porción Oriental del Amazonas.

2.2.7.- Sistema Lacustre del Lago Pebas durante el Mioceno

Entre 20 y 11 millones de años se forma un extenso sistema lacustre al Norte y Oeste, el Lago Pebas (figura n° 14),.

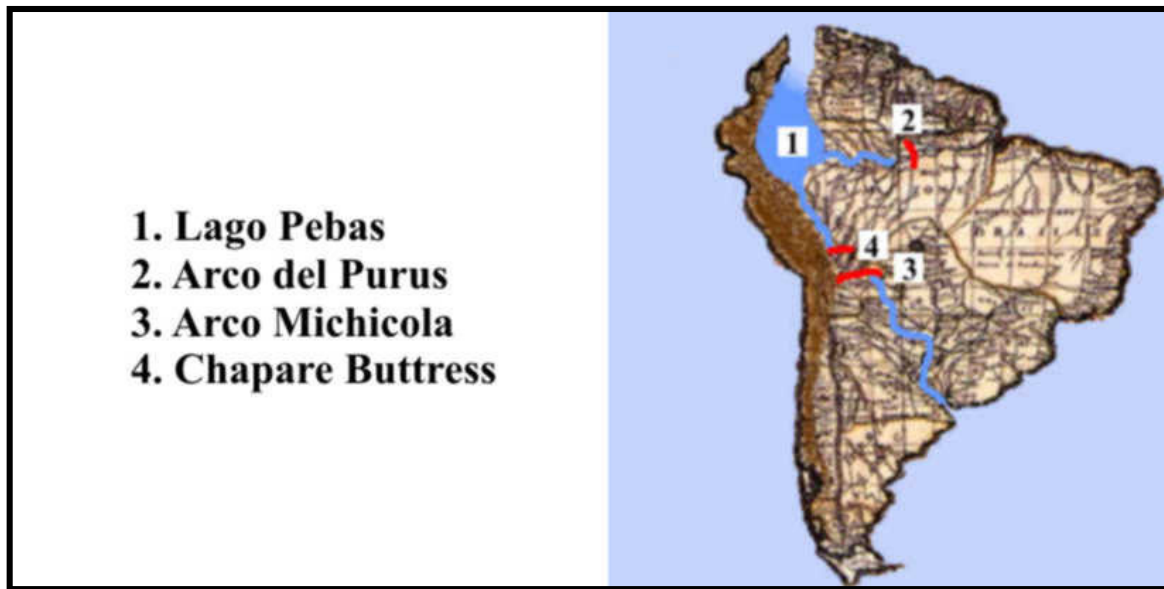


Figura n° 14.- El Mioceno ve la formación de un Sistema Fluvio Lacustre de magnitud al Norte del continente y el desplazamiento de las cabeceras de los ríos hacia el Este.

(Modificado de Potter, 1997; Lundberg, 1998; Gregory-Wodzicky, 2000)

Este sistema avanza lentamente hacia el este por efecto del continuo levantamiento de los Andes. Ese es un evento de gran importancia biogeográfica, principalmente en Colombia, Bolivia y Sureste del Brasil; Como lo prueban numerosos estudios a cerca de los más diversos grupos animales y vegetales (Avisé et al, 1998; Jonson et al, 1999; Colinvaux, et al., 2000; Eizirik et al. 2001; Cortes-Ortiz et al., 2003; Lessa et al., 2003).

Alrededor de los 12 millones de años y por efecto de un evento tectónico mayor, se establece un nuevo evento de transgresión marina tanto al norte como al sur. El Lago Pebas rellena casi la totalidad de la región de la Amazonía central, pero se trata de un sistema mixto complejo, con aguas saladas a salobres hacia el norte y aguas dulces hacia el este y sur (figura n° 15).



Figura n ° 15.- Formación del Lago Pebas
 (Modificado de Potter, 1997; Lundberg, 1998; Gregory-Wodzicky,2000)

La desembocadura oriental del Amazonas también se inunda con agua marina. Se inicia la Separación del Orinoco por el surgimiento del Arco Vaupres, y se culmina el aislamiento del Río Magdalena. Al Sur el Mar Paraneano alcanza a recubrir toda la porción de Bolivia ubicada al Sur del Arco Michicola. Al norte de este cuerpo de agua, se ha encontrado evidencias de sistemas lacustres sobre el Chapare Buttress (Gregory-Wodzicki,2000).

2.2.8.- Establecimiento de la configuración actual de los Andes y de las cuencas de drenaje del Orinoco, Amazonas y Paraná (culminación del Terciario, 10 millones de años hasta 1 .8 ma.)

Existe una regresión completa de las transgresiones marinas hacia 10-8 millones de años (figura n ° 16).



Figura n ° 16.- Establecimiento actual del Orinoco, Amazonas y Paraná.
(Modificado de Potter, 1997; Lundberg, 1998; Gregory-Wodzicky, 2000)

Los Andes sufren un nuevo periodo de aceleración en la tasa de elevación, lo que conduce por un lado a un incremento sucesivo de la sedimentación en las cuencas fluviales. Este evento es de fundamental importancia ya que la interacción de las cuencas de sedimentación y los arcos cratónicos determina una serie de cambios en la dirección y velocidad de los cursos de agua. Es un periodo con innumerables posibilidades de especiación alopátrica.

Hacia los 8 millones de años atrás el Orinoco se aísla completamente, la cuenca de sedimentación de la Amazonía central comienza a llenarse de agua y sedimentos y con el tiempo vence la resistencia del Arco del Purus, estableciendo el patrón de drenaje actual para al Amazonas.

También se reduce la influencia del Chapare Buttress y el Arco Michicola se convierte nuevamente en la frontera sur del sistema amazónico. En este corto periodo de tiempo los Andes se levantan entre 2000 y 3500 metros (Gregory-Wodzicki, 2000); marca también, el establecimiento de la principal sub-cuenca del Amazonas, la cuenca del Madera, aunque no en su configuración actual (Potter, 1997; Lundberg, 1998; Räsänen et al., 1987; Räsänen et al., 1990; Räsänen et al., 1992). Se han hallado evidencias de transgresiones marinas al norte de la Argentina en la desembocadura del Paraná-Paraguay (Gregory-Wodzicki, 2000). Hace 15 millones de años, el aislamiento del Altiplano es definitivo.

2.2.9.- Periodo Cuaternario (1.8 millones de años al presente)

El periodo cuaternario se caracterizó esencialmente por una serie de oscilaciones climáticas de gran escala. Prácticamente ningún evento geológico ha tenido impacto sobre la diversificación biológica durante este corto periodo de tiempo. Aunque existe evidencia que los Andes continúan en su proceso de elevación (Räsänen et al., 1987; Räsänen et al., 1990; Räsänen et al., 1992), la escala temporal es demasiado corta para poner en evidencia su efecto.

Probablemente los eventos climáticos que más han llamado la atención se refieren a la alternancia de periodos glaciares e interglaciares durante esta fase (Hays et al., 1976; Haffer, 1982; Ledru et al., 1996; Paillard, 1998, Zachos et al., 2001.) Estos cambios climáticos estuvieron al origen de una de las hipótesis propuestas para explicar la biodiversidad de la Amazonía que más se han analizado y que más acaloradamente se han confrontado con las hipótesis alternativas: **La Hipótesis de Los Refugios del Pleistoceno** (Haffer, 1982).

2.3.- Configuración Actual de América del Sur.

2.3.1.- Geología

El continente sudamericano esta conformado en la actualidad en esencia por dos áreas de material cristalino de edad Precámbrica, los escudos de Guyana y de Brasil ubicados al norte y nor-este, una extensa cadena montañosa (los Andes) al oeste y en medio de estos tres elementos, una enorme zona de sedimentación (figura nº17).



Figura n ° 17.- Geología General de América del Sur, con énfasis en los arcos cratónicos (sobre la base de Räsänen et al., 1987; Räsänen et al., 1990; Räsänen, Séller et al., 1992; Potter, 1998; Lundberg et al, 1998).

Los escudos de Guyana y de Brasil son dos elementos de edad precámbrica o escudos cratónicos. Un escudo cratónico propiamente dicho es un área de corteza continental que no ha sufrido actividad tectónica ni orogénica por un periodo geológicamente significativo, 10^8 a 10^9 años (Lundberg, 1998 y Potter, 1997).

Bordeando la costa occidental se elevan los Andes. Se extienden por 5000 Km y alcanzan su mayor ancho (700 Km) en los Andes Centrales de Bolivia. Su surgimiento ha sido determinado y controlado por la dirección y velocidad de la convergencia entre el continente y la Placa de Nazca. (Kennan et al., 1995; Lundberg, 1998; Potter, 1997, Somoza, 1998; Gregory-Wodzicki, 2000; Montgomery et al., 2001). El proceso incluyó varios eventos de levantamiento sucesivos pero discontinuos y de magnitudes variables, dando lugar a numerosas oportunidades para la especiación alopátrica de los diferentes componentes bióticos del continente (Lundberg, 1998; Potter, 1997).

Finalmente, entre los escudos precámbricos y los Andes, se hallan amplias cuencas de sedimentación, producto de la deposición de los sedimentos arrastrados por los Ríos que descienden de los Andes pero también del Escudo Brasileiro y de Guyana (Potter, 1997). Estas cuencas de sedimentación suelen ser interrumpidas y fragmentadas por arcos estructurales de origen y composición variados (Räsänen et al., 1987; Räsänen et al., 1990; Räsänen et al., 1992). Estos arcos constituyen barreras potenciales al flujo de agua. Fueron y son actualmente, responsables en muchos casos de determinar la dirección y velocidad del flujo de los Ríos y por ende de la diversificación de la fauna asociada a dichos cursos de agua como se verá más adelante.

2.3.2.- El río Amazonas y sus tributarios.

El continente sudamericano presenta cuatro cuencas hidrográficas principales de norte a sur (figura n° 18):



Figura n° 18.-Principales cuencas hidrográficas actuales de América del Sur
(En base a Lundberg,1998 y Potter, 1997)

- la cuenca del Orinoco (830 000 Km²) que abarca gran parte de Venezuela y Colombia;
- la cuenca del Amazonas (7 050 000Km²), que abarca el Norte y centro de Brasil, así como fragmentos del Norte de Bolivia y Perú, del Sur-Este de Ecuador, Sur de Venezuela Colombia y las Guyanas;
- la cuenca del Paraguay-Paraná (4 000 000 Km²) incluyendo al Norte de Argentina, gran parte del Paraguay, Sur y Sur-Este de Bolivia y Sur del Brasil;
- la Cuenca endorreica del Altiplano Boliviano y Peruano (3810 m.s.n.m.), que incluye al Lago Titicaca, el Río Desaguadero, el Lago Popoo, varios pequeños afluentes y otros lagos de altura (10 000Km²).

Existen también una serie de cuencas de menor superficie e importancia.

El Río Amazonas tiene un recorrido estimado entre 6 500m y 6 800m (Figura n ° 19). Nace a 5328 m.s.n.m. en el nevado Mismi (Departamento de Arequipa, Perú) como Río Carhuasanta con una dirección de desplazamiento hacia el norte, recolectando aguas de tributarios menores y adquiriendo en su recorrido varios nombres (Apurimac, Ene, Tambo) hasta convertirse en el Río Ucayali. A la altura de la ciudad Peruana de Iquitos el curso cambia hacia el este, ingresando en territorio Brasileiro donde adquiere el nombre de Solimões.

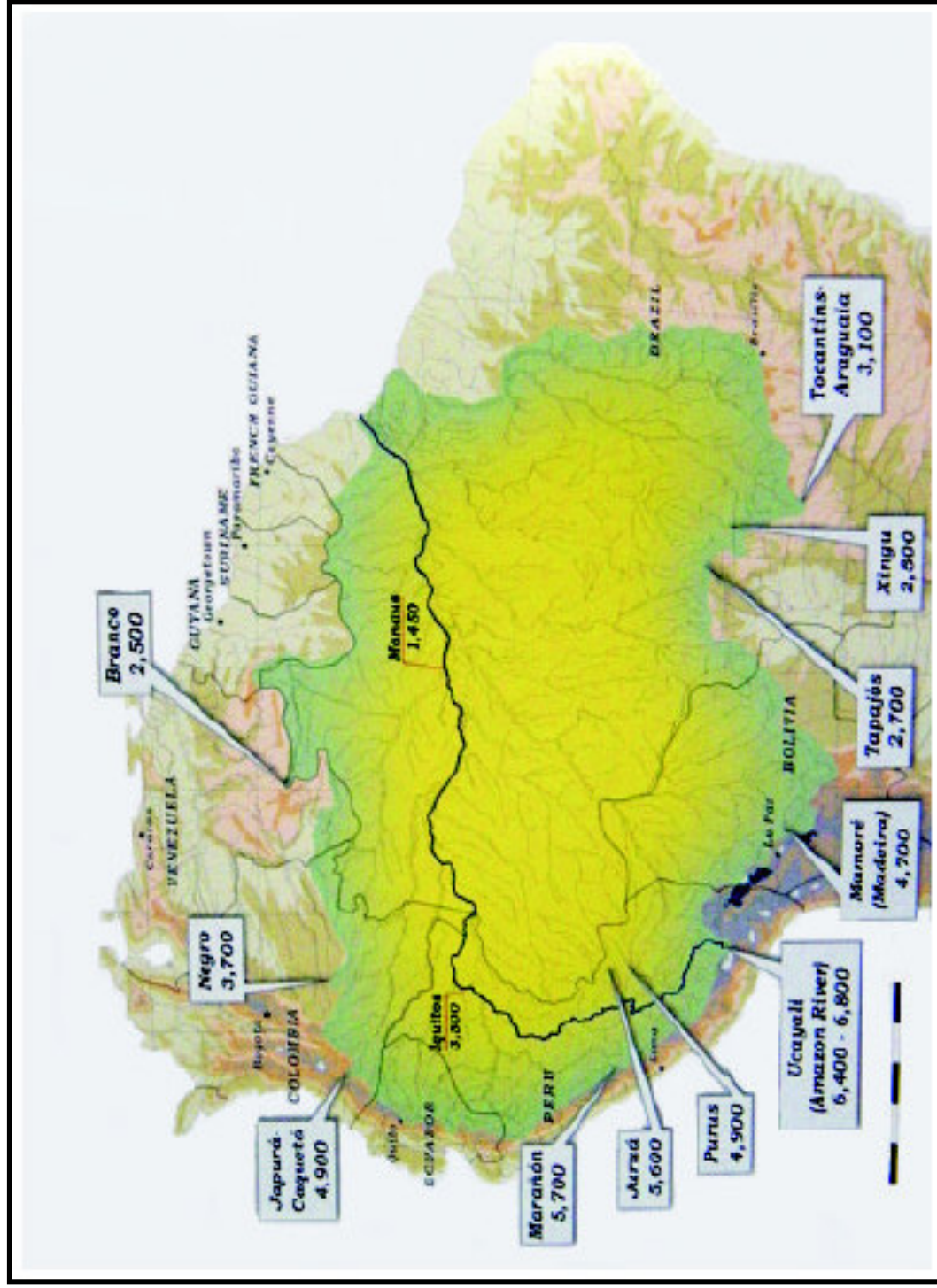


Figura n ° 19.- Cuenca hidrográfica del Amazonas

Antes de convertirse en el Río Amazonas, el Solimões colecta las aguas de los principales tributarios occidentales, respectivamente: Putumayo-Iça, Caqueta-Japurá, Negro-Blanco al Norte; Juruá, Purus y Madera, al Sur. En la región Oriental, los principales tributarios son: Trombetas, Tapajos y Xingu. Siempre desplazándose hacia el Este, el Amazonas desemboca sobre el Océano Atlántico en un amplio delta a los 0° de Latitud - Figura n° 20 (Goulding et al., 2003)

Aparte de la cuenca central del Río Amazonas, la cuenca incluye esencialmente 13 subcuencas tributarias (Tabla n° 2, Figura n° 20), siendo la principal la del Madera con una cobertura de 20.1% de la superficie total de la cuenca amazónica y que es responsable de aproximadamente el 25% de la descarga de agua sobre el Amazonas (Goulding et al., 2003)

Tabla n° 2 .- Superficie de cobertura de los principales tributarios del Amazonas
(Tomado de Goulding et al., 2003)

Subcuenca	(%)	Superficie (Km ²)
Madera	20.1	1 380 000
Tocantins	11.0	757 000
Negro-Blanco	10.1	696 808
Xingu	7.3	504 277
Tapajós	7.1	489 628
Purus	5.5	375 000
Marañon	5.2	358 050
Ucayali	4.9	337 519
Caqueta-Japurá	4.2	289 000
Juruá	3.2	217 000
Putumayo-Iça	2.2	148 000
Trombetas	1.9	133 930
Napo	1.6	109 915
Otros	15.7	1 078 000

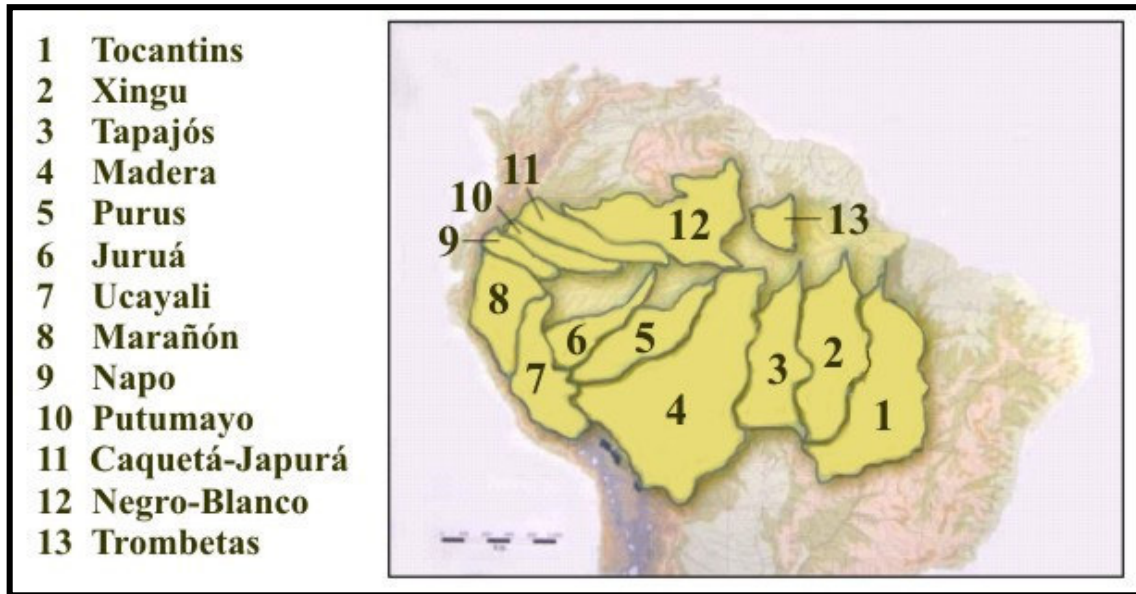


Figura n ° 20.- Representación de las trece áreas tributarias de la cuenca Amazónica
(tomado de Goulding et al., 2003)

2.3.- Conclusión.

La diversificación de la fauna amazónica es un área de estudio aún en nacimiento. Ninguna de las hipótesis propuestas ha dado todavía respuestas significativas más que para algunos grupos muy restringidos. En todo caso, la cuenca hidrográfica amazónica sin duda alguna ha sufrido numerosas perturbaciones en el transcurso de las eras geológicas. Parte de la información presentada en este trabajo se halla resumida en el siguiente cuadro recapitulativo (Tabla n ° 3).

Tabla n ° 3.- Mecanismos de especiación y su influencia sobre la diversificación de la fauna Neotropical

(En base a Bush, 1994 ; Haffer, 1982)

Mecanismo de especiación y modelo de diversificación		Allopátrica				No allopátrica			
		Dichopátrica (Vicarianza)	Peripátrica	Parapátrica	Simpátrica				
C e n o Z O i c O	Influencia temporal en Millones de años	Cambios paleogeográficos en la distribución de tierras y mares	Desarrollo de los sistemas hidrológicos	Fluctuaciones climáticas y/o vegetacionales Hipótesis de los Refugios del Pleistoceno	Dispersión de larga distancia	Hipótesis de los Gradientes			
								Formación del Istmo de Panamá e Intercambio de Fauna entre Norte América y Sud América	Procesos repetidos de cambios en el curso de los drenajes epicontinentales, aislamiento de afluentes, reclutamiento de nuevos cursos de agua por diferentes sistemas de drenaje.
	C u a t e r n a r i o	Holoceno	0 a 0,05Ma	Asilamiento de Sud América	Fragmentación de Gondwana	Influencia borrada por el tiempo y otros eventos	procesos de amplia duración	procesos de amplia duración	
									Plioceno
		Neogeno	Mioceno	23,7 a 5,3 Ma	Fragmentación de Gondwana	Influencia borrada por el tiempo y otros eventos	procesos de amplia duración	procesos de amplia duración	
			Oligoceno	36,5 a 23,7Ma					
		Paleogeno	Eoceno	57,4 a 36,5 Ma	Fragmentación de Gondwana	Influencia borrada por el tiempo y otros eventos	procesos de amplia duración	procesos de amplia duración	
			Paleoceno	66,4 a 57,4 Ma					
		Mesozoico	Cretácico	Tardío	97,5 a 66,4Ma	Fragmentación de Gondwana	Influencia borrada por el tiempo y otros eventos	procesos de amplia duración	procesos de amplia duración
				Temprano	144 a 66,4 Ma				

CAPITULO TERCERO: METODOLOGÍA

3.1.- Área de estudio

El presente estudio se enfocó en la zona del Madera (figura n ° 21a) y de manera más precisa en la porción boliviana de la Cuenca del Madera (figuras 21b y c), provincia biogeográfica del Acre-Madre de Dios según Navarro y Maldonado (2002).

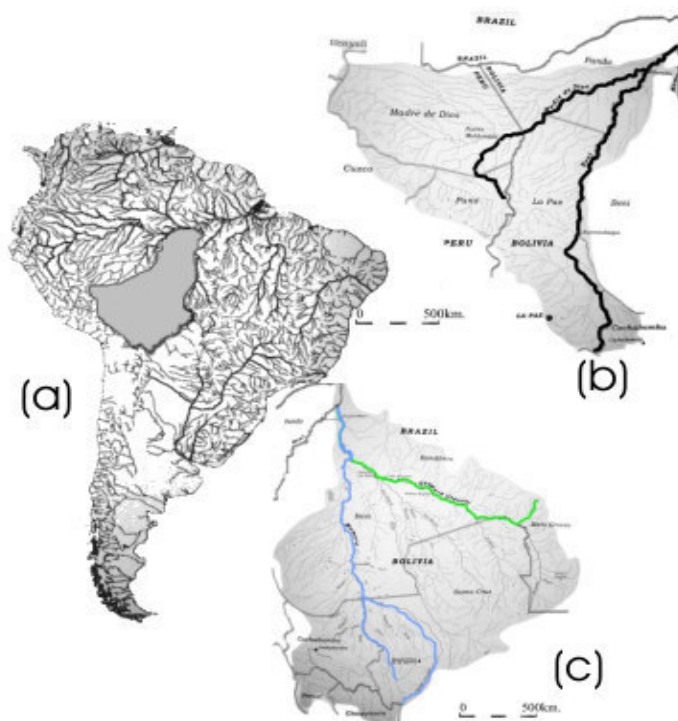


Figura n ° 21.- Cuenca Hidrográfica del Madera destacando la porción del Alto Madera
(a) Cuenca del Madera, (b) Subcuenca del Río Beni, (c) Subcuenca del Río Mamoré; En negro, Ríos Madre de Dios y Beni; en verde, Río Guaporé; en Azul, Río Mamoré.

Abarcando una superficie de 1 380 000 Km², el Valle del Madera cubre de manera aproximada un 20% de la Cuenca del Amazonas. Más del 50% de su extensión se halla dentro de territorio Boliviano (Alto Madera), donde drena las vertientes de los Andes, la vertiente occidental del Escudo Brasileiro y las planicies amazónicas. El Valle del Madera no solamente es la mayor cuenca tributaria del Amazonas con 25% del volumen de la descarga de agua anual (31,200 m³ s⁻¹), sino también la de mayor complejidad (Guyot et al., 1999; Goulding et al., 2003).

Las nacientes se hallan ubicadas en la parte andina más al sur de la Amazonía, en el occidente boliviano y en el Escudo Brasileiro. El promedio de precipitación es de entre 1 000 y 1 500 mm aunque en algunas zonas del pie de monte andino, puede llegar a los 5 000 ó 10 000 mm, en zonas muy estrechas y de fuertes pendientes. Este patrón genera ríos muy rápidos, turbios en época de lluvias y con oscilaciones en su profundidad de entre 5 a 7 metros.

Las zonas de inundación más grandes (180 000Km²) se hallan en la región de los Llanos de Mojos, en la parte central del departamento del Beni, la mayor parte de las cuales no sobrepasan una altitud de 300 m.s.n.m.. Los cursos de los principales tributarios son muy inestables, llegando a cambiar completamente en periodos de unos 100 años. Son frecuentes las lagunas en forma de herradura donde los procesos de especiación alopatrica podrían ser importantes.

Goulding et al. (2003) distinguen dos cuencas La cuenca del Río Beni (Figura n °21b) con sus principales afluentes, el Río Beni y el Río Madre de Dios y la Cuenca del Securé o Mamoré (Figura n °21c) con sus principales afluentes, el Río Securé o Mamoré y el Río Itenez o Guaporé.

Las muestras empleadas en el presente estudio corresponden a las dos subcuencas del Madera ubicadas en territorio boliviano (Alto Madera), tanto de los Ríos Manuripi (afluente del Madre de Dios, figura 22), Mamoré y Guaporé. Al mismo tiempo, se utilizaron muestras provenientes del Ucayali (Perú) como grupos geográficos externos así como algunas secuencias tomadas de Genbank, y originarias del Río Solimões (Amazonía Central, Brasil).

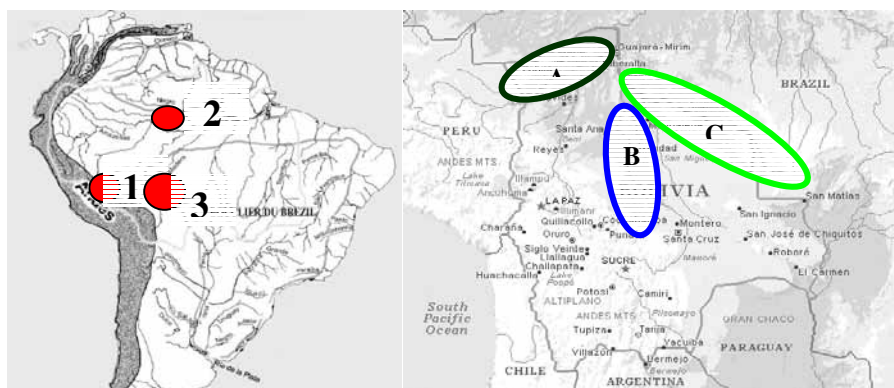








Figura n ° 22 .- Origen geográfico de las muestras empleadas en el presente estudio (1,Ucayalí; 2, Solimões; 3, Alto Madera; A, Manuripi; B, Mamoré; C, Guaporé)

3.2.- Especies.

Se analizaron muestras de siete especies, incluyendo, por cada especie, una muestra de origen geográfico externo a la Amazonía Boliviana, y tres muestra por cada uno de los ríos principales, es decir: Manuripi en la cuenca del Río Beni, Guaporé y Mamoré en la cuenca del Mamoré. Las siete especies en estudio corresponden a tres familias diferentes y muestran variantes importantes en cuanto a sus rasgos de vida. Las especies en estudio se presentan en los cuadros sinópticos siguientes (www.FishBase.org; www.itis.usda.gov).

<i>Cuadro sinóptico n° 1.- Colossoma macropomum (Cuvier, 1818)</i>			
Sistemática	Subfamilia	Serrasalminae	
	Familia	Characidae	
	Orden	Characiformes	
	Clase	Actinopterygii	
Status IUCN	AUSENTE DE LA LISTA ROJA		
Ambiente	Bentopelágico; agua dulce, Rango de pH 5,0 - 7,8; Rango de dH 20,0, profundidad -5m.		
Clima	Tropical 22-28°C, entre 15°S y 35°S.		
Biología	Esta especie es usualmente solitaria. Los adultos permanecen en los bosques inundados los primeros 5 meses de la inundación y consumen solamente frutos y granos. Los juveniles viven en aguas negras de las planicies de inundación hasta la madurez sexual y se alimentan de zooplankton, insectos, caracoles y plantas. Empleados en acuicultura porque pueden tolerar aguas pobres en minerales y oxígeno y por su resistencia a enfermedades. EL tiempo de duplicación de la población oscila entre 1,4 y 4,4 años (K=0,23)		
Importancia	Acuicultura, acuarios y pesca.		

Cuadro sinóptico n° 2.- <i>Piaractus brachipomus</i> (Cuvier, 1818)			
Sistemática	Subfamilia	Serrasalminae	
	Familia	Characidae	
	Orden	Characiformes	
	Clase	Actinopterygii	
Status IUCN	AUSENTE DE LA LISTA ROJA		
Ambiente	Pelágico; agua dulce; Rango de pH: 4,8-6,8; Rango de dH 15,0		
Clima	Tropical; 23-28°C; 23°N a 11°S		
Biología	Los juveniles se mimetizan con <i>Pygocentrus nattereri</i> . Se alimentan de insectos y plantas		
Importancia	Acuicultura, acuarios y pezca.		



Cuadro sinóptico n° 3.- <i>Pygocentrus nattereri</i> (Kner, 1858)			
Sistemática	Subfamilia	Serrasalminae	
	Familia	Characidae	
	Orden	Characiformes	
	Clase	Actinopterygii	
Status IUCN	AUSENTE DE LA LISTA ROJA		
Ambiente	Pelágico; agua dulce; Rango de pH: 5,5-7,5; Rango de dH: 20,0		
Clima	Subtropical; 23-27°C, 9°N-34°S		
Biología	Los adultos se alimentan en aguas abiertas de preferencia en el amanecer o anochecer. Se alimentan de insectos, gusanos y peces. Los individuos de tamaño mediano y grande se alimentan usualmente en la madrugada y en la tarde hasta las 2200H, mientras que los peces pequeños lo hacen durante el día. El reemplazo de los dientes permite una limentación continua. Tiene una capacidad auditiva muy evolucionada y exhibe un comportamiento de cacería al acecho. Muestra jerarquías en pequeñas escuelas		
Importancia	Acuarios		



<i>Cuadro sinóptico n° 4.-Pseudoplatystoma fasciatum (Linnaeus, 1766)</i>		
Sistemática	Familia	Pimelodidae
	Orden	Siluriformes
	Clase	Actinopterygii
Status IUCN	AUSENTE DE LA LISTA ROJA	
Ambiente	Aguas dulces, Rango de pH: 6,0-8,0; Rango de dH: 4,0-3,0; rango de profundidad -5M.	
Clima	Tropical; 24-28°C; 8°N a 11°S	
Biología	Se presenta en la mayor parte de los lechos de los ríos y a veces en las áreas inundadas de los bosques. Su biología es similar a la de <i>P. tigrinum</i> pero parece ser más afecto a los brazos más oscuros. Se alimenta por las noches, de peces y cangrejos. Restringe sus actividades de forrajeo a los lechos de los ríos. Las hembras son sexualmente maduras hacia los 56 cm. y los machos a los 45cm. La fecundidad se estima en 8 millones de huevos por kg.	
Importancia	Commercial, pesca deportiva, acuarios	



<i>Cuadro sinóptico n° 5.- Pseudoplatystoma tigrinum (Valenciennes, 1766)</i>		
Sistemática	Familia	Pimelodidae
	Orden	Siluriformes
	Clase	Actinopterygii
Status IUCN	AUSENTE DE LA LISTA ROJA	
Ambiente	Aguas dulces; Rango de pH: 6,2-7,2; Rango de dH: 20,0	
Clima	Tropical 22-26°C	
Biología	Ocurre en zonas de estuarios, por lo general por encima de los primeros rápidos hasta las cabeceras. Especie nocturna que vive en los lechos, así como los bosques inundados, en particular cuando son juveniles. Peces piscívoros oportunistas, pueden alimentarse de crustáceos. A fines de la estación seca realizan migraciones tróficas. Regresan al fines de la estación de las lluvias. Es el pez capturado por redes más importante en los Ríos Guaporé y Mamoré	
Importancia	Commercial, pesca deportiva, acuarios	



Cuadro sinóptico n° 6.- <i>Cichla monoculus</i> (Spix & Agassiz, 1831)			
Sistemática	SubFamilia	Cichlinae	
	Familia	Cichlidae	
	Orden	Perciformes	
	Clase	Actinopterygii	
Status IUCN	AUSENTE DE LA LISTA ROJA		
Ambiente	Bentopelágico; agua dulce; Rango de pH : 7.0		
Clima	tropical; 25-28°C		
Biología	Estos peces se alimentan de pequeños peces a lo largo de los bordes. Los juveniles se alimentan de crustaceos mientras que los adultos son casi exclusivamente psicívoros. Los machos son sexualmente maduros después de un año, mientras que las hembras maduran después de dos años. Durante la reproducción no presenta una estacionalidad marcada, los machos grandes desarrollan una joroba frontal y se vuelven territoriales		
Importancia	Acuarios, Pezca deportiva		

Cuadro sinóptico n° 7.- <i>Astronotus crassipinis</i> (Agassiz, 1831)			
Sistemática	SubFamilia	Astronotinae	
	Familia	Cichlidae	
	Orden	Perciformes	
	Clase	Actinopterygii	
Status IUCN	AUSENTE DE LA LISTA ROJA		
Ambiente	Bentopelágico; agua dulce; Rango de pH :6,0-8,0; Rango dH: 5,0-19,0		
Clima	Subtropical; 22-25°C		
Biología	Habita preferiblemente aguas bajas quietas. Se alimenta de peces pequeños, gusanos y larvas de insectos. Bastante popular entre los acuaristas pero no entre los acuaculturistas debido a su crecimiento lento.		
Importancia	Pezca comercial, Pezca deportiva, acuarios		

Los rasgos característicos de la biología de las siete especies se sintetizan en la siguiente tabla resumen:

Tabla n ° 4.- Rasgos de vida característicos de las siete especies de peces involucradas en el presente estudio.

Especies	Vagilidad	Relacions tróficas
<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	Grandes migradores	Piscívoros
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Grandes migradores	Piscívoros
<i>Colossoma macropomum</i>	Migradores	Frugívoros-herbívoros
<i>Piaractus brachipomus</i>	Migradores	Frugívoros-herbívoros
<i>Pygocentrus nattereri</i>	Sedentarios	Piscívoros
<i>Cichla monoculus</i>	Sedentarios	Piscívoros
<i>Astronotus ocellatus</i>	Sedentarios	Piscívoros

3.3.- Colecta y preservación

Las muestras fueron colectadas por el proyecto “Interacción-Genoma-Población-Medio Ambiente en peces de la Amazonía Boliviana” en el periodo comprendido entre los años 2000-2002. Las colectas se efectuaron mediante redes agalleras de entre 50 y 110 mm para las especies de carácidos y de pimelodidos. La colecta de especímenes de *Cichla monoculus* y *Astronotus crassipinis* se efectuó mediante pesca con línea y zagalla.

Se cuenta con replicas de tejido muscular de las muestras conservado en etanol absoluto en los laboratorios del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (UMSA-La Paz-Bolivia).

3.4.- Técnicas de laboratorio

3.4.1.- Extracción y purificación

Se realizó la extracción del material genético total (DNA cromosomal y DNA mitocondrial) por medio del Kit QIAGEN DNeasy™ Tissue Kit 250 .

3.4.2.- Amplificación por PCR y secuenciación

- **Amplificación por PCR:** Se restringió el análisis a la región de control mitocondrial (Dloop) amplificada por PCR bajo condiciones estándar (1.5mM MgCl₂ 0.2mM dNTP's, 20pmoles de cada cebador) con un exceso (0.10 unidades/μl) de Taq DNA polimerasa (Promega®) en un termociclador Hybaid®. Se realizaron 30 ciclos de amplificación sobre la base del perfil siguiente : 2 minutos a 95° C, una vez; 1 minuto a 95° C, 1 minuto a 60° C, 1 minuto 30 segundos a 72° C, por 30 repeticiones; 5 minutos a 72° C, una vez. Los cebadores empleados fueron DL20R y DL20F diseñados por Agnèse,J.F. (Com.pers.; datos no publicados) y el par HN20 - LN20. El fragmento de amplificación tiene tamaños que varían según las especies entre 1000 y 1200 pares de bases. La calidad de los productos de amplificación (banda única y evidente) y su tamaño fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en tampón TBE, empleando como estándar de peso molecular el Marcador **SmartLadder** Small Fragment (Escalera de 100 bp)
- **Secuenciación:** Las muestras, diluidas en etanol absoluto conteniendo 0.5mM Acetato de Amonio fueron transportadas al Laboratorio **Genome, Population, Interactions, Adaptations** en la Universidad de Montpellier-II (**GPIA/UM-II**, Director, Dr.François Bonhomme). Un primer grupo de muestras fue secuenciado en este laboratorio como un ensayo preliminar. Un segundo grupo fue encaminado a la compañía de secuenciación **Genome Express** (Grenoble, Francia). En ambos casos las secuencias se obtuvieron por secuenciación automática empleando el método de dideoxinucleótidos. Se emplearon en este caso los cebadores DL20F et DL20R.

3.5.- Análisis de los datos

3.5.1.- Edición y alineación de las secuencias

El análisis filogeográfico de las secuencias requiere no solamente el trabajar con moléculas homologas (en este caso las secuencias de DNA de la región de control-D Loop) sino además que los caracteres (los nucleótidos) presenten una homología de posición: los nucleótidos observados en una determinada posición entre diferentes secuencias deben ser descendientes directos de un nucleótido ubicado en la misma posición en una secuencia ancestral. Para lograr esto por lo general se deben introducir en las secuencias eventos de inserción y remoción nucleotídicas para incrementar la verosimilitud de que los nucleótidos en una posición determinada sean en efecto homólogos. Este proceso es denominado alineación.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas manualmente empleando el editor de secuencias GeneDoc (Nicholas, K.B. et al., 1997). En este proceso se utilizó como criterio de alineamiento la mayor probabilidad de tener eventos de transición (reemplazo de purinas por purinas o de pirimidinas por pirimidinas) que eventos de transversión (Reemplazo de purinas por pirimidinas y viceversa), incluyéndose la menor cantidad posible de inserciones y deleciones (indels). Los parámetros generales como composición de bases, número de sitios variables, sitios informativos para parsimonia, recuento de transiciones, recuento de Transversiones, Tasa Transición/Transversión (κ) se evaluaron mediante el programa MEGA versión 2.1 (Kumar, Tamura et al., 2001). Las distancias genéticas entre las secuencias fueron evaluadas por el método de “Dos Parámetros de Kimura” donde las sustituciones de transición y de transversión ocurren con tasas diferentes pero las frecuencias de las bases permanecen iguales (Hillis et al. (Eds.) 1996).

La naturaleza de los productos secuenciados fue evaluada realizando *on-line* mediante un análisis de comparación *Nucleotide Blast* sobre la base de datos Genbank. Se identificaron de dicha manera secuencias de la región DLoop en otras especies de peces, sobre la base de las cuales se identificaron manualmente regiones conservadas de homología, las llamadas *Conserved Sequence Box* (CSB) (tabla n° 5) por comparación con secuencias publicadas.

Tabla n° 5 .- Comparación de los elementos de las secuencias conservadas del DNA mitocondrial entre varias especies de peces (modificado de Nesbø et al. 1998)

Elemento	Especie	Secuencia
CSB-D	<i>Perca fluviatilis</i>	TTCCTGGCATT TGGTTCC
	<i>Ciclido-a</i>	TTCCTGGCATCTGGTTCC
CSB-1	<i>Perca fluviatilis</i>	ATCTTAGGATATCAAGAGCATAA
	Cíclidos	CATAACTGATATCAAGAGCATAA
	Salmónidos	ATACTTGGATATCAAGTGCATAA
	<i>Gadus morhua</i>	ATTAAAGTTTTTCAAGAGCATAA
	<i>Protopterus dolli</i>	ATCATATTTTCAACAGTGAACATAA
CSB-2	<i>Perca fluviatilis</i>	TAAACCCCCCTACCCCCC
CSB-3	<i>Perca fluviatilis</i>	TGAAAACCCCCGGAAACA

La manera usual de expresar las diferencias en la composición de bases es la comparación entre la frecuencias de nucleótidos [G + C] y [A + T]. Este componente está relacionado con el mecanismo subyacente de evolución molecular de las secuencias. Así por ejemplo la región de control mitocondrial tiene ciertas restricciones funcionales que favorecen una composición [A + T] elevada. Por otra parte las secuencias conservadas están relacionadas con el inicio o finalización de la replicación y en ello su composición [G + C] es determinante. Por otra parte en los análisis filogenéticos el análisis de la composición nucleotídica puede ayudar a mejorar la calidad de la inferencia filogenética permitiendo incrementar la complejidad del modelo empleado (Li, 1997 y Page et al., 1998). Decidimos incorporar el análisis de composición G+C como parte de la descripción de las secuencias establecidas en el presente estudio.

3.5.2.- Análisis filogenéticos

3.5.2.1.- Medidas de distancia genética y Análisis de saturación

El modelo de sustitución nucleotídica “Dos Parámetros de Kimura” (K2P) incorpora la observación de la tasa de acumulación de transiciones por sitio (α) es diferente de la tasa de acumulación de las transversiones (β), dando como valor total de la tasa de sustituciones por sitio de $\alpha + 2\beta$ (por cada nucleótido hay tres posibles cambios, uno de ellos es una transición mientras que dos son transversiones). La tasa de transición : transversión se representa por lo general con la letra kappa (κ).

La relación entre el número de diferencias nucleotídicas y el tiempo transcurrido desde su divergencia no es lineal sino que disminuye debido a la ocurrencia múltiple de sustituciones nucleotídicas en el mismo sitio. A medida que más sustituciones se acumulan entre dos secuencias la probabilidad de que un sitio haya cambiado dos o más veces se incrementa. Como resultado, las sustituciones más recientes tienen poco o ningún impacto en el número total de diferencias entre las secuencias: se dice que las secuencias han alcanzado la **saturación**.

Se han utilizado dos métodos filogenéticos para establecer las genealogías : el método de “*Unweighted pair group method with arithmetic means*” (UPGMA) y el método de máxima parsimonia (MP). Se utilizó también el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood). Pero solo se presentarán los resultados de los dos primeros métodos.

El método UPGMA es uno de los pocos métodos de construcción de árboles que produce un árbol ultramétrico. Un árbol ultramétrico es un caso particular de árbol aditivo (un árbol aditivo contiene valores asociados a la longitud de las ramas que corresponden a algún atributo de las secuencias, como por ejemplo la cantidad de cambio evolutivo), en este caso, todas las ramas terminales son equidistantes de la raíz, lo que es equivalente a utilizar un reloj molecular (Swofford et al., 1996, Page et al., 1998).

La Parsimonia Máxima consiste en encontrar el o los árboles que minimizan el número de eventos evolutivos (transformaciones de un carácter en otro) que se requieren para explicar un grupo de secuencias. Este análisis emplea la información contenida en el estado de los sitios (nucleótidos variables) y no así las distancias genéticas (UPGMA). En este último caso, se empleó el algoritmo de Wagner en el cual los eventos de aparición y desaparición de un carácter tienen la misma probabilidad de ocurrir. La topología del árbol consenso representa los nudos encontrados mayormente en los diferentes árboles de parsimonia equivalentes (Swofford et al., 1996).

En todos los casos se empleó el método de bootstrapping para dar una estimación de la confiabilidad de la topología. El bootstrapping realiza una serie de pseudoreplicas de la

matriz de secuencias por muestreo con reemplazo de los nucleótidos originales (en este caso 1000 replicas) a partir de las cuales se establece un igual número de árboles que son comparados entre sí. Las bifurcaciones que se presentan en más de un 50% en el conjunto de todos los árboles se consideran como confiables (Page et al., 1998).

Se establecieron los árboles de los diferentes haplotipos observados mediante los métodos filogenéticos de UPGMA mediante el paquete informático MEGA versión 2.1 (Kumar et al., 2001) y de Parsimonia Máxima mediante el paquete informático PHYLIP 3.6 α -3 (Felsenstein, 2002). En este último caso se emplearon, el componente SEQBOOT, el componente DNAPARS, y CONSENSE para lograr el árbol consenso por la regla de la mayoría (*Majority Concensus Tree*), así como el componente RETREE.

3.5.2.2.- Pruebas de Neutralidad.

Varias pruebas estadísticas se han desarrollado para examinar si los patrones de polimorfismo son consistentes con las predicciones de la Teoría Neutral. Dichas medidas generalmente se basan en las relaciones entre los diferentes estimadores de la diversidad dentro y entre las poblaciones. Cuando se trabaja con un solo locus se han desarrollado en particular dos pruebas estadísticas: El Test de Tajima (1989) y el Test de Fu y Li (1997).

El estadístico de Tajima se utiliza ampliamente para examinar la distribución del polimorfismo intraespecífico. Se basa en la estimación de la relación entre dos estadísticos aproximados del parámetro poblacional theta ($\theta = 2M\mu$, con $M = 2N$ para poblaciones diploides y $M = N$ para poblaciones haploides de número poblacional efectivo N y donde μ es la tasa de mutación) que puede ser calculado a partir del número de sitios con por lo menos dos variables en n secuencias, o sitios de segregación S y la diversidad nucleotídica π (promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias) en una muestra de secuencias de una población panmíctica. La diferencia entre estos dos estimadores ($\Delta\theta = \theta\pi - \theta_s$) y su varianza ofrece una prueba de la neutralidad. El test de Tajima se basa en el modelo de sitios infinitos sin recombinación que es apropiado para secuencias cortas de DNA y para haplotipos de RFLP. Los valores significativos de D pueden deberse a factores diferentes de efectos selectivos, como la expansión poblacional, los “cuellos de botella” (bottleneck) o la heterogeneidad en las tasas de mutación, (Gerber, Loggins et al., 2001; Kumar, Tamura et al., 2001).

En el Test F_s de Fu y Li se evalúa la probabilidad de observar un muestra neutral al azar con un número de alelos similares o menores al valor observado dado el número de diferencias por pares, empleándolo como un estimador de θ . Fu (1997) también noto que el estadístico F_s era muy sensible a eventos de expansión poblacional, llevando por lo general a valores negativos de F_s . El estadístico F_s se debe considerar como significativo al 5% si el valor P se halla entre 0.02 y 0.05, aunque los motivos para ello sean todavía poco claros. Ambas pruebas de neutralidad fueron evaluados mediante el paquete estadístico Mega2.1 (Kumar et al., 2001)

3.5.2.3.-Reloj Molecular:

La hipótesis de un reloj molecular (Zuckerlandl et al., 1962; Margoliash, 1963; Zuckerlandl et al., 1965 citados en Ayala, 1997) argumenta que las macromoléculas informativas (proteínas y ácidos nucleicos) evolucionan con tasas que son constantes en el tiempo y para linajes diferentes. La teoría de Kimura sobre la neutralidad de la evolución molecular da una formulación matemática para la hipótesis del reloj molecular. Nuevos alelos surgen en una especie por mutación. Si alelos alternativos son neutrales respecto a la selección natural (no modifican la eficiencia de los portadores) sus frecuencias solo cambiarán por medio de errores de muestreo accidentales de una generación a otra (deriva genética). De acuerdo a la teoría neutralista es razonable asumir que la tasa de mutación neutral para una secuencia permanecerá constante en el tiempo evolutivo, funcionando como un reloj molecular. No se trata de un reloj metronómico, en vez de ello, la evolución molecular es un reloj estocástico. La probabilidad de cambio es constante y cierta variabilidad es posible. En largos periodos de tiempo, un reloj estocástico puede ser muy exacto (Ayala, 1997).

Sobre la base de lo mencionado anteriormente en todos los casos, se empleó un reloj molecular general calibrado para peces en 1.3% por cada millón de años (Bermingham et al. 1997), para datar la separación de la especie en estudio con otra especie filogenéticamente próxima. Para los cíclidos se empleó el reloj molecular propuesto por Volckaert et al. (2002) de 6 a 7 % por cada millón de años. Para ofrecer un estimado de la edad aproximada de los varios nodos interiores que corresponden a CLADES significativos, empleamos un reloj molecular basado en las tasa relativas de cambio que ocurrieron entre varios haplotipos. Utilizamos esta medida ya que la información es limitada a cerca de la tasa de mutación del DNA mitocondrial en las especies estudiadas. Todos nuestros estimados de edad están sujetos a modificaciones sobre la base de la obtención posterior de evidencias adicionales. Para ello se requiere establecer las longitudes de las ramas en los análisis de parsimonia desde la raíz hasta las ramas terminales. Por ejemplo, si un nodo A tiene una edad hipotética, podemos estimar la edad del siguiente nodo más cercano (X) a través de la siguiente ecuación y las distancias (di) a cada rama terminal i :

$$\frac{\text{Tiempo X}}{\text{Tiempo A}} = \frac{\text{promedio } \Sigma d_1 + d_2 \dots \text{hasta X}}{(\text{promedio } \Sigma d_1 + d_2 \dots \text{hasta X}) + d(\text{A a X})}$$

Esta estrategia se siguió para avanzar a lo largo del filograma obteniendo las edades de los nodos basales primero, para luego acceder a los nodos terminales (Collins et al., 2000).

CAPITULO CUARTO: RESULTADOS

Se obtuvieron 61 secuencias de la región no-codificante del DNA mitocondrial (tabla n ° 6). Cuarenta y siete de dichas secuencias contenían la totalidad de la secuencia Dloop a juzgar por los resultados de apareamiento automático (Blast) con secuencias publicadas en Genbank y por el análisis de las secuencias conservadas (CSB-D, CSB-1, 2 y 3). Once secuencias, correspondientes a las especies *C. monoculus* y *A. crassipinis* (Cichlidae) solo mostraron la porción 5' de la región analizada. Se trata en principio de la porción más variable.

La secuenciación se realizó en dos etapas. En una primera etapa realizada en el laboratorio **Genoma, Población, Interacciones** de la Universidad de **Montpellier II (Francia)**, se obtuvieron 2 secuencias de cada especie por secuenciación automática con cebadores fluorescentes (HN 20 y LN20). Esta etapa nos Permitió establecer la estrategia de secuenciación para las muestras restantes. En particular se determinó emplear los cebadores DL20F y DL20R cuyas secuencias fueron facilitadas por el Dr. François Agn se (GPI-UMII) para la amplificación y secuenciación de las muestras restantes. Se obtuvieron fragmentos de tamaños comprendidos entre 1154 y 1441 pares de bases (Figura n ° 23): Posteriormente los productos de amplificación fueron enviados a la empresa GenomeExpress (Grenoble, Francia) para su secuenciación automática.

Con las secuencias obtenidas se efectuó una búsqueda Blast en Genbank con la finalidad de confirmar la naturaleza del producto y encontrar secuencias publicadas para las especies involucradas en el estudio o especies emparentadas. Finalmente se incluyeron tres de dichas secuencias (Genbank, códigos de acceso: AF283953, AF283958, AF283963). Todas ellas provenientes del Río Solimões en el Brasil. La búsqueda de dichas secuencias tenía la finalidad de poder comparar las secuencias de la cuenca de estudio con otras localidades en América del sur y por otra parte facilitar el trabajo de alineamiento de las secuencias encontradas, requisito fundamental para poder realizar los análisis filogenéticos posteriores.

La obtención de las secuencias D-loop para siete especies empleando un par único de cebadores constituye un aspecto importante en el presente estudio, aunque la secuenciación de las muestras de *Astronotus crassipinis* no fue totalmente exitosa, se obtuvieron solo dos secuencias parciales. Otro aspecto importante es que se trata de especies que o han sido muy poco estudiadas hasta ahora. Las únicas secuencias publicadas en Genbank corresponden a secuencias correspondientes a *C. macropomum*, *P. nattereri* y *P. brachypomus* del Río Solimões, de las cuales tomamos tres para el presente estudio. Ninguna de las otras cuatro especies tiene secuencia alguna en la base de datos. Del mismo modo, se trata de una zona geográfica que ha sido muy poco frecuentemente incluida en estudios de análisis genético- poblacionales con peces.

Tabla n ° 6.- Secuencias de la región de control mitocondria incluidas en el presente estudio
(fuente 2, Genbank, *AF283953, **AF283958, ***AF283963; fuente 1, el presente estudio,).

Espece	País	Cuenca	N°	Fuente	Códigos
<i>Pygocentrus nattereri</i>	BOLIVIA	Manuripi	3	1	PN70MAN, PN126MAN, PN164MAN
		Mamore-Securé	3	1	PN1000MM, PN1404MM, PN 1110MM
		Itenez - Guaporé	3	1	PN 1411GG, PN 1993GG, PN 1395GG
	PERU	Ucayali	1	1	PN 30014UCA
	BRASIL	Solimões	1	2*	PN SOL
<i>Piaractus brachypomus</i>	BOLIVIA	Manuripi	1	1	PB924MAN
		Mamoré-Secure	2	1	PB607MM, PB812MM
		Itenez - Guaporé	4	1	PB842GG, PB775GG, PB530GG, PB843GG
		ND	1	1	PB COL
	PERU	Ucayali	1	1	PB8UCA
	BRASIL	Solimões	1	2**	PB SOL
<i>Colossoma macropomum</i>	BOLIVIA	Manuripi	4	1	CM922MAN, CM60MAN, CM182MAN, CM179MAN
		Mamoré-Secure	2	1	CM 672MM, CM800MM
		Itenez - Guaporé	1	1	CM 609GG, CM497GG, CM542GG, CM827GG
	PERU	Ucayali	1	1	CM 20UCA
	BRASIL	Solimões	1	2***	CM SOL
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	BOLIVIA	Manuripi	2	1	PF 911MAN, PF855MAN
		Mamoré-Secure	3	1	PF 393MM, PF773MM, PF1156MM
		Itenez - Guaporé	3	1	PF 430GG, PF832GG, PF505GG
	PERU	Ucayali		1	PF 30023UCA
<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	BOLIVIA	Manuripi	2	1	PT 860MAN, PT 917MAN
		Mamoré-Secure	2	1	PT 1071MM, PT636MM
		Itenez - Guaporé	3	1	PT 823GG, PT742GG, PT521GG
	PERU	Ucayali	1	1	PT 30021UCA
<i>Cichla monoculus</i>	BOLIVIA	Manuripi	3	1	CO 874MAN, CO865MAN, CO888MAN
		Mamoré-Secure	2	1	CO 790MM, CO1111MM
		Itenez - Guaporé	3	1	CO 707GG, CO821GG, CO512GG
	PERU	Ucayali	1	1	CO 30054UCA
<i>Astronotus crassipinnis</i>	BOLIVIA	Mamoré-Secure	2	1	AC 656MM, AC673MM

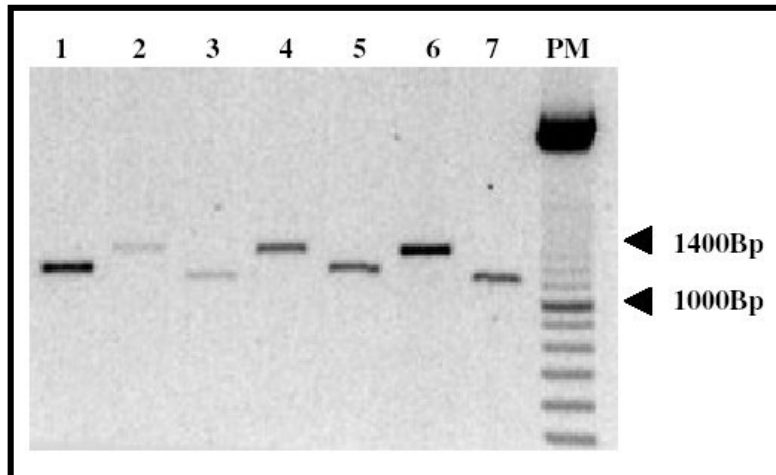


Figura n ° 23.- Producto de amplificación de la región de control para las siete especies del presente estudio.

1. *Pseudoplatystoma fasciatum* (1228bp) ;
 2. *Piaractus brachypomus* (1376bp);
 3. *Astronotus crassipinis* (1177bp);
 4. *Colossoma macropomum* (1361bp);
 5. *Pseudoplatystoma tigrinum* (1228bp) ;
 6. *Pygocentrus nattereri* (1361bp) ;
 7. *Cichla monoculus* (1154bp);
- PM marcador de peso molecular “100bp Ladder”.

4.1.- Caracterización de las secuencias.

Las secuencias obtenidas (anexos 1 a 7) corresponden a secuencias completas y o parciales de la región de control mitocondrial de acuerdo a las búsquedas Blast efectuadas en GenBank.

Las secuencias de *P. fasciatum*, *P. tigrinum*, *P. nattereri*, *P. brachypomus* y *C. macropomum* incluyen la secuencia completa de la región de control (D-Loop) pero además una porción reconocible como parte del tRNA de la Threonina, y el tRNA de la Prolina en el extremo 5', junto al tRNA de la Fenilalanina y una porción del RNA 12S en el extremo 3'. Para establecer esto se emplearon secuencias publicadas en GenBank. De hecho también se han podido identificar secuencias conservadas características de la región de control mitocondrial. Las secuencias de dichos fragmentos para cada una de las especies, con la excepción de *Astronotus crassipinis* se presentan en la tabla n ° 7.

Se puede apreciar que dichas secuencias son en general bastante similares dentro de un mismo grupo (familias), sin embargo, diferencian cada especie. Entre ellas, la porción CSB-D es la de mayor conservación entre todas las especies

Los resultados siguientes representan análisis llevados a cabo exclusivamente sobre la región Dloop.

Tabla n 7.- Secuencias putativas conservadas para la región Dloop en las siete₁ especies en estudio

Espece	CSB-1	CSB-D	CSB-2	CSB-3
CM	catattatccttgat(g/a)ggtcaggaca(g/a)a(c/t)at	ttactggcaticggctcc	acaaacccc(c/-)t(a/c)(a/c/-)accccc	tgnc(a/a)aacccc(c/-)(c/a)aaaacc
PB	catattatccttgat(g/a)ggtcaggacaataat	ttactggcaticggctcc	acaaacccc(t/c/-)(t/c)(a/t)ccccc	tgtaaacccccaaaacca
PN	catattatccttgataggtcaggac	ttactggcaticggctcc	(c/a)aaacccccctaccccc(c/-)	tgtaaacccccaaaaccaggaaatga
PF	caaccaaatattgtaatacata	ttactggcatttggctct	taaaccccc(c/-)taaccccc	tgtaaacccccaaaccagg
PT	caaccaaatatttagacatag	ttactggcatttggctct	taaaccccc(c/-)taaccccc	tgtaaacccccaaaccagg
CO	cataactgatttcaaggacataa *****	ttcctggcaticggctcc	taacccccctaccccc	cgtaaaccccccggaaca

₁ , Las secuencias de *Astronotus ocellatus* no permiten determinar estas secuencias porque solo se obtuvieron dos secuencias incompletas.

*****;El orden se ha alterado en este caso: CSB-D→CSB-1→CSB-2→CSB.

4.2.- Composición

Las secuencias obtenidas se caracterizan por una composición de bases promedio (tabla n ° 8 Y Figura n ° 24) donde se observa una frecuencia mayor de bases Adenina y Timina (31.77% y 31.24% respectivamente), en particular con respecto a la Guanina (15.31%). Con la excepción de las secuencias de *Cichla monoculus* y *Astronotus crassipinis*, las secuencias de las demás especies parecen ser equivalentes respecto a la composición nucleotídica, algo que debe confirmarse mediante otros análisis estadísticos.

Tabla n ° 8.- Composición nucleotídica promedio de las secuencias obtenidas.

Especie	N	Media	σ	Error std	Intervalo de confianza de la media al 5%	
					Limite inferior	Limite superior
<i>Cichla monoculus</i>	9	33.311	2.711	0.904	31.227	35.360
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	9	36.744	0.174	0.008	36.611	36.878
<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	8	37.350	0.298	0.105	37.101	37.599
<i>Colossoma macropomum</i>	13	37.754	1.704	0.473	36.724	38.783
<i>Piaractus brachypomus</i>	10	36.550	0.701	0.222	36.048	37.052
<i>Pygocentrus nattereri</i>	11	39.700	0.268	>0.001	39.520	39.880
<i>Astronotus ocellatus</i>	2	34.275	1.011	0.715	25.190	43.360

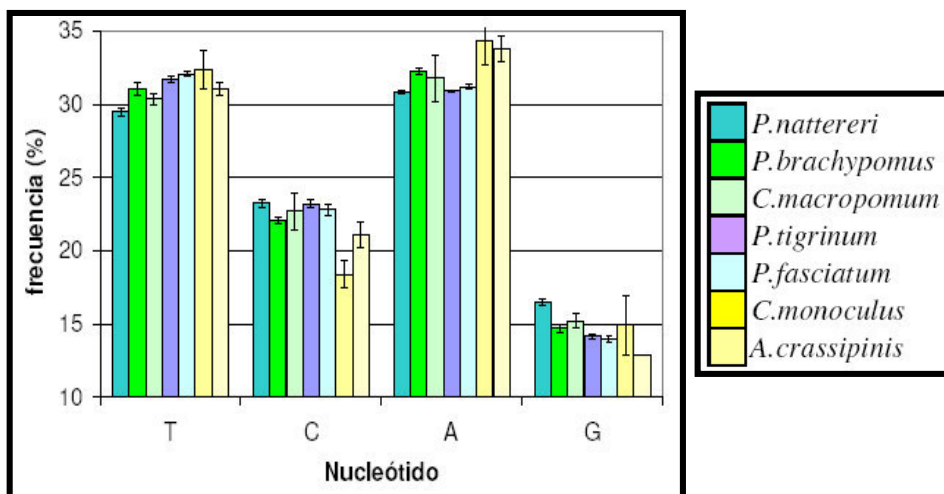


Figura n ° 24 .- Composición nucleotídica promedio de las secuencias obtenidas en el presente estudio (barras de error equivalentes a 2 SD).

Si evaluamos estadísticamente los promedios de composición G + C % (Tabla n ° 8 y figura n ° 25), podemos apreciar que con excepción de las secuencias de *Cichla monoculus* y *Astronotus crassipinis* (Cichlidae), las secuencias muestran un porcentaje G + C % entre 36.55% (*P. brachypomus*) y 39.7% (*P. nattereri*) con errores estándar de hasta 0.473. En apariencia los promedios de composición sólo permiten diferenciar dentro de las secuencias de Serrasalminos a *P. nattereri*. Por otra parte, las secuencias de los dos cíclidos se distinguen claramente de las anteriores al presentar valores de G+C % inferiores (33.31% para *C. monoculus* y 34.28% para *A. crassipinis*) y con errores estándar cercanos a la unidad (0.904 y 0.715).

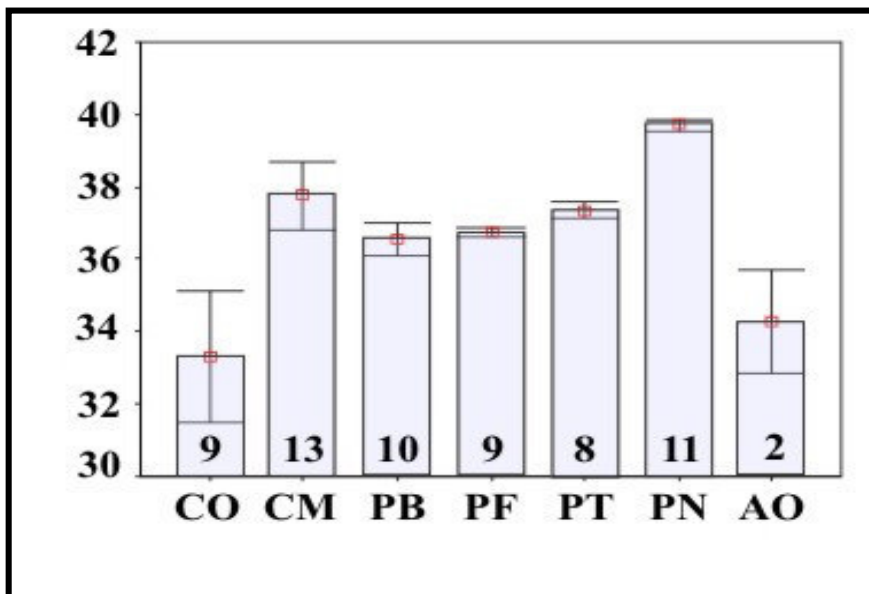


Figura n ° 25.-
Composición
nucleotídica
promedio (% G+C)
de las siete especies
estudiadas (barras de
error 2SD)

Para comprobar dichas afirmaciones procedimos a realizar un análisis de varianzas (ANOVA) sin tener en cuenta las secuencias de los cíclidos. Primero se realizó una prueba de Levene para testar la hipótesis nula de “homogeneidad de las varianzas”, que es un requisito para llevar a cabo el análisis de varianza. La prueba de Levene condujo a una aceptación al 99% de la hipótesis homogeneidad de las varianzas. Podemos por lo tanto proceder al ANOVA (tabla n ° 9).

Tabla n ° 9 .- ANOVA para la comparación de los promedios de composición G + C % entre las secuencias de las siete especies en estudio

	Suma de Cuadrados	g.l	Medias de cuadrados	F	Significancia
Inter-especie	66,46	4	16,615	18,714	0
Intra-especie	40,84	46	0,888		
Total	107,3	50			

Las medias no son iguales entre las diferentes especies ($F = 18.714$, $P < 0.001$). Empleando un test HSD de Tukey se puede establecer que de acuerdo a las medias de composición G+C % , con una confiabilidad del 99%, las secuencias de *P.nattereri* difieren significativamente de las secuencias restantes. Con una confiabilidad del 95% también hay diferencias significativas entre la composición G+C % se las secuencias de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus*.

En resumen, podemos mencionar que las secuencias de las dos especies de la familia **Cichlidae** han tenido una historia evolutiva particular diferente de la de las demás especies estudiadas. Entre las secuencias de la sub-familia **Serrasalminae**, *P.nattereri* demuestra haber seguido un camino evolutivo diferente al de las secuencias de las otras dos especies de la sub-familia. A un nivel de confianza del 95%, también se puede diferenciar estas últimas dos.

4.3- Tratamiento de datos

4.3.1.- Distancias genéticas

Las tablas siguientes (Tabla n ° 10 a tabla n ° 24) presentan las distancias genéticas evaluadas mediante el método de Dos Parámetros de Kimura (K2P) para las especies en estudio, mientras que los árboles UPGMA ilustran los patrones de divergencia puestos en evidencia por dichas distancias genéticas. Todos los valores de error estándar (en las tablas entre corchetes), se obtuvieron por bootstrapping con 1000 réplicas.

4.3.1.1.- *Colossoma macropomum*.

Las secuencias de *Colossoma macropomum* provenientes del Alto Madera (tabla n ° 10, figura n ° 26) difieren entre sí en un promedio de $1.89\% \pm 0.42\%$. Dentro de cada río, la divergencia promedio es del $0.3\% \pm 0.18\%$ dentro del Mamoré, $1.38\% \pm 0.27\%$ dentro del Guaporé y $3.84\% \pm 0.44\%$ en el Manuripi. La mayor divergencia entre los haplotipos se produce entre el río Manuripi y los ríos Guaporé $2.33\% \pm 0.28\%$ y Mamoré $2.21\% \pm 0.26\%$, mientras que la comparación entre los haplotipos del Guaporé y el Mamoré arrojan una divergencia del $0.92\% \pm 0.18\%$. Es decir que el Manuripi es por una parte la cuenca con mayor polimorfismo pero al mismo tiempo es aquella que difiere más de las otras dos cuencas.

Al comparar los haplotipos bolivianos en conjunto con las muestras y secuencias provenientes de las dos cuencas externas al Alto Madera (Ucayali y Amazonía Central) se puede evidenciar lo siguiente: La divergencia promedio entre el Alto Madera y el Ucayali es del $2.00\% \pm 0.40\%$, mientras que entre el Alto Madera y la Amazonía Central es del $1.90\% \pm 0.40\%$ y entre el Ucayali y la Amazonía central es de $1.90\% \pm 0.30\%$. Estas divergencias son equivalentes a la divergencia promedio dentro del Alto Madera. Podemos suponer entonces que se trata de una misma población (Tabla n ° 11)

Tabla n ° 10.- Distancias genéticas K2P entre haplotipos de *C. macropomum* provenientes del Alto Madera [Error estándar]

	CM179MAN	CM182MAN	CM497GG	CM542GG	CM609GG	CM60MAN	CM672MM	CM800MM	CM827GG	CM922MAN
CM179MAN										
CM182MAN	4,20 [0,70]									
CM497GG	2,30 [0,50]	3,40 [0,60]								
CM542GG	2,2 [0,50]	3,30 [0,60]	0,30 [0,20]							
CM609GG	2,30 [0,50]	3,70 [0,60]	0,20 [0,20]	0,60 [0,30]						
CM60MAN	3,88 [0,70]	5,00 [0,70]	1,70 [0,40]	1,80 [0,40]	1,90 [0,50]					
CM672MM	2,44 [0,50]	3,50 [0,60]	0,10 [0,10]	0,40 [0,20]	0,30 [0,20]	1,80 [0,40]				
CM800MM	2,50 [0,50]	3,40 [0,60]	0,20 [0,20]	0,60 [0,20]	0,40 [0,20]	1,70 [0,40]	0,30 [0,20]			
CM827GG	0,10 [0,10]	4,20 [0,70]	2,20 [0,50]	2,00 [0,50]	2,20 [0,50]	3,70 [0,60]	2,30 [0,50]	2,40 [0,50]		
CM922MAN	2,30 [0,50]	3,70 [0,60]	0,20 [0,20]	0,60 [0,30]	0,20 [0,10]	1,90 [0,50]	0,30 [0,20]	0,40 [0,20]	2,20 [0,50]	

El análisis de UPGMA (figura n ° 26)sin embargo nos demuestra que existe dentro de esta población varios subgrupos apoyados por valores fuertes de bootstrap. A la excepción de un grupo de haplotipos restringido al Alto Madera (Bootstrap 84%), los demás haplotipos no presentan una relación congruente con la geografía: haplotipos provenientes de la amazonía central se hallan frecuentemente asociados con haplotipos del Alto Madera, lo mismo ocurre con el único haplotipo del Ucayali.

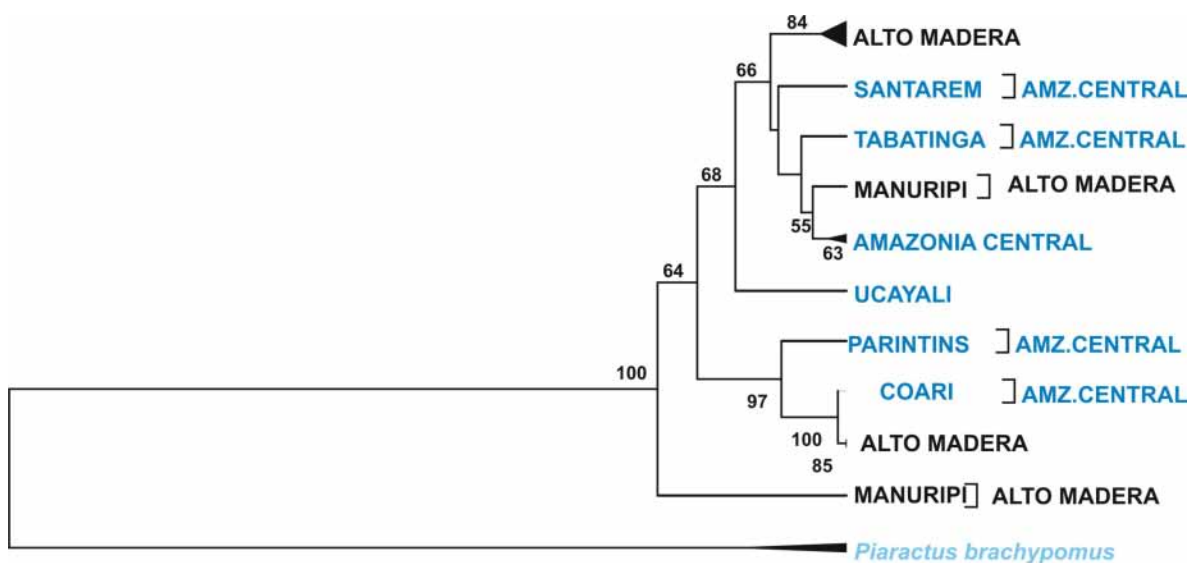


Figura n ° 26.- Árbol UPGMA ilustrando la divergencia entre haplotipos de diversos orígenes geográficos *C. macropomum*

Tabla n ° 11.- Distancias genéticas K2P entre *C. macropomum*, *P. brachypomus* y *P. nattereri* respectivamente [Error estándar]

		PB	PN
CM	Alto Madera + Solimoes	13,25 [1,21]	33,15 [2,21]
	Ucayali	21,06 [1,63]	24,33 [1,68]

4.3.1.2.- *Piaractus brachypomus*.

En el caso de *P. brachypomus* (Tabla n ° 12), la divergencia promedio entre los haplotipos del Alto Madera es del 1.82% ± 0.41%. De la comparación intra-cuencas se tiene que la cuenca más variable es la del Guaporé (1.22% ± 0.27%) seguida por la del Mamoré (0.90% ± 0.27%), Pero se debe tener en cuenta que solo se tiene una muestra del Manuripi. De hecho, entre las cuencas la mayor divergencia se presenta en las comparaciones entre el Manuripi y las otras dos (3.80% ± 0.54% y 3.73 ± 0.55%, con el Guaporé y el Mamoré respectivamente). Entre Mamoré y Guaporé la divergencia es del 1.26% ± 0.25%.

En lo que se refiere a la comparación por pares (Tabla n ° 13, figura n ° 27) con las cuencas externas (Ucayali, 1.34% ± 0.37% y del Solimões, 1.48% ± 0.39%), dichas divergencias no son superiores a las divergencias obtenidas dentro del Alto Madera (Tabla n ° 12), justificando su inclusión en los análisis filogeográficos. De hecho, en este caso las secuencias del Manuripi divergen más del resto de las secuencias que las muestras externas (Ucayali y Solimões) respecto a los haplotipos del Alto Madera.

En relación con los otros carácidos empleados en el presente estudio, *C. brachypomus* tiene valores de divergencia de 13.25 ± 1.21 respecto a *C. macropomum* del Alto Madera y del Solimões tomados en conjunto, 21.06% ± 1.63% respecto a *C. macropomum* del Ucayali y 25.56% ± 1.89% respecto a *P. nattereri* (Tabla n ° 14).

Tabla n ° 12.- Distancias genéticas entre los haplotipos de *P. brachypomus* provenientes del Alto Madera [Error estándar]

	PB530GG	PB607MM	PB775GG	PB812MM	PB842GG	PB843GG	PB 924MAN
PB530GG							
PB607MM	1,56 [0,42]						
PB775GG	1,11 [0,33]	0,89 [0,30]					
PB812MM	1,79 [0,41]	0,89 [0,29]	1,11 [0,31]				
PB842GG	1,11 [0,31]	1,11 [0,36]	0,44 [0,21]	1,34 [0,36]			
PB843GG	1,90 [0,45]	1,23 [0,39]	1,45 [0,37]	1,45 [0,36]	1,45 [0,39]		
PB924MAN	3,85 [0,68]	3,15 [0,56]	3,38 [0,57]	3,15 [0,50]	3,38 [0,60]	2,58 [0,54]	

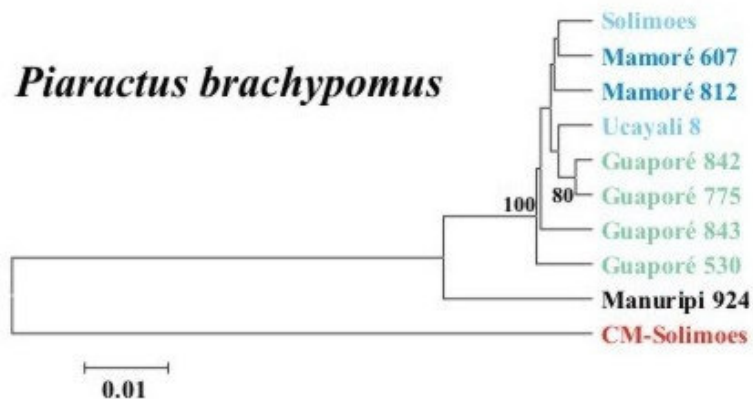


Figura n ° 27.- Árbol UPGMA poniendo en evidencia la divergencia entre los diferentes haplotipos de *P. brachypomus*.

Tabla n ° 13.- Distancias genéticas que separan las los haplotipos del Alto Madera de los provenientes del Río Solimões y Ucayali

[Error estándar]

	PB530GG	PB607MM	PB775GG	PB812MM	PB842GG	PB843GG	PB924MAN	PB8UCA
PBSOL	1,56 [0,42]	0,89 [0,31]	1,11 [0,34]	1,11 [0,33]	1,11 [0,36]	1,45 [0,40]	3,15 [0,55]	1,00 [0,34]
PB8UCA	1,22 [0,35]	1,00 [0,37]	1,00 [0,32]	1,23 [0,36]	0,78 [0,27]	1,11 [0,38]	3,04 [0,54]	

Tabla n ° 14.- Divergencia entre las secuencias de la región Dloop de *P. brachypomus* y las secuencias de *C. macropomum* y *P. nattereri*

[Error estándar]

	CM		PN
	Alto Madera + Solimoes	Ucayali	
PB	13,25 [1,21]	21,06 [1,63]	25,56 [1,89]

4.3.1.3.- *Pygocentrus nattereri*

La divergencia de las muestras provenientes del Alto Madera es muy baja (Tabla n ° 15 y figura n ° 28). Se presentan con un promedio de $0.13\% \pm 0.12\%$, con máximos de 0.20% . Agrupadas por cuenca, la divergencia dentro del Manuripi y del Guaporé son equivalentes ($0.13\% \pm 0.09\%$) y es nula en el Mamoré. Al comparar las cuencas entre sí la mayor divergencia se obtiene al comparar las secuencias del Mamoré con las de las otras dos cuencas $0.17\% \pm 0.04\%$ en ambos casos. La divergencia entre el Manuripi y el Guaporé es menor, $0.07\% \pm 0.04\%$. La divergencia entre los haplotipos del Alto Madera y los haplotipos del Ucayali y Solimões (tabla n ° 16) es de $1.12\% \pm 0.29\%$, casi diez veces superior a la divergencia dentro del Alto Madera

Finalmente, comparando las secuencias de *P. nattereri* con *P. brachypomus* y *C. macropomum* (tabla n ° 17), se obtienen valores respectivos de $25.56\% \pm 1.89\%$ y $26.75\% \pm 1.94\%$.

Tabla n ° 15.- Distancias genéticas K2P entre los distintos haplotipos de *P. nattereri* provenientes del Alto Madera [Error estándar]

	PN1993GG	PN1404MM	PN70MAN	PN1000MM	PN1110MM	PN126MAN	PN1411GG	PN164MAN	PN1395GG
PN1993GG									
PN1404MM	0,20 [0,13]								
PN70MAN	0,20 [0,12]	0,20 [0,13]							
PN1000MM	0,10 [0,10]	0,10 [0,09]	0,10 [0,09]						
PN1110MM	0,20 [0,14]	0,20 [0,13]	0,20 [0,15]	0,10 [0,10]					
PN126MAN	0,20 [0,12]	0,20 [0,13]	0,00 [0,00]	0,10 [0,09]	0,20 [0,15]				
PN1411GG	0,20 [0,12]	0,20 [0,13]	0,00 [0,00]	0,10 [0,09]	0,20 [0,15]	0,00 [0,00]			
PN164MAN	0,20 [0,12]	0,20 [0,13]	0,00 [0,00]	0,10 [0,09]	0,20 [0,15]	0,00 [0,00]	0,00 [0,00]		
PN1395GG	0,20 [0,12]	0,20 [0,13]	0,00 [0,00]	0,10 [0,09]	0,20 [0,15]	0,00 [0,00]	0,00 [0,00]	0,00 [0,00]	

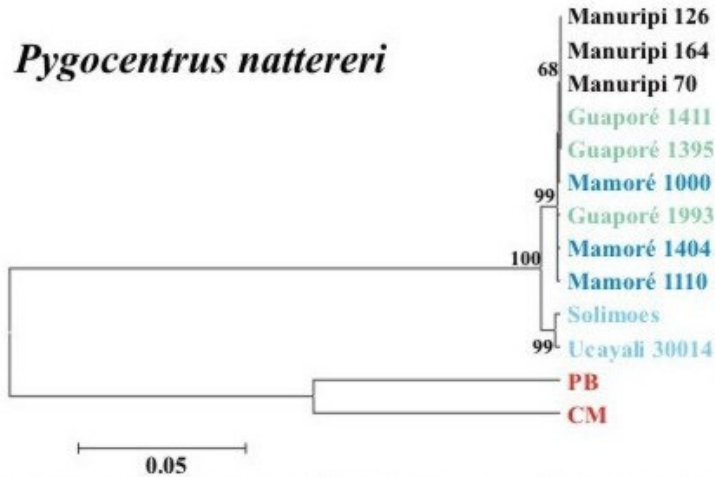


Figura n ° 28.- Árbol UPGMA poniendo en evidencia la divergencia entre las secuencias de *P. nattereri*

Tabla n ° 16.- Distancias genéticas entre haplotipos del Alto Madera y los haplotipos originarios del Río Solimões y Ucayali [error estándar]

	PN1993GG	PN1404MM	PN70MAN	PN1000MM	PN1110MM	PN126MAN	PN1411GG	PN164MAN	PN1395GG	PN30014UC
PN SOL	1,23 [0,33]	1,23 [0,33]	1,03 [0,29]	1,13 [0,32]	1,23 [0,37]	1,03 [0,29]	1,03 [0,29]	1,03 [0,29]	1,03 [0,29]	0,31 [0,17]
PN30014UCA	1,13 [0,35]	1,34 [0,36]	1,13 [0,33]	1,23 [0,35]	1,34 [0,40]	1,129 [0,33]	1,129 [0,33]	1,129 [0,33]	1,129 [0,33]	

Tabla n ° 17.- Divergencia entre las secuencias de la región Dloop de *P. nattereri* y las secuencias de *C. macropomum* y *P. brachypomus* [Error estándar]

	CM		PB
	Alto Madera + Solimoes	Ucayali	
PN	33,15 [2,21]	21,06 [1,63]	25,56 [1,89]

4.3.1.4.- *Pseudoplatystoma fasciatum*

En el caso de *P.fasciatum* (Tabla n ° 18 y Figura n ° 29), podemos observar un promedio de divergencia del 0.33% ± 0.17% dentro del Alto Madera, con un máximo de 0.69% ± 0.26%. Comparando las divergencias dentro de cada cuenca, los valores de distancia promedio más altos corresponden al Manuripi y al Mamoré (0.46% ± 0.18 y 0.46% ± 0.12%, respectivamente), y el más bajo corresponde al Guaporé con 0.23% ± 0.13%. Comparando las diferentes cuencas, los valores son muy similares, abarcando el rango entre 0.30% ± 0.12% y 0.34% ± 0.13%.

La muestra del Ucayali presenta una distancia genética ligeramente mayor: 0.66% ± 0.26% (tabla n °19).

Tabla n ° 18.- Distancias genéticas entre los haplotipos de *P. fasciatum* provenientes del Alto Madera [Error estándar]

	PF393MM	PF505GG	PF855MAN	PF911MAN	PF773MM	PF832GG	PF430GG	PF1156MM
PF393MM								
PF505GG	0,69 [0,27]							
PF855MAN	0,57 [0,23]	0,11 [0,11]						
PF911MAN	0,34 [0,17]	0,57 [0,24]	0,46 [0,21]					
PF773MM	0,46 [0,20]	0,23 [0,16]	0,11 [0,11]	0,34 [0,18]				
PF832GG	0,46 [0,20]	0,23 [0,16]	0,11 [0,11]	0,34 [0,18]	0,00 [0,00]			
PF430GG	0,69 [0,27]	0,23 [0,16]	0,11 [0,12]	0,57 [0,25]	0,23 [0,16]	0,23 [0,16]		
PF1156MM	0,69 [0,27]	0,23 [0,16]	0,11 [0,11]	0,57 [0,23]	0,23 [0,15]	0,23 [0,16]	0,23 [0,17]	

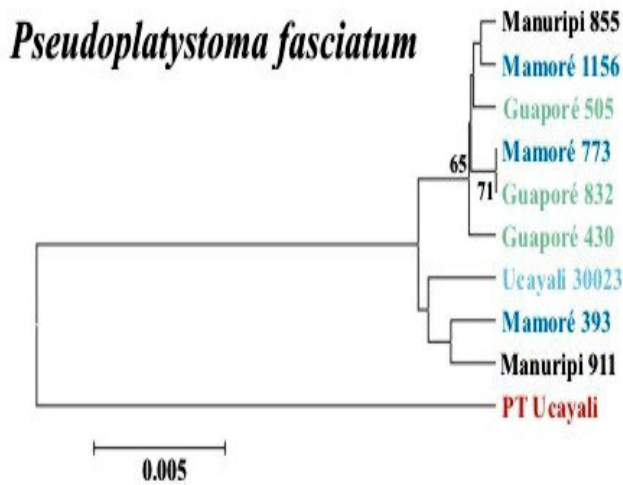


Figura n ° 29.- Árbol UPGMA demostrando las divergencias entre las secuencias de Dloop de las muestras de *P. fasciatum*

Tabla n ° 19.- Divergencia entre los haplotipos del Alto Madera respecto al haplotipo del Río Ucayali [Error estándar]

	PF393MM	PF505GG	PF855MAN	PF911MAN	PF773MM	PF832GG	PF430GG	PF1156MM
PF30023UCA	0,57 [0,224]	0,80 [0,31]	0,69 [0,27]	0,46 [0,22]	0,57 [0,26]	0,57 [0,26]	0,80 [0,31]	0,80 [0,28]

4.3.1.5.- *Pseudoplatystoma tigrinum*

El caso de *P. tigrinum* (tabla n ° 20 y figura n ° 30) es similar al anterior. Se presentan valores de distancia genética muy bajos, con un promedio de $0.16\% \pm 0.11\%$ para las secuencias del Alto Madera, siendo el máximo de $0.33 \pm 0.19\%$.

Dentro de cada cuenca, las distancias dentro del Guaporé y del Mamoré son las mismas $0.11\% \pm 0.11$, mientras que el valor más elevado se halla dentro del Manuripi, $0.22\% \pm 0.12\%$.

Entre las tres cuencas del Alto Madera , las distancias alcanzan el $0.17\% \pm 0.08\%$ (Mamoré y Guaporé respecto al Manuripi), siendo el valor mínimo la distancia genética que separa al Mamoré del Guaporé. $0.11\% \pm 0.08\%$.

Tabla n ° 20.- Distancias genéticas K2P entre los haplotipos de *P. tigrinum* provenientes del Alto Madera [Error estándar]

	PT823GG	PT860MAN	PT1071MM	PT917MAN	PT636MM	PT742GG	PT521GG
PT823GG							
PT860MAN	0,22 [0,13]						
PT1071MM	0,22 [0,13]	0,00 [0,00]					
PT917MAN	0,33 [0,19]	0,11 [0,11]	0,11 [0,11]				
PT636MM	0,33 [0,18]	0,11 [0,12]	0,11 [0,11]	0,22 [0,16]			
PT742GG	0,22 [0,13]	0,00 [0,00]	0,00 [0,00]	0,11 [0,11]	0,11 [0,12]		
PT521GG	0,33 [0,16]	0,11 [0,11]	0,11 [0,10]	0,22 [0,14]	0,22 [0,16]	0,11 [0,10]	

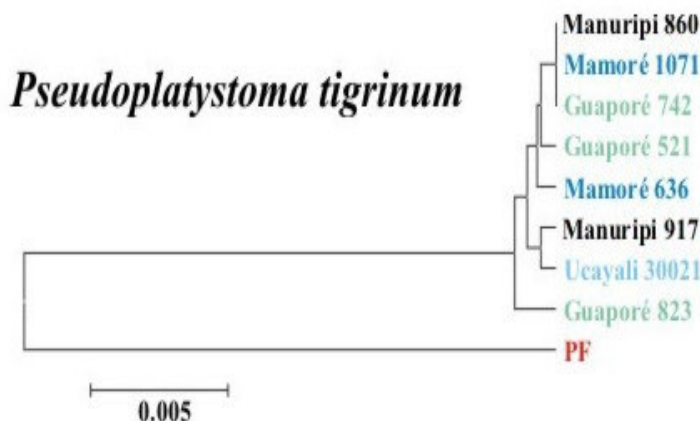


Figura n ° 30.- Árbol UPGMA mostrando la divergencia entre haplotipos de *P. tigrinum* de orígenes geográficos diversos.

Las distancias que caracterizan la comparación entre la cuenca del Madera y la del Ucayali (Tabla n ° 21) muestran un promedio de $0.27\% \pm 0.17\%$, solo ligeramente mayor a las distancias dentro del Alto Madera.

La distancia que separa las dos especies del genero **Pseudoplatystoma** es de $3.55\% \pm 0.57$.

Tabla n ° 21.- Divergencia genética entre las secuencias del Alto Madera y la única secuencia del Ucayali [Error estándar]

	PT823GG	PT860MAN	PT1071MM	PT917MAN	PT636MM	PT742GG	PT521GG
PT30021UCA	0,44 [0,23]	0,22 [0,16]	0,22 [0,16]	0,11 [0,11]	0,33 [0,21]	0,22 [0,16]	0,33 [0,19]

4.3.1.6.- *Cichla monoculus*

Las muestras de *C. monoculus* provenientes del Alto Madera (Tabla n ° 22 y figura n ° 31) muestran una divergencia elevada hasta de $9.70\% \pm 1.7\%$, con un promedio de $5.56\% \pm 2.03\%$.

La subcuenca del Alto Madera que presenta una mayor distancia genética promedio entre sus diferentes muestras es la del Mamoré con $9.01\% \pm 1.68\%$, seguida de la del Manuripi con $4.62\% \pm 0.99\%$ y finalmente la del Guaporé con $1.27\% \pm 0.53\%$. Dos haplotipos muestran una divergencia superior al $6.60\% \pm$ (CO874MAN y CO790MM).

En las comparaciones por Cuencas, las distancias son similares entre el Mamoré y el Manuripi, $7.23\% \pm 1.28\%$ y entre el Mamoré y el Guaporé, $7.23\% \pm 1.12\%$. Entre el Manuripi y el Guaporé las distancia es del $4.68\% \pm 0.95\%$. Por otra parte se puede apreciar que el promedio de distancia genética de las muestras del Alto Madera respecto a la cuenca del Ucayali (tabla n ° 23) es de $12.81\% \pm 2.08\%$. Este nivel de divergencia es importante y puede ser indicativo de una especie diferente. Esta secuencia constituye en ese caso un grupo externo.

Finalmente, la distancia genética entre las muestras de *C. monoculus* con las secuencias de *Astronotus crassipinis* es del 28.40% \pm 3.57%

Tabla n ° 22.- Distancias genéticas K2P entre haplotipos de *C. monoculus* provenientes del Alto Madera [Error estándar]

	CO821GG, CO888MAN	CO512GG	CO865MAN	CO707GG	CO1111MM	CO874MAN	CO790MM	
CO3005UCA	10,90 [2,00]	10,50 [1,90]	9,80 [1,80]	10,50 [1,90]	10,90 [1,90]	11,20 [1,90]	18,10 [2,5]	20,60 [2,70]

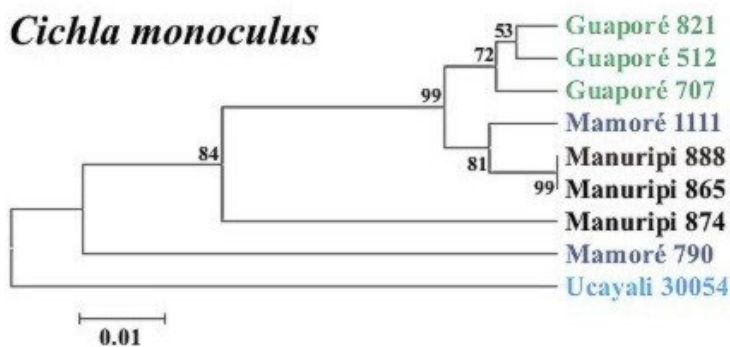


Figura n ° 31.- Árbol UPGMA ilustrando la divergencia entre las secuencias de *C. monoculus* de orígenes geográficos distintos.

Tabla n ° 23.- Comparaciones por pares de las distancias K2P entre los haplotipos del Alto Madera y el haplotipo del Ucayali [Error estándar]

	CO821GG	CO888MAN	CO512GG	CO865MAN	CO707GG	CO1111MM	CO874MAN	CO790MM
CO821GG								
CO888MAN	2,90 [1,00]							
CO512GG	1,00 [0,50]	1,90 [0,80]						
CO865MAN	2,90 [1,00]	0,00 [0,00]	1,90 [0,80]					
CO707GG,	1,90 [0,80]	2,90 [0,90]	0,90 [0,50]	2,90 [0,90]				
CO1111MM	3,60 [1,10]	1,60 [0,70]	2,60 [0,90]	1,60 [0,70]	2,20 [0,80]			
CO874MAN	9,70 [1,70]	6,90 [1,50]	8,70 [1,70]	6,90 [1,50]	8,30 [1,60]	6,60 [1,40]		
CO790MM	12,30 [2,00]	10,80 [1,90]	11,90 [2,00]	10,80 [1,90]	10,80 [1,90]	9,00 [1,80]	12,30 [2,10]	

4.3.2.- Saturación y Homoplasia

4.3.2.1.- Saturación

Las gráficas siguientes ilustran la relación existente entre las distancias genéticas intraespecíficas (Dos Parámetros de Kimura, K2P) y los eventos mutacionales de transversión y transición. Para *Colossoma macropomum* (figura n ° 31) podemos notar que las transiciones muestran saturación a partir de distancias cercanas al 5%, Los puntos superiores a este valor, corresponden a las comparaciones de la secuencia del Ucayali (CM20UCA) y el resto. Por el contrario, las transversiones siguen un incremento lineal. Esto se traduce en un valor de la tasa transición/transversión de $\kappa = 0.7$ si se incluyen todas las secuencias y $\kappa = 1.3$ si se excluye la secuencia CM20UCA.

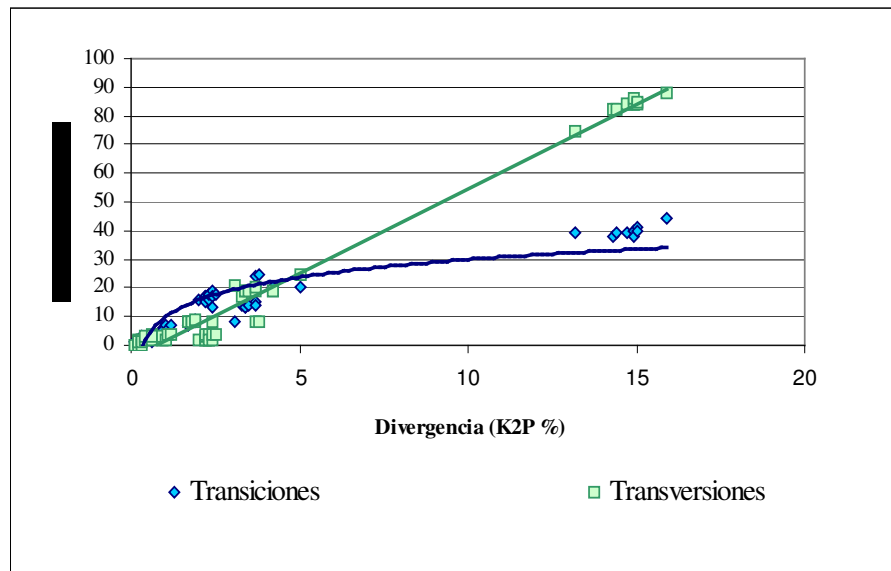


Figura n ° 32.- Análisis de Saturación para las secuencias de *C.macropomum*

En el caso de *Piaractus brachypomus* (Figura n ° 32) ocurre algo similar para distancias cercanas al 3% y con una tasa Transición/ Transversión ligeramente inferior a 2, $\kappa = 1.9$. Los valores que son responsables de la intersección de las curvas, corresponden a comparaciones entre las secuencia PB924MAN y el resto de las secuencias inclusive las secuencias de muestras externas al Alto Madera.

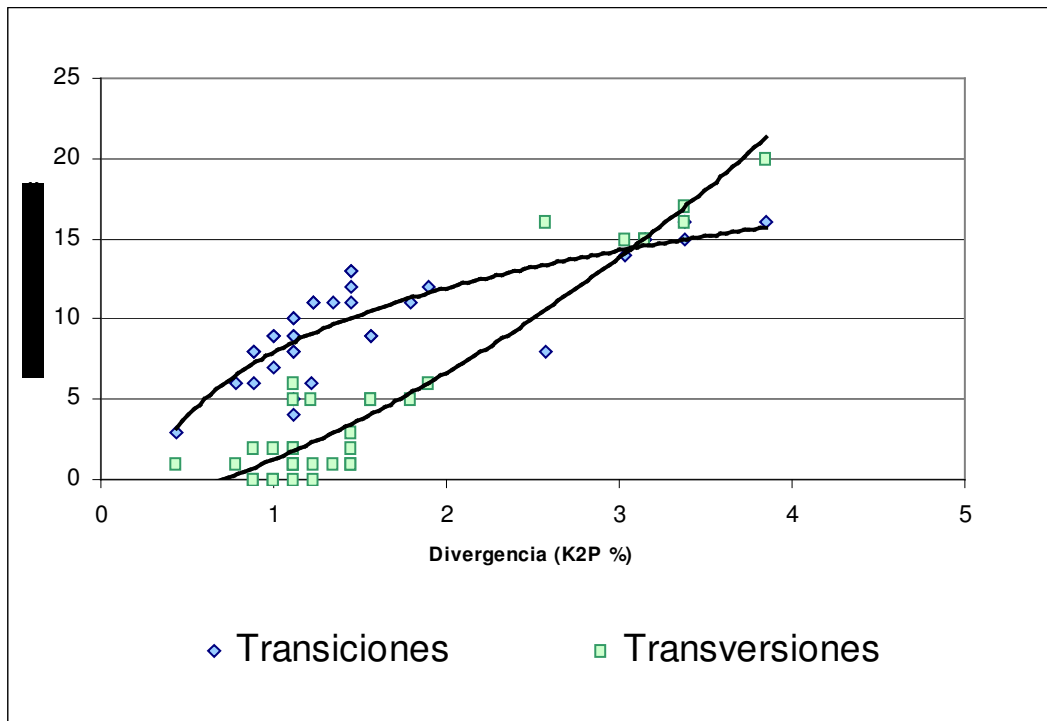


Figura n ° 33.- Análisis de Saturación para las secuencias de *P. brachypomus*

Por el contrario, las secuencias de *Pygocentrus nattereri* (Figura n °33) muestran un incremento lineal de ambos eventos mutacionales, con un exceso notorio de transiciones respecto a las transversiones. Dato confirmado por el valor de la tasa de transición/transversión, $\kappa=4.2$

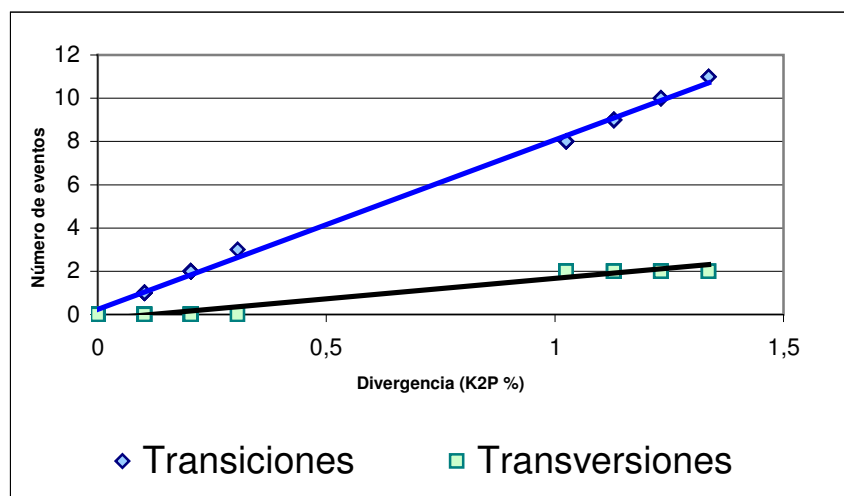


Figura n ° 34.- Relación Transición-Transversión para las secuencias de *P. nattereri*

Para las especies de la familia Pimelodidae tenemos un patrón diferente a los anteriores. Tanto en las secuencias de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* (Figura n ° 35), muestran un marcado incremento Lineal. Ambos grupos de secuencias carecen de eventos de transversión. Las secuencias están muy lejos de haberse saturado.

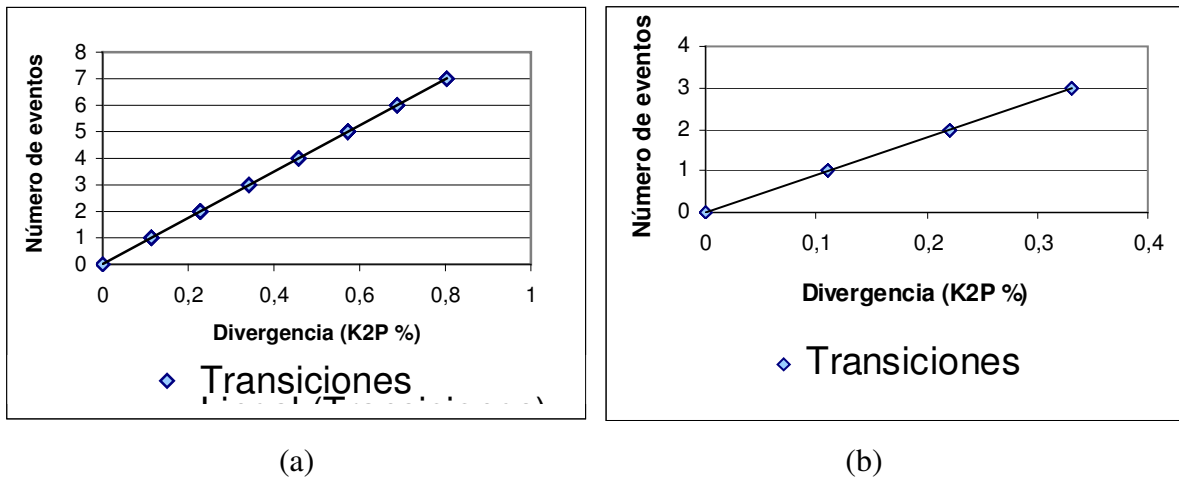


Figura n ° 35.- Análisis de Saturación para las secuencias de (a) *P. fasciatum* y (b) *P. tigrinum*

En el caso de *Cichla monoculus* (figura n ° 36), se puede apreciar que las transiciones alcanzan la saturación aproximadamente al llegar a distancias genéticas superiores al 5%, mientras que las transversiones siguen un incremento lineal. De hecho se pueden identificar tres grupos de secuencias, el primero entre las distancias de 0 a 5%, el segundo con las distancias entre 5 y 15% y el tercero por encima de 15%. Este último grupo corresponde a las comparaciones por pares de las secuencias del Alto Madera CO874MAN y CO790 MM con la secuencia del Ucayali (CO30054UCA). El segundo grupo corresponde a las comparaciones por pares de CO874MAN, CO790MM y CO30054 con las secuencias del Alto Madera restantes, mientras que el primer grupo corresponde exclusivamente a comparaciones entre las secuencias del Alto Madera con la excepción de CO874MAN y CO790MM.

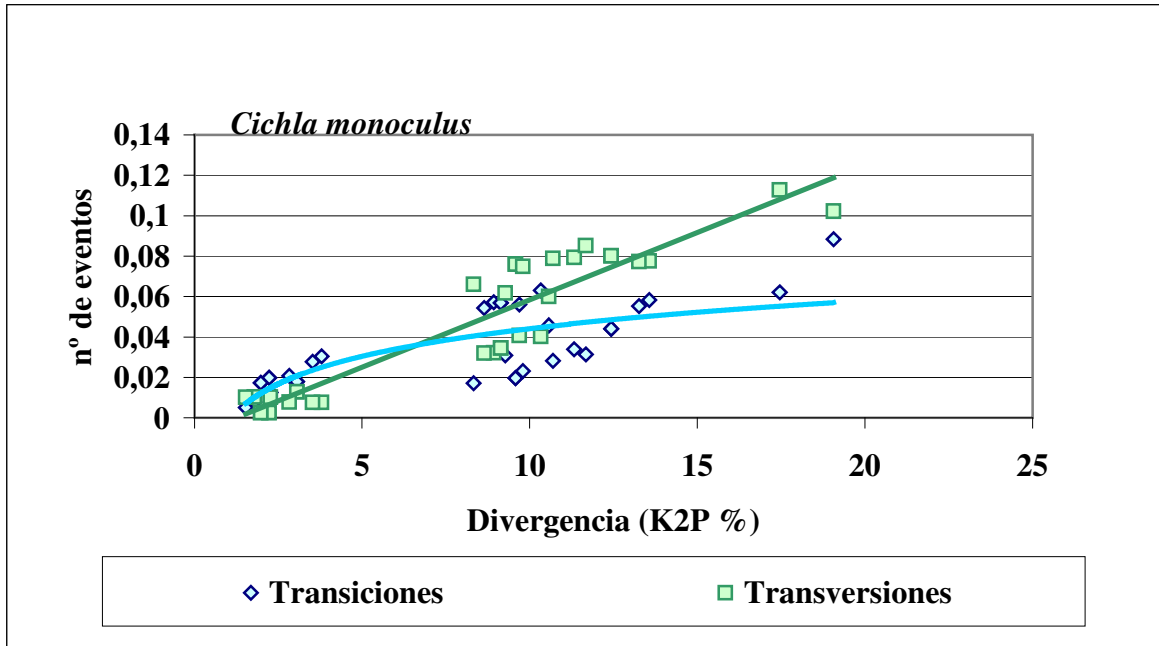


Figura n º 36.- Análisis de Saturación para las secuencias de *C. monoculus*

4.3.2.2.- Homoplasia.

La homoplasia juega un papel negativo sobre la confiabilidad de una inferencia filogenética de parsimonia máxima. Una manera de cuantificarla es el establecer la relación entre el número de mutaciones existentes en el total de secuencias estudiadas y la longitud del árbol de parsimonia máxima, si la relación es inferior a uno, la homoplasia es alta y si la relación es igual o mayor a la unidad, la homoplasia no tiene efecto alguno sobre el proceso de inferencia (tabla n º 25). En todos casos la homoplasia es despreciable. Solo *P. brachypomus* y *C. monoculus* presentan valores inferiores a la unidad, pero no se trata de un nivel muy bajo de homoplasia.

Tabla n º 25 .- Cuantificación del grado de homoplasia existente en los grupos de secuencias obtenidos para las especies en estudio.

<i>Especies</i>	Número de mutaciones (E)	Longitud del Árbol (L)	Relación E/L
<i>C. macropomum</i>	163	85	1,92
<i>P. brachypomus</i>	108	120	0,90
<i>P. nattereri</i>	41	16	2,56
<i>P. fasciatum</i>	12	12	1,00
<i>P. tigrinum</i>	6	6	1,00
<i>C. monoculus</i>	80	87	0,92

4.3.3.- Test de neutralidad

Se efectuaron dos tests de neutralidad para las secuencias obtenidas, el test de Tajima y el test de Fu y Li (Tabla n ° 26). Los resultados se resumen en la siguiente tabla. En ninguno de los casos los estadísticos empleados pudieron rechazar la hipótesis de neutralidad en las mutaciones de las secuencias en estudio. El test de Tajima mostró en todos los casos valores negativos, mientras que el test de Fu y Li, mostró tanto valores positivos como negativos, pero nunca significativos.

En resumen, los resultados de estos análisis nos indican que no se puede rechazar la hipótesis de evolución neutral de las secuencias de la región de control del DNA mitocondrial obtenidas en el presente estudio. Por lo tanto es justificado proseguir con los análisis filogeográficos.

Tabla n ° 26.- Valores obtenidos para los tests de neutralidad de Tajima y Fu & Li

Especies	Test de Tajima			Test de Fu y Li		
	D	Significancia		F	Significancia	
<i>Colossoma macropomum</i>	-1,70669	NS	0,10>P>0,05	-1,59348	NS	P>0,10 ns
<i>Piaractus brachypomus</i>	-0,89729	NS	P>0,10	0,94703	NS	P>0,10 ns
<i>Pygocentrus nattereri</i>	-0,52996	NS	P>0,10	0,21763	NS	P>0,10 ns
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	-1,29784	NS	P>0,10	-1,59348	NS	P>0,10 ns
<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	-0,25465	NS	P>0,10	0,61774	NS	P>0,10 ns
<i>Cichla monoculus</i>	-1,61057	NS	0,10>P>0,05	-1,82232	NS	P>0,10 ns

4.4.- Filogeografía

4.4.1.- *Colossoma macropomum*.

C. macropomum (Tambaqui) es uno de los peces más grandes de la ictiofauna amazónica (Calcagnotto et al. 2000). Es una especie muy exitosa en las planicies de inundación donde se destaca de las demás especies por su valor comercial y sus propiedades organolépticas incomparables (Villacorta-Correa et al. 1990, Calcagnotto et al. 2000). Se trata también de una de las especies más estudiadas tanto respecto a su productividad en cautiverio, autoecología y ciclo de vida. Sin embargo, algunos aspectos de su biología aún se desconocen. En la región del Alto Madera ha sido muy poco estudiado (Villacorta-Correa et al. 1990).

Se destaca esencialmente lo siguiente:

- La secuencia proveniente del río Solimões, Coarí, Parintins, Ucayali, Santarem, Tabatinga, Orimixiná se hallan entre medio de secuencias del Alto Madera.
- Se distinguen dos linajes mitocondriales (100% de bootstrap), el primero compuesto por las secuencias del Manuripi y Guaporé asociadas con secuencias del Coarí y del Parintins.
- El segundo linaje consiste de linajes mitocondriales mezclados con linajes del Orimixiná, Solimões, Tabatinga, Santarem y Ucayali. Dentro de este grupo se distingue un grupo de linajes exclusivo del Alto Madera .
- Existen dos linajes exclusivos del Alto Madera que se diferencian claramente de los linajes del resto de la Amazonía.

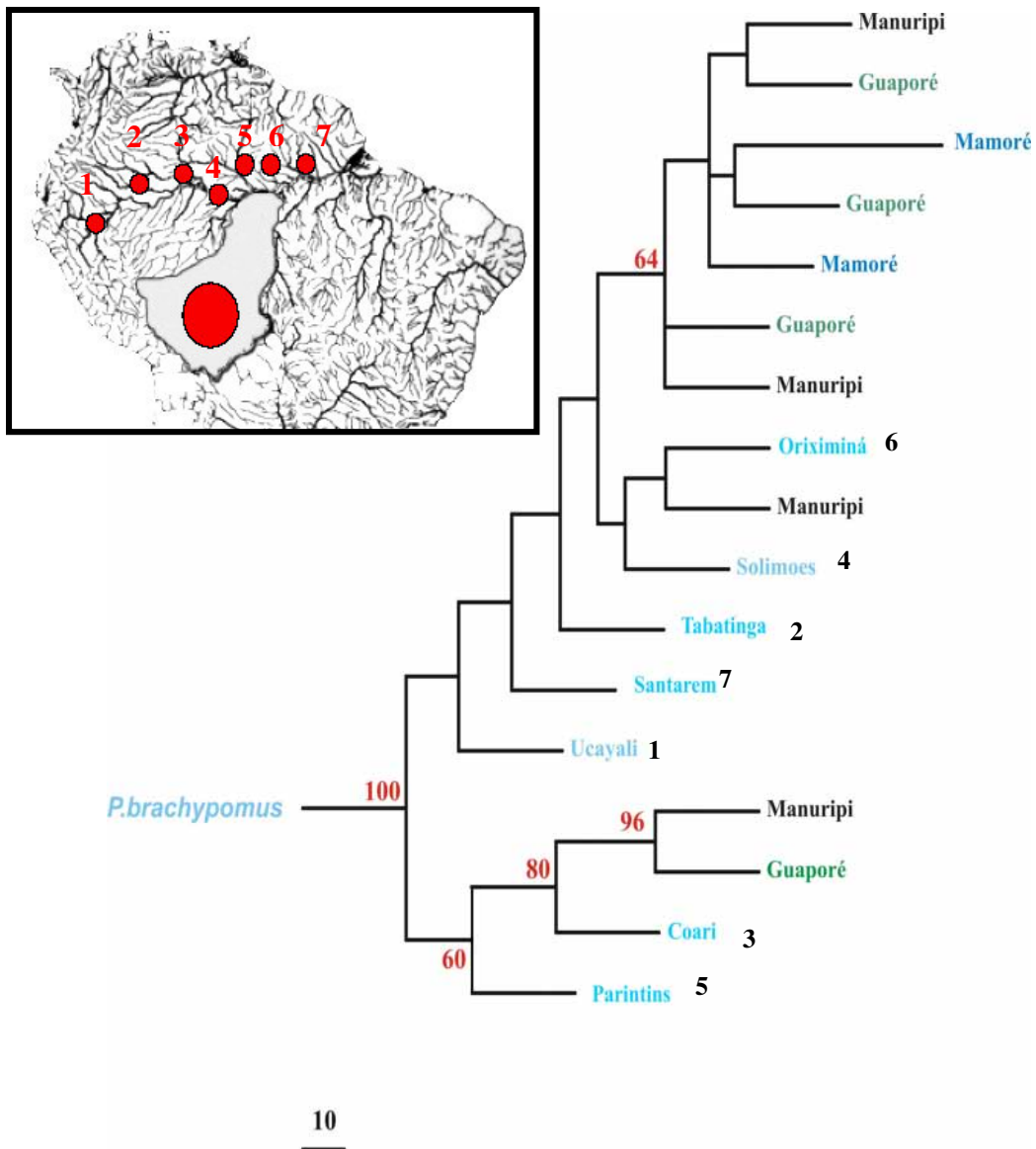
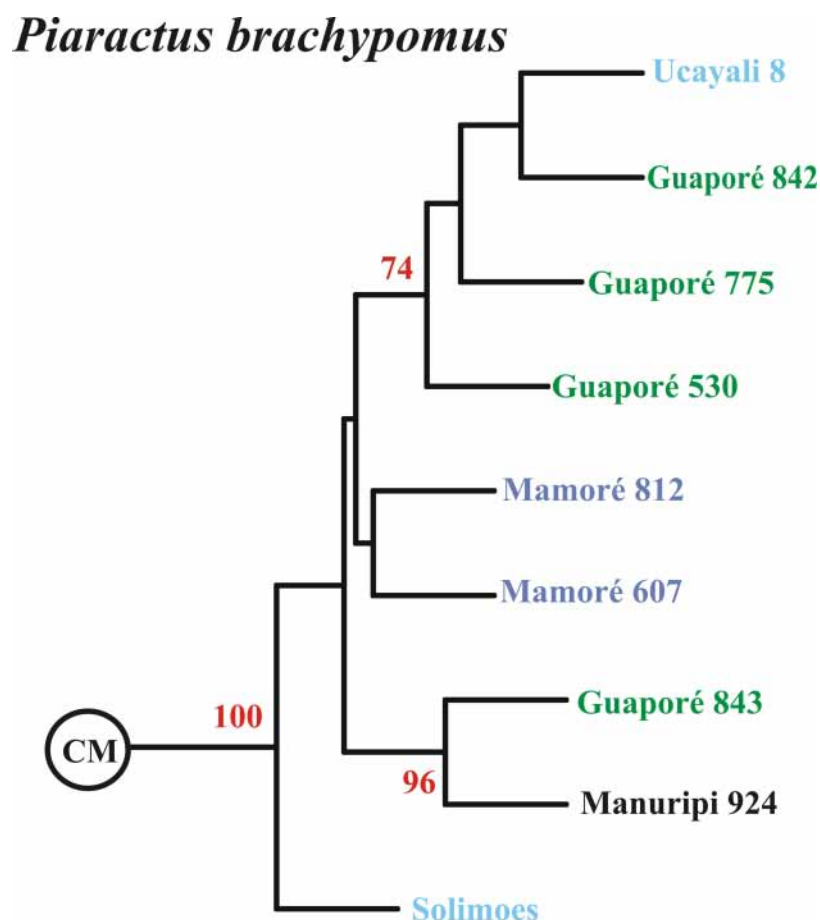


Figura n ° 37.- Filogeografía de *Colossoma macropomum* a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método de parsimonia máxima

4.4.2.- *Piaractus brachypomus*

Este carácido (conocido también como Pirapatinga) muy similar en cuanto a biología a *C.macropomum* es del mismo modo, una especie de gran interés económico y poco estudiada, salvo para acuicultura.

Los análisis de divergencia genética dentro del Alto Madera y fuera de esta zona (Ucayali y Solimões) no permiten diferenciar una asociación geográfica evidente. Pero sí se pone en evidencia que el único haplotipo obtenido del Manuripi es aquel que se separa más del resto de las secuencias.



5

Figura n ° 38.- Filogeografía de *Piaractus brachypomus* a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método de máxima

El análisis filogeográfico muestra sin embargo tres linajes conteniendo todas las secuencias. En primer lugar parece que la única secuencia del Solimões se halla separada del resto de los haplotipos, que se agrupan en dos linajes. El primero de dichos linajes comprende dos secuencias, provenientes respectivamente del Manuripi (PB 924MAN) y del Guaporé (PB843GG). Y finalmente se observa un linaje con haplotipos del Guaporé y del Ucayali. Sobre la base a la información obtenida, los haplotipos de Mamoré podrían constituirse en un cuarto linaje pero no existe todavía la suficiente información. Finalmente podemos inferir que la historia de esta especie en el alto Madera se ha construido en conjunto con la del Ucayali, y con probabilidad, a partir de dispersión de la Amazonía central en un periodo de tiempo reciente, quizás hace aproximadamente 0.75 millones de años (reloj molecular calibrado para *Prochilodus spp*) o 1 millón de años atrás, es decir dentro del Pleistoceno.

A pesar de las similitudes ecológicas y biológicas entre *P. brachypomus* y *C. macropomum*, debemos notar que el patrón de diversificación intra-específica de estas dos especies a nivel del Alto Madera es diferente. En primer lugar y a pesar de la gran incertidumbre asociada a los relojes moleculares, la diversificación de *P. brachypomus* parece ser un poco más reciente. En segundo lugar, la única secuencia del Ucayali no se diferencia significativamente de las secuencias del Alto Madera y solo escasamente de la del Solimões, cercana a la raíz. En ambos casos la estructuración es incipiente, o bien el número de muestras es insuficiente para ponerla en evidencia. De hecho, en un estudio paralelo empleando marcadores nucleares (intrones y aloenzimas) se ha podido establecer que este fenómeno se traduce en una diferencia de frecuencias entre alelos dentro de las cuencas del Alto Madera probablemente por efecto de la deriva génica.

El análisis de parsimonia (Figura n ° 38) muestra por lo menos dos linajes bien diferenciados. Uno que incluye secuencias del Manuripi PB924MAN y del Guaporé, PB843GG. Y un linaje que incluye las secuencias restantes del Guaporé y la secuencia del Ucayali. (Nuevamente las secuencias del Alto Madera son parafiléticas). La posición de la secuencia del Solimões (PB SOL) y de las secuencias del Mamoré (PB812MM y PB607MM) no pudo resolverse con las muestras analizadas.

4.4.3.- *Pygocentrus nattereri*

El caso de *P. nattereri* es particular ya que se trata de un depredador que forma grupos o escuelas y que es considerado más bien como sedentario. El análisis genético nos ha demostrado que esta especie presenta, por lo menos a nivel de la región Dloop, una diversidad genética muy baja ($0.13\% \pm 0.12\%$ dentro del Alto Madera, $0.45\% \pm 0.11$ incluyendo la Amazonía Central, Ucayali y Solimões). Esto puede explicarse por dos mecanismos no excluyentes: un elevado flujo genético entre las cuencas, algo que en ausencia de fragmentación no necesariamente contradice el carácter sedentario de la especie o bien ha experimentado en épocas recientes, un evento de radiación rápida dentro del Alto Madera que puede ser precedida por una reducción drástica del número poblacional o simplemente por una colonización reciente. La separación entre las secuencias del Alto Madera y las del Ucayali y Solimões se remonta a un periodo comprendido entre 0.90 y 0.60 millones de años empleando los dos relojes moleculares

mencionados para los caraciformes. Que la historia evolutiva de estas secuencias es reciente lo demuestra también el análisis de Transición / Transversión ($\kappa=4.2$).

En todo caso, los haplotipos del Alto Madera constituyen un linaje genético independiente del resto de la Amazonía. Un linaje que sin embargo no presenta una estructuración genética aunque esta se hace evidente en el análisis de marcadores moleculares más sensibles como los microsatélites (datos no publicados :IRD, 2003).

Un hecho importante que debe tenerse en cuenta para estas tres especies de Serrasalminae es que se sabe que estuvieron presentes en la zona de estudio por lo menos desde hace 15 millones de años (Lundberg, 1998, 2001). De hecho se tienen algunos registros fósiles que sitúan peces con dentaduras altamente especializadas y muy similares a las de estas tres especies en yacimientos de 65 millones de edad.

El análisis de MP (Figura n ° 39) de las secuencias de *P. nattereri* nos demuestra que el grupo de secuencias provenientes del Alto Madera se comporta como un grupo compacto, muy diferente de las secuencias del Solimões y del Ucayali.

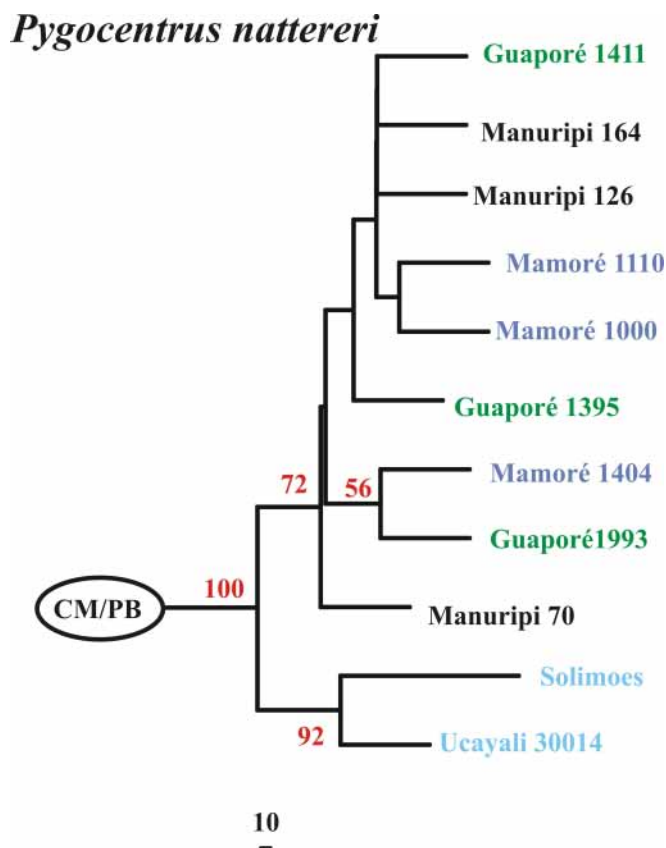


Figura n ° 39.- Filogeografía de *Pygocentrus nattereri* a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método parsimonia máxima.

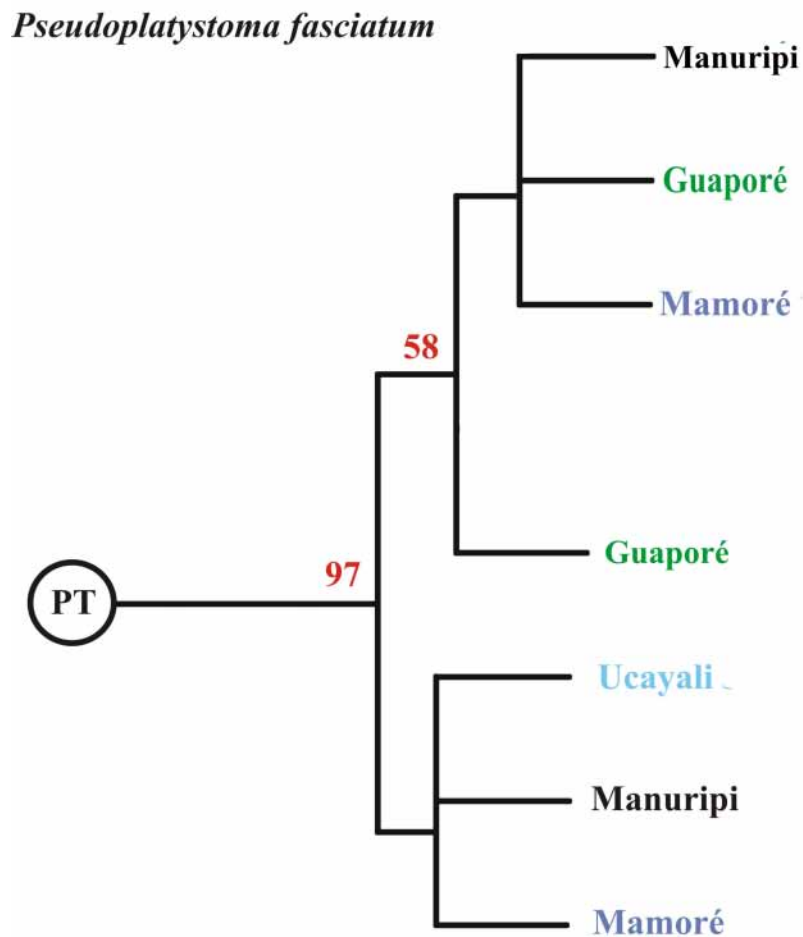
4.4.4.- *Pseudoplatystoma fasciatum*.

Las dos especies de esta familia *P. fasciatum* y *P. tigrinum* corresponden a dos especies morfológicamente cercanas y cuya biología es muy similar. La mayor diferencia reside en que *P. fasciatum* suele hallarse hacia la cabecera de los ríos mientras que *P. tigrinum* se halla más bien en las zonas más bajas. Ambos peces son grandes migradores. Las migraciones tróficas se realizan por lo general a fines de la estación seca (Septiembre-Octubre). Ambos son de gran interés económico para la pesca y para la acuicultura.

Pocos trabajos se han llevado a cabo en estas dos especies. Se destacan los trabajos de Coronel (2001), Rivera (2003) Choquecallata & Barreta (2004, no publicado) y de Barreta (2004 no publicado). En 2001, Coronel puso en evidencia un nivel muy bajo de diferenciación genética tanto en el DNA mitocondrial (PCR-RFLP) como a nivel isoenzimático. Del mismo modo pero trabajando con el DNA mitocondrial, Rivera demostró una muy baja estructuración genética en las poblaciones bolivianas de *P. fasciatum* y *P. trigrinum*. Finalmente, en dos estudios paralelos al presente trabajo pero empleando los marcadores nucleares, aloenzimas (Choquecallata & Barreta, 2004) e intrones (Barreta, 2004) se obtuvieron resultados preliminares que apuntan en todos los casos a un bajo nivel de diferenciación dentro del Alto Madera.

Los análisis genéticos han demostrado que se trata de una especie de muy baja variabilidad genética $0.41 \% \pm 0.12\%$ en toda la zona estudiada. No fue posible establecer una diferenciación entre las secuencias del Alto Madera y la única secuencia del Ucayali. En definitiva no existe una estructuración genética que haya podido ser puesta en evidencia por las secuencias de la región Dloop analizadas, en conformidad con los trabajos mencionados.

En este caso el análisis de MP (figura n ° 40), fue incapaz de revelar una estructuración genética particular., Las secuencias del Alto Madera y del Ucayali no se segregan.



10

Figura n ° 40.- Filogeografía de *Pseudoplatystoma fasciatum* a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método parsimonia máxima.

4.4.5.- *Pseudoplatystoma tigrinum*.

Los análisis genéticos han demostrado que se trata de una especie de muy baja variabilidad genética $1.85 \% \pm 0.08\%$ en toda la zona estudiada. No fue posible establecer una diferenciación entre las secuencias del Alto Madera y la única secuencia del Ucayali. En definitiva y de manera similar al del *P. fasciatum*, no existe una estructuración

genética que pueda ser puesta en evidencia por las secuencias de la región Dloop analizadas, en conformidad con los trabajos mencionados antes.

El patrón de diferenciación genética para ambas especies de pimelodidos es consistente por una parte con la dinámica de migración característica de estas especies y por otra parte con eventos poblacionales recientes. Los niveles de divergencia son consistentes con una historia que no se remonta a más de 1.5 millones de años atrás para *P. tigrinum* y 0.30 millones de años para *P. fasciatum*. Si aceptamos que esta especie se halla presente en la cuenca del Alto Madera hace 3 a 4 millones de años (Coronel, 2001), el nivel de diferenciación actual, hace pensar que a lo largo del Pleistoceno se han producido reducciones drásticas de los tamaños poblacionales. En caso contrario se podría pensar también en una colonización reciente a partir de la Amazonía central (Solimões). La ausencia de muestras provenientes de dicha zona hace imposible poder evaluar estas hipótesis.

La ausencia de eventos de transversión entre todos los haplotipos observados en ambas especies apoya también la noción de una historia evolutiva reciente.

Otra explicación posible es que las tasas de mutación sean inusualmente bajas. Sin embargo, el uso de marcadores moleculares y bioquímicos con diferentes propiedades evolutivas (nucleares vs. mitocondriales, codificantes vs no-codificantes) en otros estudios mencionados hacen que esto sea poco probable.

En el estudio de Rivera (2003) la diversidad encontrada era superior a la de nuestro estudio. El marcador empleado era también la región Dloop pero también el Citocromo b. La diversidad detectada por lo tanto se hallaba contenida esencialmente en la región del Citocromo b. Esta es una alternativa interesante para poner en evidencia patrones de diferenciación poblacional a nivel geográfico más amplio.

Del mismo modo, el análisis de MP muestra una ausencia total de estructura genética en esta especie y la no segregación de las de las secuencias del Alto Madera y del Ucayali

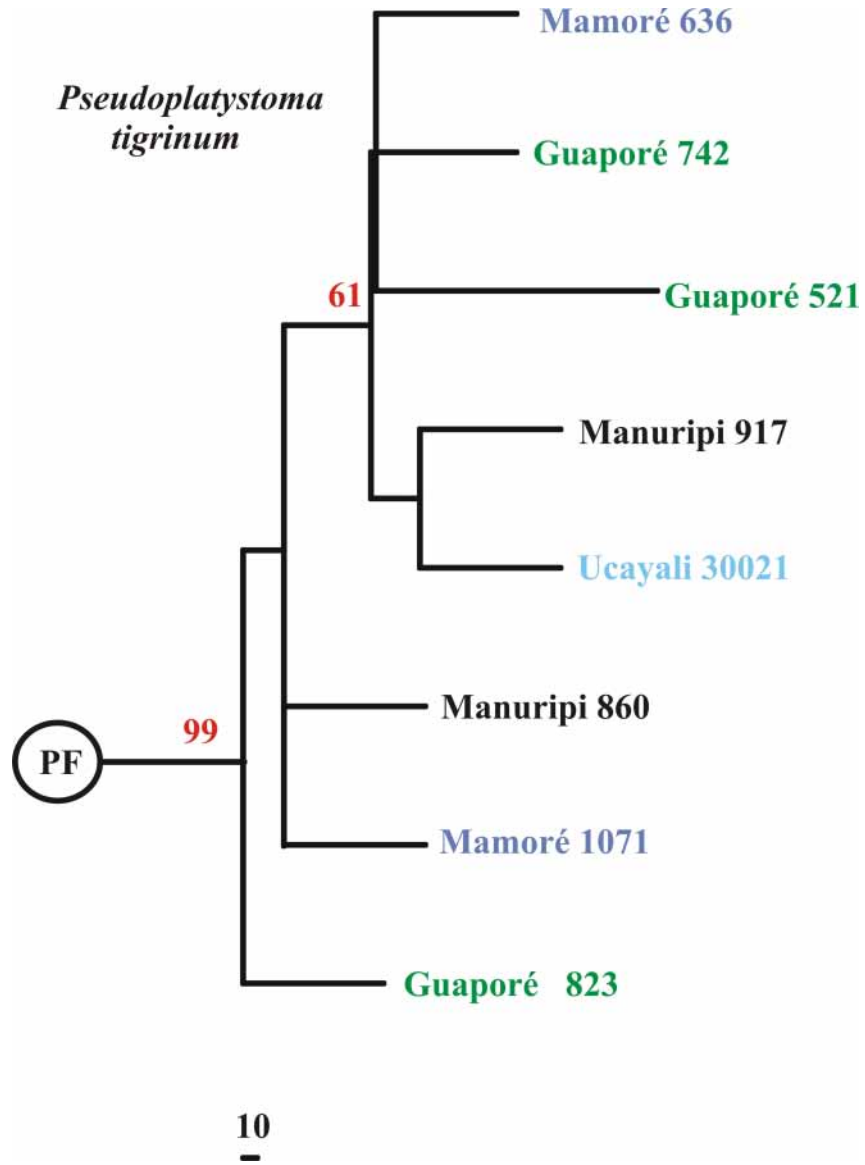


Figura n ° 41.- Filogeografía de *Pseudoplatystoma tigrinum* a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método parsimonia máxima.

4.4.6.- *Cichla monoculus*

En cuanto a las dos especies de cíclidos que se utilizaron, debemos mencionar que los análisis se limitaron a la fracción 5' (cerca de 500 bp.) de la Región Dloop de *C. monoculus* ya que por una parte no se pudieron obtener secuencias completas y por otra parte, las muestras de *A. crassipinis* se mostraron inadecuadas a la estrategia de secuenciación empleada.

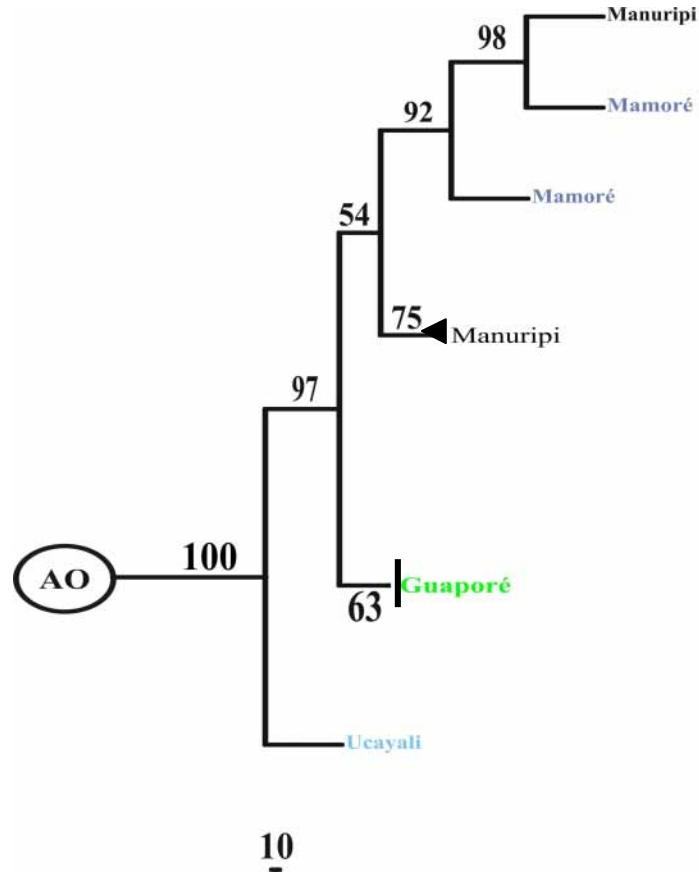


Figura n ° 42.- Filogeografía de *Cichla monoculus* a partir de la secuenciación de la región Dloop, de control mitocondrial mediante el método parsimonia máxima.

La distancia genética que separa las diferentes muestras de *C. monoculus* es, en la mayor parte de los casos apreciable. El rango se ubica entre 0.00% (CO865MAN y CO888MAN por ejemplo) y 20.60 % (entre CO790MM y CO 50054UCA). Las muestras provenientes de ríos diferentes se segregan con claridad. Se hace evidente que existe una estructuración genética en esta especie pero se requieren más muestras para establecerla de manera confiable.

En todo caso, los análisis genéticos demostraron que existen por lo menos tres linajes de secuencias mitocondriales entre las nueve muestras analizadas. Estos tres grupos de secuencias se hacen también evidentes al realizar el análisis de saturación. Dichos linajes incluyen por un lado al haplotipo único del Ucayali (CO30054), el segundo linaje incluye todas las secuencias del Guaporé, caracterizado por ser un río de aguas negras. Y el tercer linaje incluye a muestras provenientes de dos ríos de aguas blancas como son el Manuripi y el Mamoré. La divergencia de las dos muestras CO874MAN y CO790MM dentro de este tercer linaje esta por encima del valor intraespecífico pero su ubicación dentro de este tercer linaje es muy consistente (valor de bootstrap de 93%). El patrón de estructuración es consistente con las características biológicas de la especie, en particular su naturaleza sedentaria y fragmentada (al contrario de lo observado para *P. nattereri*). Este patrón también ha sido puesto en evidencia por Ibáñez (2002) mediante análisis con marcadores genéticos mitocondriales y nucleares y por Carvajal (datos no publicados) mediante marcadores nucleares.

Por otra parte se considera que se trata de una especie característica de aguas negras como las del Guaporé. Esto sugiere que las condiciones ecológicas juegan un papel importante en la estructuración genética de esta especie, algo que puede ser consistente con procesos de especiación simpátrica. En la genealogía obtenida en este trabajo, un linaje asociado de manera exclusiva con el Guaporé es independiente de los otros linajes del Alto Madera. También debemos notar que en simpatria dentro de un mismo río (el Manuripi) se halla un haplotipo muy divergente (CO874MAN) que en parsimonia se agrupa con los haplotipos característicos de un segundo río, el Mamoré. Esto ha sido asociado por algunos autores con procesos de especiación en simpatria (Bush, 1994).

También es evidente que las muestras del Alto Madera se separan con claridad de la secuencia única del Ucayali. Al igual que en el caso de *C. macropomum*, el nivel de divergencia de la secuencia del Ucayali (CO30054UCA, 12.81% \pm 2.08%) respecto a la muestra del Alto Madera nos sugiere que existan dos especies, criterio compartido por Kullander (2002).

En todo caso la historia evolutiva de las muestras del Alto Madera se abarcaría al Pleistoceno y se remontaría hasta la frontera entre el Oligoceno y el Pleistoceno (1.80 a 2.00 millones de años) en base al reloj molecular calibraron para los cíclidos en 6 a 7 % por cada millón de años por Volckaert, Hänfling, Hellemans & Carballo (2002)

En este caso, el análisis de UPGMA (figura n ° 42) muestra tres grupos de secuencias bien diferenciados, en primer lugar están las secuencias pertenecientes al Guaporé que constituyen un linaje separado. En segundo lugar estan dos secuencias del Manuripi (CO888MAN y CO865MAN) junto a una secuencia del Mamoré (CO1111MM). Finalmente tenemos un grupo de secuencias que incluye a la muestra del Ucayali (CO30054UCA), una muestra del Mamoré (CO790MM) y una secuencia del Manuripi CO874MAN. El análisis de MP muestra también una estructuración clara en tres grupos, el primero constituido exclusivamente por las secuencias del Guaporé, un segundo grupo constituido exclusivamente por secuencias del Manuripi y un tercer grupo constituido por secuencias del mamoré y del Manuripi.

CAPITULO QUINTO: DISCUSIONES

Filogeografía comparada

A pesar del escaso número de muestras analizadas, la comparación de la historia evolutiva de los siete especies nos permite concluir que no existe un patrón común a las mismas. Es decir que diferentes eventos parecen haber estructurado la ictiofauna del Alto Madera. A pesar de ello, existen algunos aspectos compartidos.

En primer lugar podemos citar la baja divergencia encontrada entre las secuencias de los dos Pimelodidae (*P. fasciatum* y *P. tigrinum*) y del Serrasalminae *P. nattereri*. Este bajo nivel de divergencia puede ser el resultado de cuatro procesos particulares: una baja tasa de mutación, selección fuerte de ciertos individuos que hubiera permitido la retención de un bajo número de haplotipos mitocondriales (hitch-hiking), homogenización por fuerte flujo génico, expansión reciente a partir de un pequeño número de individuos (efecto cuello de botella).

No podemos descartar la hipótesis de una tasa de mutación particularmente baja para la región D-Loop de *P. fasciatum* y *P. tigrinum*. Empleando un reloj molecular conservador (1.3 % por millón de años, Bermingham, 1997), ambas especies habrían divergido hace aproximadamente 2.7 ± 0.44 millones de años. Aún bajo tasas de mutación muy bajas se esperaría encontrar cierta diferenciación de las poblaciones de estas dos especies. La retención de un bajo número de haplotipos mitocondriales por efecto de una fuerte selección tampoco puede ser rechazada con la información actualmente disponible. Hasta ahora, el uso de marcadores bioquímicos y moleculares nucleares ha demostrado también un bajo nivel de divergencia (Barreta y Choquecallata, com. pers.) pero todavía queda por demostrarse un efecto selectivo. Otro aspecto importante es que mediante RFLP de la región D-Loop-Citocromo b se pudo evidenciar un mayor nivel de divergencia contenida en la región Citocromo b, algo inconsistente con un efecto de retención de pocos haplotipos mitocondriales bajo un efecto selectivo. Estas especies son efectivamente grandes migradoras y es posible que como resultado de ello se haya producido una fuerte homogenización genética de las poblaciones de estas dos especies. La topología de los árboles UPGMA y de Parsimonia nos sugieren más bien una radiación rápida y reciente dentro del Alto Madera por efecto, ya sea a partir de una colonización reciente o bien precedida por una fuerte reducción del número poblacional durante el Pleistoceno.

Con el escaso número de muestras analizado no podemos profundizar más el análisis. Tampoco está claro el origen de los haplotipos ancestrales, en particular porque no poseemos secuencias del Solimões para ambos **Pimelodidae**. No podemos descartar la ocurrencia de eventos de reducción poblacional con pérdida de diversidad (efecto cuello de botella) en áreas aisladas (refugios) dentro del Alto Madera.

Algo similar ocurre con el caso de *P. nattereri*, con una gran diferencia: se trata de un organismo cuya capacidad de dispersión individual es baja y sin embargo, esto no conduce a una estructuración evidente de las poblaciones presentes en diferentes ríos (lo opuesto ocurre con *C.monoculus*, otro sedentario). Creemos que el caso de la población de *P. nattereri* del Alto Madera debe ser interpretado como una metapoblación (Wakeley et al. 2001). Una metapoblación se define como una población que se halla subdividida en un gran número de demes, cada uno de los cuales está sujeto a extinción y recolonización y que recibe migrantes a partir de demes vecinos. En nuestro caso, esta metapoblación se estructura de tal manera que a pesar del reducido desplazamiento de cada individuo, el flujo génico es en definitiva de gran magnitud. El carácter sedentario de esta especie puede ser el resultado de una fuerte territorialidad, siendo este el caso, el flujo génico estaría relacionado con la migración de los juveniles para establecerse en nuevos territorios. Sin embargo, y del mismo modo que en el caso de los **Pimelodidae**, expuesto más arriba, nos parece bastante probable que se haya producido durante un periodo reciente una fuerte reducción del tamaño poblacional seguido de una radiación rápida de los haplotipos Bolivianos. Esto estaría corroborado con la evidencia de una fuerte estructuración de esta población en base a microsatélites, marcadores moleculares nucleares cuya elevada tasa de mutación los hace útiles para el análisis de eventos muy recientes (Pouyau, com.pers).

En cuanto a la divergencia hallada en *C. monoculus* podemos decir que en términos relativos, se trata de una alta divergencia. Así por ejemplo Wilson et al, 2000 obtienen valores entre 0.25% y 0.60% para la divergencia en la región Dloop de cíclidos en Nicaragua y los reportan como valores altos. Sin embargo, se sabe que la tasa de mutación en el DNA mitocondrial en los cíclidos neotropicales es más elevada que la de otros taxa. De hecho, la calibración del reloj molecular propuesta por Meyer en 1990 (Volckaert et al., 2002) nos ha permitido ubicar la diversificación de *C. monoculus* en el Alto Madera dentro del contexto del Pleistoceno temprano(Figura n ° 43), sugiriendo también una radiación rápida pero además una diferenciación rápida. *C.monoculus* presenta con relación al haplotipo del Ucayali, una divergencia que se ubica por encima del nivel intraspecífico. El nivel de estructuración puede ser efecto de su habito sedentario y fuertemente territorial, unido probablemente a un comportamiento reproductivo complejo. El caso de *C. monoculus* es muy particular por otro aspecto. Ya hemos mencionado que la estructuración puesta en evidencia responde en gran medida a ciertas características de la biología de esta especie, en particular su carácter sedentario y territorial. Otro aspecto particular es la evidente importancia de los factores ecológicos en la estructuración genética que se traduce en la existencia de linajes exclusivos de aguas claras o negras (Guaporé) y de aguas mixtas (Manuripi, Mamoré). Esta especie merece un mayor esfuerzo en cuanto al número de muestras utilizadas pero también en cuanto al número de marcadores moleculares analizados. Se debe además aplicar una estrategia multidisciplinaria para aclarar la mayor parte posible de sus aspectos biológicos.

En el caso de *C. macropomum* y *P. brachypomus*, las similitudes son escasas. Ambos grupos presentan un cierto nivel de estructuración dentro de la cuenca del Alto Madera pero sin asociación geográfica particular, los diferentes ríos no se diferencian entre sí y además sin un patrón evidente. Solamente podemos afirmar que en ambos casos, el río dentro del cual se presentan los mayores valores de divergencia es el Manuripi. Es posible que los haplotipos ancestrales se encuentren en este río. Otra similitud que debe ser evaluada con mucho cuidado en razón del escaso número de muestras analizadas se refiere a un patrón común de divergencia para los linajes más recientes, probablemente a partir de individuos llegados al Solimões. Este evento se produjo probablemente a mediados el Pleistoceno en ambos casos. Si bien las fechas asumidas por uso de un reloj molecular no coinciden exactamente, debemos recordar que este tipo de análisis tiene mayor confiabilidad en eventos antiguos que en eventos muy recientes.

En el caso de *C. macropomum* y *P. brachypomus*, es muy probable que se pueda hablar también de sendas metapoblaciones pero probablemente sujetas a mayores restricciones de migración o de éxito en ambientes nuevos. Esto puede deberse a diferencias en las capacidades de dispersión de estas dos especies que son por otra parte, muy parecidas en su biología y ecología. Es difícil pensar en un evento histórico que pueda afectar de manera tan diferente a dos especies con tantas similitudes y distribución equivalente.

La figura n° 43 pone de manifiesto la escala temporal (sobre la base de los relojes moleculares mencionados anteriormente) asignada a los diferentes eventos de divergencia que de acuerdo a los filogramas ocurrieron en las especies estudiadas. Se hace evidente que no existen eventos compartidos entre las diferentes especies, ni a escala temporal ni a escala geográfica.

Estos datos en conjunto parecen estar fuertemente asociados con procesos ocurridos durante el Pleistoceno (Figura n° 43). De confirmarse los resultados con la inclusión de un mayor número de muestras y una mejor cobertura del área de distribución efectiva de estas especies, sería uno de los primeros estudios de ictiología en aportar evidencias a favor de la Teoría de los Refugios del Pleistoceno en la porción occidental de la Amazonía. Sin embargo, no toda la información obtenida es consistente con lo mencionado, varios aspectos establecen diferencias entre las historias evolutivas de las especies estudiadas.

P.nattereri *C.monoculus* *P.brachypomus* *C.macropomum*

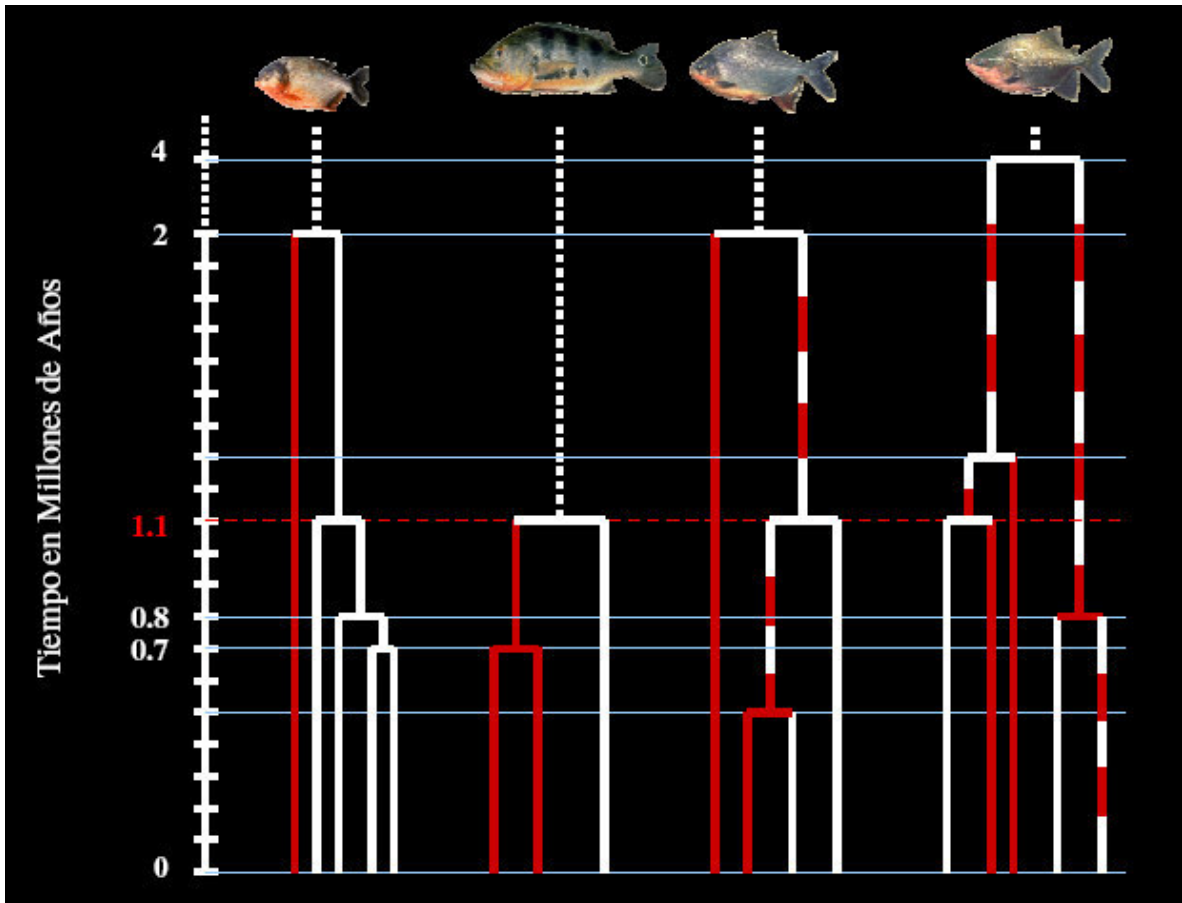


Figura n ° 43.- Escala temporal de los eventos de divergencia puestos en evidencia en el presente estudio bajo la hipótesis reloj molecular

Acuicultura y Conservación

La evaluación de la biodiversidad (Composición, estructura y funcionamiento) dentro y entre áreas es un aspecto central para identificar y priorizar zonas de monitoreo, manejo y protección (Moritz & Faith, 1998). El significado de la variación genética así como el significado de los patrones y mecanismos responsables de esta variación han sido reconocidos como parte de fundamental importancia en la evaluación de la biodiversidad. De hecho la protección de la diversidad genética ha sido incorporada a numerosas políticas nacionales y convenios internacionales (Moritz et al. 1998; Calcagnotto et al. 2000).

A pesar de ello, en la práctica y hasta ahora se ha dado muy poca prioridad a la evaluación directa de la diversidad genética. Muchas veces se piensa que la protección de la diversidad por encima del nivel específico protege necesariamente la diversidad genética. Esta afirmación se ha visto confrontada por efecto de la incompatibilidad entre la taxonomía actual (esencialmente morfológica) y la diversidad genética: un ejemplo de ello es la existencia evidente de especies crípticas. Para la planificación de la conservación de una especie es importante identificar los linajes con significado evolutivo para mantener un máximo de diversidad genética así como el incorporar información a cerca de los procesos poblacionales históricos (Moritz et al. 1998) El presente trabajo aporta algunas informaciones importantes aunque todavía muy preliminares a cerca de seis especies de peces neotropicales en la subcuenca del Alto Madera (Bolivia).

Un primer aspecto es el asociado a la existencia de por lo menos una especies crípticas. Las secuencias obtenidas para *C. monoculus* sugieren la existencia de una especie de *C. monoculus* exclusiva del Ucayali, en contraposición con por lo menos una especies del Alto Madera.

Este es un aspecto de fundamental importancia en vista del establecimiento de sistemas de producción de acuicultura. Para ambas especies existe un riesgo importante de constituir mezclas interespecíficas con consecuencias potencialmente nocivas: baja de la fertilidad (obtención híbridos F1 estériles), pérdida de la eficacia biológica, pérdida de diversidad, importación de parásitos nuevos potencialmente dañinos, entre otras. Esto es de particular importancia en el caso de *C. macropomum*. El significado de este tipo de práctica es ilustrado por el trabajo de Calcagnotto y Almeida Toledo-Filho, (2000) en el Brasil.

Este equipo de trabajo analizó la variabilidad genética en el gen de la transferrina (asociada a la resistencia a enfermedades parasitarias) en cinco estaciones de acuicultura en Brasil. Se puso en evidencia un descenso considerable de la diversidad en dichas plantas de producción. Todos los individuos empleados en los programas de cultivo de esta especie en el Brasil emplean peces provenientes del Centro de Pesquisas Ictiológicas Rodolpho von Ihering (Estado de Ceará). Dichos stocks se fundaron empleando 74 juveniles colectados en el Amazonas superior (Iquitos, Perú). Se sabe que en Bolivia se han introducido sin estudios previos, individuos de esta especie provenientes de Porto Velho (Bajo Madera) y de Acuicultura colombiana (de origen geográfico no especificado).

En el caso de *P. fasciatum* y *P. tigrinum*, el patrón de diversificación puesto en evidencia es importante tanto para la acuicultura como para la conservación. Por una parte, la baja diversidad encontrada hace que esta especie no sea adecuada para acuicultura ya que existe muy poca posibilidad de efectuar un mejoramiento genético de las propiedades de importancia económica. Por el contrario, dada su importancia económica (es probablemente el pez amazónico más pescado en Bolivia) y su homogeneidad en toda la cuenca, puede constituirse en una especie bandera para la protección de su ambiente natural a gran escala.

Algo similar ocurre con *P. nattereri* puesto que si bien su distribución es amplia, las poblaciones del Alto Madera, del Solimões y del Ucayali no son intercambiables. La conservación de esta especie debe pasar por la preservación de su ambiente a una escala espacial importante.

Otro punto de considerable importancia se refiere al papel que juegan en la actualidad el Alto Madera y el Ucayali en la conservación de las especies de peces de importancia económica. El caso de *C. macropomum* y *P. brachypomus* es un ejemplo determinante. La pesca comercial de estas dos especies en la zona de la Amazonía central ha generado desde los años 60's una sobre-pesca de los adultos, lo que se traduce actualmente en un desplazamiento del esfuerzo de recolección a individuos juveniles. Además, esto es acentuado por el proceso de talado de los bosques de los que dependen estas dos especies para su dieta. La subsistencia de la pesca comercial en esta zona es por lo tanto posible hoy en día solo por el reclutamiento de individuos desde las cabeceras, y en particular desde el Madera, principal tributario del Amazonas. En resumen, un enorme esfuerzo de investigación y conservación enfocado a las cuencas del Ucayali y del Alto Madera debe ser prioritario para permitir un uso sostenible del recurso pesca en la Amazonía en su conjunto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arbogast B.S. & J.Slowinski. 1998. Pleistocene speciation and the mitochondrial DNA clock. En *Science*. Vol. 282: pp.1955a.
2. Avise,J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. En *Molecular Ecology*. Vol.7 (4): pp. 371-379.
3. Avise, J.C., D. Walker & G.C.Johns. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. En *Procedures of the Royal Society of London Bulletin*. Vol. 265: 1707-1712.
4. Ayala, F.J. & J.A.Kliger. 1980. Modern Genetics. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc. Melo Park, California. USA. 844pp.
5. Ayala F.J. 1997. Vagaries of the molecular clock. En *Procedures of the National Academy of Science*. Vol. 94: pp 7776-7783.
6. Bergstrom C.T. & J.Pritchard. 1998. Germline bottlenecks and the evolutionary maintenance of Mitochondrial genomes. En *Genetics*. Vol. 149: pp 2135-2146.
7. Bermingham,E. & C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. En *Molecular Ecology*. Vol.7 : pp 367-369.
8. Bermingham E, S. McCafferty, A.Martin. 1997. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from Panamanian isthmus. En *Molecular Systematics of fishes* (ed. Kocher T, Stephen C), pp. 113-128. Academic Press, San Diego California.
9. Bernatchez,L. & C.C.Wilson. 1998. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. En *Molecular Ecology*. Vol.7(4). Pp.431-452.
10. Bielawski, J.P. & J.R.Gold. 2002. Mutation patterns of mitochondrial H- and L-strand DNA in closely related cyprinid fishes. En *Genetics*. Vol 161: pp 1589-1597.
11. Boore, J.L.. 1999. Animal mitochondrial genomes. En *Nucleic Acid Research*. Vol. 27 (8): 1767-1780.
12. Bromham,L. & D.Penny, 2003. The Modern Molecular Clock. En *Nature Reviews: Genetics*. Vol. 4: pp. 216-224.
13. Brown K.S. & A.N.Ab'Saber, 1979. Ice-age forest refuges and evolution in the neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with modern biological endemism. En *Paleoclimas* (Sao Paulo) nº5.
14. Brown, J.R., K.Beckenbach, A.T.Beckenbach & M.J.Smith. 1996. Length Variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (*Acipenser*). En *Genetics*. Vol. 142: 525-535.
15. Buckup, P.A. 1991. *The Characidiinae: A phylogenetic study of the South American darters and their relationships with other characiform fishes*. . Ph.D. Dissertation, Univ.Michigan, Ann. Arbor
16. Buckup,P.A. 1993. The monophyly of the Characidae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). En *Zool.J. Linn, Soc*. Vol.108: pp. 225-245.
17. Bush, M. 1994. Amazonian speciation: a necessary complex model. En *J. Biogeography*. Vol.21: pp. 5-17.

18. Calcagnotto D. & S. Almeida Toledo-Filho. 2000. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). En *Genetics and Molecular Biology*. Vol.23 (1): pp. 127-130.
19. Cesaroni, D., F.Venanzeti, G.alleggrucci & V.Sbordoni. 1997. Mitochondrial length variation and heteroplasmy in natural populations of the european sea bass, *Dicentrarchus labrax*. En *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 14(5): 560-568.
20. Colinvaux, P.A., M.B. Bush, M. Sreinitz-Kannan & M.C.Miller. 1997. Glacial and postglacial pollen records from the Ecuadorian Andes an Amazon. En *Quaternary Research*. Vol. 48: pp. 69-78.
21. Colinvaux, P.A., P.E.De Oliveira & M.B.Bush. 2000. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. En *Quaternary Science Reviews*. Vol.19 : pp 141-169.
22. Colinvaux, P.A. & P.E. De Oliveira. 2001. Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic. En *Paleogeography, Paleoclimatology, Palaeoecology*. Vol 166 : pp51-63.
23. Colins, A.C. & J.M.Durbach. 2000. Biogeography and ecological forces responsible for speciation in *Ateles*. En *International Journal of Primatology*. Vol. 21(3), 2000.
24. Colwell, K.R.. 2000. A barrier runs through it...or maybe just a river. En *Procedures of the National Academy of Science*. Vol 97 (25) : 13470-13472.
25. Coronel.2001. Population genetics of three species of Pimelodidae (*Brachyplatystoma flavicans*, *Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. tigrinum*). In the rivers Ichilo and Beni, Bolivia. Tesis de Maestría Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.
26. Cortés-Ortiz, L., E. Bermingham, C. Rico, E.Rodríguez-Luna, I.Sampaio & M.Ruiz-García. 2003. Molecular systematics and biogeography of the neotropical monkey genus, *Alouatta*. En *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 26 : pp. 64-81.
27. DaSilva, M.N. & J.L.Patton. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. En *Molecular Ecology*. Vol. 7(4): pp. 475-486.
28. Dergam, J.A., S.R.Paiva, C.E.Schaeffer, A.L. Godinho & F.Vieira.. Phylogeny and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)(Pisces, teleostei) in southeastern Brazil. 2002. En *Genetics and Molecular Biology*. Vol.24 (5) : pp 379-387.
29. Eizirik E., J.Kim, M.Menotti-Raymond, P.G.Crawshaw, S.J.O'Brien & W.E. Johnson. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, mammalia, Felidae). En *Molecular Ecology*. Vol. 10: pp. 65-79.
30. Endler, 1982. Pleistocene Refuges: facts or Fancy?. En Prance G.T.(ed.). *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press. New York.USA. pp. 641-657.
31. Farias I.P., G.Ortí, I.Sampaio, H.Schneider & A.Meyer. 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: monophyly and fast molecular evolution of the Neotropical assemblage. En *Journal of Molecular Evolution*. Vol.48(6): pp 703-711.
32. Farias I.P., G. Ortí & A.Meyer. 2000. Total evidence : Molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlid fishes. En *Journal of experimental zoology*. Vol 288 : pp76-92.
33. Farías I.P., G.Ortí, I.Sampaio, H.Schneider & A.Meyer..2001. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationships among Cichlid fishes. En *Journal of Molecular Evolution*. Vol.53: pp.89-103.

34. Felsenstein, J. 2002. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6a3*. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
35. Gascon C., J.R. Malcom, J.L.Patton, M.NF.da Silva, J.P.Bogart, S.J.Lougheed, C.A.Peres, S.Neckel & P.T.Boag.2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. En *Procedures of the National Academy of Sciences*. Vol.97(25): pp13672-13677.
36. Gayet, M., L.G.Marshall, T.Sempere, F.J.Meunier, H.Cappetta & J.C.Rage.. 2001. Middle Maastrichian vertebrates (fishes, amphibians, dinosaurs and other reptiles, mammals) from Pajcha Pata (Bolivia). Biostratigraphic, paleoecologic and palaeobiogeographic implications. En *Paleogeography, palaeoclimatology, palaeoecology*. Vol (169): pp 39-68.
37. Gerber, A.S., R.Loggins, S.Kumar & T.E.Dowling. 2001. Does Nonneutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes?. En *Annual Reviews of Genetics*. Vol. 35 : 539-566.
38. Goldblatt,P.(ed.), *Biological Relationships between Africa and South América*. Yield University Press, New Haven.
39. Goulding, M., N.J.H.Smith & D.J.Mahar..1996. *Floods of fortune: Ecology And Economy allong the Amazon*. Columbia University Press. New York.193pp.
40. Goulding, M., R.Barthem & E.Ferreira. 2003. *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. The Smithsonian Books, Washington & London.253pp.
41. Gray, M.W., G.Burger & B.F. Lang. 2001. The origin and early evolution of mitochondria. En *Genome Biology*. Vol.2 (6) : 1018.1-1018.5.
42. Gray, M.W., G.Burger & B.F. Lang. 1999. Mitochondrial Evolution. En *Science*. Vol. 183: 1476-1481.
43. Gregory-Wodzicki, K.M.. 2000. Uplift history of the central and northern andes: a review. En *GSA Bulletin*. Vol 112 (7): pp. 1091-1105.
44. Guyot, J.L., J.M.Jouanneau & J.G.Wasson. 1999. Characterisation of the river bed and suspended sediments in the Rio Madeira drainage basin (Bolivian Amazonia). En *Journal of South American Sciences*. Vol. 12 : pp 401-410.
45. Haffer, J.. 1982. General aspects of the Refuge Theory. En Prance G.T.(ed.). *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press. New York.USA. pp. 6-25.
46. Hays, J.D., J.Imbrie & N.J. Shackleton.1976. Variations in the earth's orbit: pacemaker of ice ages. En *Science*. Vol. 194(4270): pp 1121-1132.
47. Hooghiemstra, H. & T.van der Hammen.1998. Neogene and Quaternary development of the neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis, and a literature overview. En *Earth Science Reviews*. Vol 44 : pp 147-183.
48. Johnson,W.E., J.P.Slaterry, E.Eizirik, J.Kim, M.M.Raymond, C.Bonacic, R.Cambre, P.Crawshaw, A.Nunes, H.N.Seuáñez, M.A.Martins Moreira, K.L.Seymour, F.Simon, W.Swanson & S.J.O'Brien. 1999. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. En *Molecular Ecology* . Vol.8 : pp. 579-594.
49. Kennan, L., S.Lamb & C. Rundle. 1995. K-Ar dates from the Altiplano and Cordillera Oriental of Bolivia: implications for Cenozoic stratigraphy and tectonics. En *Journal of South American Earth Sciences*. Vol. 8(2): pp. 163-186.
50. Klicka, J. & R.M. Zink. 1997. The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. En *Science*. Vol. 277: pp. 1666-1669.

51. Knowles, L.L. & W.P.Maddison. 2002. Statistical phylogeography. En *Molecular Ecology*. Vol 11 : pp 2623-2635.
52. Kullander S.O (1998). A phylogeny and classification of the south American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). En Malabarba, L.R., R.E.Reis, R.P.Vari, Z.M.S.Lucena, C.A.S.Lucena (eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* : pp 461-498. Ediprucs. Porto Alegre
53. Kumar S, K. Tamura, I. B. Jakobsen & M. Nei. 2001. *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
54. Ledru, M.P., P.I.S.Braga, F. Soubiès, M.Fournier. 1996. The last 500,000 years in the neotropics (southern Brazil): evolution of vegetation and climate. En *Paleogeography, palaeoclimatology, Palaeoecology*. Vol. 123 : pp 239-257.
55. Lessa,E.P., J.A.Cook & J.L.Patton. 2003. Genetic footprints of demographic expansion in north America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. En *Procedures of the National Academy of Science*. Vol. 100(18): pp 10331-10334.
56. Li,W.H.. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts, USA. 487 pp.
57. Loughheed, S.C., C.Gascon, D.A. Jones, J.P.Bogart & P.T.Boag. 1999. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). En *Procedures of the Royal Society of London Bulletin*. Vol. 266: 1829-1835.
58. Lucena 1993. *Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Osatariophysii, Characiformes)*. Ph.D.Disertation, Univ. São Paulo, São Paulo, Brasil.
59. Lundberg, J.. 1993.Chapter 8 : African-South American freshwater fish clades and continental drift: a problem with a paradigm. En Goldblatt,P.(ed.), *Biological Relationships between Africa and South América*. Yield University Press, New Haven pp. 156-199.
60. Lundberg,J.. 1998. The temporal context for the diversification of neotropical fishes. En Malabarba, L.R., R.E.Reis, R.P.Vari, Z.M.S.Lucena, C.A.S.Lucena (eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* : pp 49-68. Ediprucs. Porto Alegre.
61. Lundberg, J. G., L.G.Marshall, J.Guerrero, B.Horton, M.C.S.L.Malabarba & F.Wesselingh. 1998. The stage for neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. En Malabarba, L.R., R.E.Reis, R.P.Vari, Z.M.S.Lucena, C.A.S.Lucena (eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* : pp 13-48. Ediprucs. Porto Alegre.
62. Lundberg, J. 2001. Freshwater riches of the Amazon. En *Natural History*. Vol.110 (7): pp. 36-43
63. Martin, A.P. & E.Bermingham. 1998a. Systematics and evolution of the lower central American cichlids inferred from analysis of cytochrome b gene sequences. En *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 9(2) : pp 192-2003.
64. Martin, A.P. & E.Bermingham. 1998b. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. En *Molecular Ecology*. Vol. 7(4): pp. 499-517.
65. Martin, A.P. & E. Bermingham. 2000. Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical catfish. En *Procedures of the Royal Society of London Bulletin*. Vol 267 (7) pp1135-1141.
66. Mayr,E. & R.J.O'Hara. 1986. The Biogeographic evidence supporting the Pleistocene Forest Refuge Hipotesis. En *Evolution*. Vol.40 : pp.55-67.

67. Meyer, A.. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En *Biochemistry and molecular biology of Fishes* (Vol. 2). Elsevier Science Publishers : 38pp.
68. Montgomery, D.R., G.Balco, S.D:Willett. 2001. Climate, tectonics, and the morphology of the Andes. En *Geology*. Vol. 29 (7): pp.579-582.
69. Moritz, C. & D.P.Faith. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. En *Molecular Ecology*. Vol.7: 419-429.
70. Moritz, C., J.L. Patton, C.J.Schneider & T.B.Smith. 2000. Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. En *Annual reviews of Ecology and Systematics*. Vol.31: ``: 533-563.
71. Murray, A.M.. 2001. The fossil record and biogeography of the cichlidae (Actinopterygii: Labroidei). En *Biological Journal of the Linnean Society*. Vol. 74: pp 517-532.
72. Navarro, G. & M.Maldonado. 2002. Geografía ecológica de Bolivia: vegetación y ambientes acuáticos. Centro de Ecología Simón I. Patiño. Cochabamba-Bolivia.
73. Nesbø, C.L., M.O.Arab & K.S.Jakobsen. 1998. Heteroplasmy, length and séquence variation in the mtDNA Control Regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*). En *Genetics*. Vol. 148: pp 1907-1919.
74. Nicholas, K.B., & Nicholas, H.B.Jr..1997. *GenDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments*. Distributed by the author. www.psc.edu/biomed/genedoc
75. Nuttall C.P., 1990. A review of the Tertiary non marine molluscan faunas of the Pebasian and other inland basins of north-western south America. En *Bull.Brit. Mus. Nat. Hist., Geol.*, Nº 45: 165-371.
76. Ortí, G., P.Petry, J.I.R. Porto, M.Jégu & A.Meyer..1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. En *Molecular Ecology*. Vol. 42: pp 169-182.
77. Ortí, G. & A.Meyer. 1997. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. En *Systematic Biology*. Vol. 46 (1) : pp.75-100.
78. Page, R.D.M. & E.C.Holmes. 1998. *Molecular Evolution: a phylogenetic approach*. Blackwell Science Ltd. Oxford, Londres. 346pp.
79. Paillard D.. 1998. The timing of Pleistocene glaciations from a simple multi-state climate model. En *Nature*. Vol. 391 : 378-381.
80. Parker, P.G; A.A.Snow, M.D.Schug, G.C.Booton & P.A.Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a Molecular Marker. En *Ecology*. Vol. 79(2): pp. 361-382.
81. Perdices, A., E.Bermingham, A.Montilla & I.Droadrio. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (teleostei: Pimelodidae) in Central America. En *Molecular Phylogenetics and evolution*. Vol.25: pp172-189.
82. Pittman W.C.III, S.Candle, J.LaBrecque & J.Pindell. 1993. Fragmentation of Gondwana: The separation of Africa from South America. En Goldblatt, P.(ed.), *Biological Relationships between Africa and South América*. Yield University Press, New Haven.
83. Potter, P.E.. 1997. The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a natural history. En *Journal of South American Earth Sciences*. Vol. 10 (5-6): pp. 331-344.
84. Rand, D.M.. 2001. The units of selection on mitochondrial DNA. En *Annual Reviews of Ecology and Systematics*. Vol. 32: pp 415-448.

85. Räsänen, M.E., J.S.Salo & R.J.Kalliola, 1987. Fluvial Perturbance in the Western Amazon Basin: regulation by long-term Sub-Andean tectonics. En *Science*. Vol. 238: pp. 1398-1401.
86. Räsänen, M., J. Salo, H. Jungnert & R.Pittman. 1990. Evolution of the Western Amazon lowland relief: impact of Andean foreland dynamics. En *Terra nova*. Vol 2: pp. 320-332.
87. Räsänen, M.E., R. Neller, J. Salo & H. Jungner, 1992. Recent and ancient fluvial deposition systems in the Amazonian foreland basin, Peru. En *Geol. Mag.* Vol. 129(3): pp 293-306.
88. Renno J-F, P.Berrebi, T.Boujard & R.Guyomard (1990) Intraspecific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (anostomidae, Pisces) in french Guiana and Brazil: a genetic approach to the refuge theory. En *J.Fish Biol.* Vol. 36: pp 85-95.
89. Richardson, J. E., R. T. Pennington, T. D. Pennington & P. M. Hollingsworth. 2001. Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees. En *Science*. Vol. 293: 2242 – 2245.
90. Rivera, R.. 2003. *Variabilidad genética de Pseudoplatystoma tigrinum y Pseudoplatystoma faciatum en la cuenca de la Amazonía Boliviana*. Tesis de Grado de Licenciatura. UMSA, FCFyB-FCPN, IBMB-IRD. 49pp.
91. Ron, S.R..2000. Biogeographic area relationships of lowland Neotropical rainforest based on raw distributions of vertebrate group. En *Biological Journal of the Linnean Society*. Vol.71 : pp 379-402.
92. Rozas J., J.C.Sánchez DelBarrio, X.Messenguier & R.Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. Bioinformatics (in press).
93. Schaal, B.A. & K.M.Olsen. 2000. Gene genealogies and population variation in plants. En *Procedures of the National Academy of Science*. Vol. 97 (13): pp 7024-7029.
94. Sides, J. & Lydeard. 2000. Phylogenetic utility of the tyrosine kinase gene X-src for assessing relationships among representative cichlid fishes. En *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 14: pp.51-74.
95. Simpson & Haffer.1978. Speciation patterns in the Amazonian forest biota. En *Annual Reviews in Ecology and Systematics*. Vol. 9: pp. 497-518.
96. Sivasundar, A., E.Birmingham & G.Ortí.. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American Rivers. En *Molecular Ecology*. Vol.10 : pp 407-417.
97. Somoza, R.. 1998. Updated Nazca (Farallon)-South America relative motions during the last 49My: implications for mountain building in the central Andean region. En *Journal of South American Earth Sciences*. Vol.11 (3): pp. 211-215.
98. Sunnucks, P.. 2000. Efficient genetic markers for population biology. En *Trends in Ecology and Evolution*. Vol. 15(5) : 199-203.
99. Swofford, D.L., G.J.Olsen, P. J.Waddell & D.M.Hillis.. 1996. Chapter 11: Phylogenetic inference. En Hillis, M., C.Moritz & B.K.Mable (eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc.Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA.
100. Vari, R.P. 1988. The Curimatidae: a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes): distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. pp 343-377. En Vanzolini, P.E. & Heyer (eds). *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution Patterns*. Academia Brasileira de Ciencias. Tio de Janeiro.
101. Vari R.P., & L.R.Malabarba..1998. Neotropical Ichthyology: An Overview. En Malabarba, L.R., R.E.Reis, R.P.Vari, Z.M.S.Lucena, C.A.S.Lucena (eds.),

Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes : pp1-11. Ediprucs. Porto Alegre.

102. Villacorta-Correa M.A. & U. Saint-Paul. 1999. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1918) Characiformes: Characidae) in central Amazon, Brazil. En *Rev. Brasil. Biol.* Vol. 59(4): pp. 637-652.
103. Volckaert, F.A.M., B.Hänfling, B.Hellemans & G.R.Carvalho. 2002. Timing of the population dynamics of bullhead *Cottus gobio* (teleostei: Cottidae) during the Pleistocene. En *J.Rvol.Biol.* Vol.15 : pp. 930-944.
104. Weitzman, S.H. & M.Weitzman. 1982. Biogeography and evolutionary diversification in neotropical freshwater fishes, with comments on the Refuge Theory. En Prance G.T.(ed.). *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press. New York.USA. pp. 403-422.
105. Wilson A.B., K.Noack-Kunmann & A.Meyer. 2000. Incipient speciation in sympatric nicaraguan crater lake cichlid fishes: sexual selection versus ecological diversification. En *Procedures of the Royal Society of London Bulletin* . Vol. 267: pp. 2133-2141.
106. Wu, J. & J.L.Vankat..1995. Island Biogeography: theory and applications. En: W.A.Nieremberg (ed), *Encyclopedia of Environmental Biology*. Vol.2 : pp.371-379. Academic Press, San Diego.
107. Zachos, J., M.Pagani, L.Sloan, E.Thomas & K.Billups. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65Ma to present. En *Science*. Vol. 292: pp. 686-693.