

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL, MOLECULAR E GENÉTICA

LUZ ELENA DE LA OSSA GUERRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Andinoacara latifrons* (Steindachner, 1878) COMO
ESTRATÉGIA DE CONSERVAÇÃO EM DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS
COLOMBIANAS**

PONTA GROSSA

2018

LUZ ELENA DE LA OSSA GUERRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Andinoacara latifrons* (Steindachner, 1878) COMO
ESTRATÉGIA DE CONSERVAÇÃO EM DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS
COLOMBIANAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Co-orientador: Prof. Dr. Mateus H. Santos

PONTA GROSSA

2018

D278 De la Ossa-Guerra, Luz Elena
Diversidade Genética de *Andinoacara latifrons* (Steindachner, 1878) como estratégia de conservação em diferentes bacias hidrográficas Colombianas / Luz Elena De la Ossa-Guerra. Ponta Grossa, 2018.
71 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Roberto F Artoni.
Coorientador: Prof. Dr. Mateus H Santos.

1. Endemismo. 2. Rotas de dispersão. 3. Neotropico. 4. Vicariância. I. Artoni, Roberto F. II. Santos, Mateus H. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 04/2018

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Luz Elena De la Ossa Guerra**.

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e dezoito, no auditório do Programa, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Roberto Ferreira Artoni em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Luz Elena De la Ossa Guerra**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Roberto Ferreira Artoni (Orientador UEPG), Dr. Vladimir Pavan Margarido (UNIOESTE) e Dr.^a Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Diversidade Genética de *Andinoacara latifrons* (Steindachner, 1878) como Estratégia de Conservação em Diferentes Bacias Hidrográficas Colombianas"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 90 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim não

Novo título: _____

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de dois mil e dezoito.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido (UNIOESTE)

Prof.^a Dr.^a Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG)

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente aos meus pais, minha mãe Luz Mercedes, que é minha própria luz e meu pai José, que simplesmente não deixa que ela se apague.

Aos meus irmãos Jose, Erika, Lia, Juan, por tantas alegrias, e pelo apoio imensurável. A viagem continua para todos!

Ao meu orientador professor Dr. Roberto Artoni! Por me receber de maneira cálida, por acreditar em mim, por ser o grande ser humano que continua sendo, é um exemplo. A caminhada científica continua, serão muitas publicações ainda! Obrigada!

Ao meu coorientador, Mateus Santos, por todas as contribuições, pela confiança e pelo apoio em todo momento. À professora Mara Almeida, quem me recebeu de forma especial e sempre deu seu apoio.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, por fazer me pertencer a este grupo de pesquisadores.

A Carlos Molano, não duvidou nunca no meu trabalho e nas minhas capacidades. O apoio necessário para continuar sempre esteve, as alegrias, as tristezas, os desafios, a vida nos reuniram para fazer grandes coisas. A biologia, a música, a literatura, os filmes, e que as infinitas conversas nunca acabem!

Agradeço a Cristian por seu apoio em coleta, identificação de exemplares, e pelo companheirismo. Espero que a parceria continue! Também agradeço a Edison pela ajuda nas coletas, foi uma alegria conhecer você.

Não pode faltar a família LabGEv! Todas as pessoas que estiveram neste processo, que sempre estiveram comigo nesta caminhada.

Angelita Barth, sempre receptiva, parceira e uma grande companhia do laboratório, tem sido um prazer compartilhar este tempo no lab. Já não será mais treva!

Jonathan, que fazia sem as piadas de você todos os dias! Realmente fez este processo mais agradável, agradeço a acolhida e a ajuda sempre que precisei.

Os colegas, Daiane, Mateus, Fernanda, Ana Paola, um prazer conhece los, será uma lembrança para sempre, e espero que continuem as parcerias. Ah, Brunito! Agradeço as boas vibrações!

Aos estudantes de Iniciação científica e TCC que sempre ajudaram no que eu precisei, e John, obrigada pelo café!

A Augusto Ferreira, foram muitas conversas construtivas, continue sendo a pessoa humilde, e alegre que é, a vida tem coisas especiais para você!

Ao técnico do LabGev, Miguel Airton, sempre alegrando as atividades e proporcionando todas as ferramentas que precisei.

A coleção da Universidade do Tolima, pela doação de tecidos e a seu curador, Francisco Villa por sua colaboração.

Também não podem faltar as pessoas que ajudaram neste processo fora da academia. A Gustavo, pela profunda colaboração, as conversas, os ensinamentos, os momentos compartilhados, muito obrigada! Às pessoas que contribuíram com momentos de alegrias, danças, e boas copas de vinho!

Todas as pessoas que estiveram colaborando, e brindando seu apoio, aqui em Ponta Grossa, e desde Colômbia, agradeço profundamente.

Agradeço de forma especial à Organização dos Estados Americanos (OEA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa.

São muitas pessoas envolvidas, agradeço a todos os que colaboraram direta e indiretamente, todos são importantes e sem dúvidas ajudaram neste processo.

Gracias a todos!

*“Nothing makes sense in biology
but it is in the light of cichlids evolution”*

RESUMO

Os cíclideos neotropicais representam um clado monofilético, que incluem espécies de América Central, Antilhas e América do Sul. *Andinoacara*, pertencente à tribo Cichlasomatini, se reconheceu recentemente como um novo gênero, ocorrendo na região andina do norte da América do Sul. A espécie endêmica, *A. latifrons*, representa uma espécie tipo que ocorre na Colômbia, devido à escassa informação em termos de genética e filogeografia, o objetivo deste estudo é investigar a diversidade genética de *A. latifrons* após eventos biogeográficos no Norte de Sul América. Os genes mitocondriais Citocromo oxidase 1 (COI) e Citocromo b (Cytb), e o gene nuclear rag1 foram sequenciados, e foram usadas sequencias das bases de dados BOLD e GenBank. O modelo GMYC, PTP e ABGD foram usados para delimitar OTUs dentro da tribo Cichlasomatini, e identificar os indivíduos da espécie *A. latifrons* das diferentes bacias como pertencentes a este clado. Uma rede haplotípica mediante o método TCS e uma árvore filogenética usando Mr. Bayes foi construída para estabelecer as relações dos indivíduos desde a perspectiva geográfica. Um possível novo OTU (Lomas Aisladas, Caribe) foi encontrado na análise de delimitação de espécie (GMYC, PTP, ABGD) e a árvore concatenada (COI+Cytb+rag1= 2778 pb) reforça esta ideia mostrando este grupo como um clado separado. A complexidade geográfica da Colômbia permitiu que existisse uma ampla diversidade genética, que segue uma linha histórica paralela ao levantamento dos Andes, confirmado também com a análise do modelo DEC. Estes resultados reforçam a estrutura biogeográfica da região andina, dilucidando eventos históricos de vicariância desta espécie. Conexões antigas entre a bacia de Magdalena e Maracaibo e possíveis eventos de dispersão de Maracaibo até os rios costeiros da Serra Nevada de Santa Marta podem ser considerados como possíveis explicações da distribuição *A. latifrons*. A possível explicação da relação entre a bacia do Caribe e do Cauca-Magdalena pode ser devida a uma zona de contato antiga ou a uma zona de hibridação anterior à elevação da Cordilheira dos Andes. Os dados apresentados neste estudo estão fortemente relacionados com áreas de grande importância que podem ser consistentemente tratadas como unidades de conservação.

Palavras-chave: Endemismo, rotas de dispersão, Neotropico, vicariância.

ABSTRACT

Neotropical cichlids represent a monophyletic clade, including species from Central America, the Antilles, and South America. *Andinoacara*, belonging to the Cichlasomatini tribe, was recently recognized as a new genus occurring in the Andean region of northern South America. The endemic species, *A. latifrons*, represents a type species that occurs in Colombia, due to the scarce information in terms of genetics and phylogeography, the objective of this study is to investigate the genetic diversity of *A. latifrons* after biogeographic events in North of South America. The mitochondrial genes Cytochrome oxidase 1 (COI) and Cytochrome b (Cytb), and the nuclear *rag1* gene were sequenced, and sequences from the BOLD and GenBank databases were used. The GMYC, PTP and ABGD model were used to delimit OTUs within the Cichlasomatini tribe, and to identify the individuals of *A. latifrons* species from the different basins as belonging to this clade. A haplotype network using the TCS method and a phylogenetic tree using Mr. Bayes was constructed to establish the individuals' relationships from the geographic perspective. A possible new OTU (Lomas Aisladas, Caribbean) was found in species delimitation analysis (GMYC, PTP, ABGD) and the concatenated tree (COI + Cytb + *rag1* = 2778 bp) reinforces this idea by showing this group as a separate clade. The geographical complexity of Colombia allowed for a wide genetic diversity, which follows a historical line parallel to the uplift of the Andes, also confirmed by the analysis of the DEC model. These results reinforce the biogeographic structure of the Andean region, elucidating historical vicariance events of this species. Ancient connections between the Magdalena and Maracaibo basin and possible dispersal events from Maracaibo to the coastal rivers of the Sierra Nevada de Santa Marta can be considered as possible explanations of the *A. latifrons* distribution. The possible explanation for the relationship between the Caribbean basin and the Cauca-Magdalena basin may be due to an old contact zone or a hybridization zone prior to the elevation of the Andes Mountains. The data presented in this study are strongly related to areas of great importance that can be consistently treated as conservation units.

Keywords: Endemism, dispersal routes, Neotropics, vicariance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos ciclídeos a nível mundial.....	12
Figura 2. Distribuição do gênero <i>Andinoacara</i>	14
Figura 3. Eco regiões de água doce na Colômbia.....	16
Figura 4. Resultados biogeográficos esperados de especiação.....	21
Figura 5. Exemplo de eventos de alcance-herança na cladogênese.....	22
Figura 6. Distribuição dos indivíduos processados neste trabalho	25
Figura 7. Sistema de rios de América do Sul.....	30
Figura 8. Distribuição dos indivíduos processados neste trabalho.....	31
Figura 9. Resultado dos modelos de delimitação de espécie.....	35
Figura 10. Representação dos haplótipos encontrados do gene Citocromo b.....	38
Figura 11. Árvore filogenética concatenada (<i>COI+Cytb+Rag1</i>) construída no software Mr. Bayes.....	39
Figura 12. <i>Modelo Dispersal-Extinction Cladogenesis</i> (DEC), implementado no software RASP v.4.0.....	40
Figura 13. Representação das Cordilheiras da Colômbia com as suas elevações.....	44
Figura 14. Departamento de Valle del Cauca, mostrando o ponto de coleta. Rio La Vieja, Piedra de Moler.....	48
Figura 15. Análise citogenética de <i>A. latifrons</i> numa população do Alto Cauca.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da análise Automatic Barcode Gap Discovery.....	34
Tabela 2. Informação dos genes usados na construção da árvore concatenada.....	36
Tabela 3. Lista do melhor modelo ajustado a cada partição.....	37

SUMÁRIO

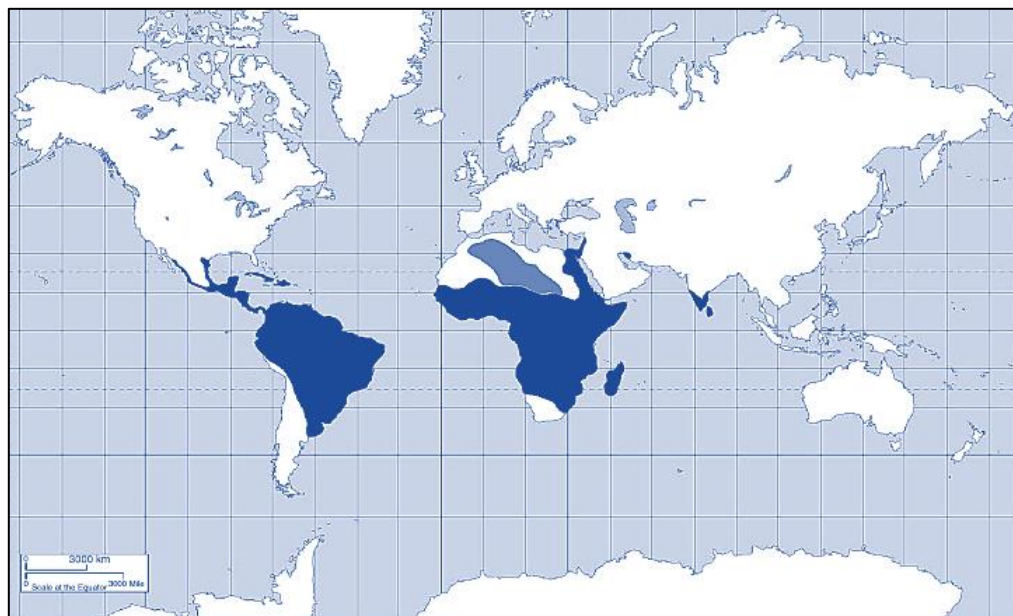
1. REVISAO BIBLIOGRAFICA.....	12
1.1 CICLIDEOS NEOTROPICAIS.....	13
1.2 TRIBO CICHASOMATINI.....	13
1.2.1 Gênero <i>Andinoacara</i>	13
1.2.1.1 <i>Andinoacara latifrons</i> (Steindachner, 1878)	14
1.3 ICTIOFAUNA E SISTEMAS DE DRENAGENS NA COLÔMBIA.....	15
1.4 A BIOLOGIA MOLECULAR COMO UMA FERRAMENTA DA SISTEMÁTICA.....	17
1.4.1 O Gene citocromo oxidase 1 (COX1) como código de barras.....	17
1.4.2 Gene ativador de recombinação (RAG1-recombination-activating gene)	18
1.4.3 Citocromo b (Cyt-b)	18
1.5 ANÁLISES FILOGENÉTICOS E MODELOS DE DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES.....	18
1.5.1 Modelo misto Yule-Coalescente (GMYC).....	19
1.5.2 Modelo de processos de árvores por Poisson (PTP).....	19
1.5.3 Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD).....	20
1.6 USO DE ANÁLISES DE DISPERSÃO-VICARIÂNCIA PARA INFERÊNCIAS BIOGEOGRÁFICAS.....	20
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 DISTRIBUIÇÃO DOS INDIVÍDUOS.....	25
3.2 ANÁLISES MOLECULARES.....	25
3.3 DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIE.....	26
3.4 REDE DE HAPLÓTIPOS.....	27
3.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>ANDINOACARA LATIFRONS</i> (STEINDACHNER, 1878) COMO ESTRATÉGIA DE CONSERVAÇÃO EM DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS COLOMBIANAS.....	28
4.2 PRIMEIRO REGISTRO E INTRIGANTE DESCOBERTA DE REGIÕES ITS NA ESPÉCIE TRANSANDINA <i>Andinoacara latifrons</i> (STEINDACHNER, 1878)	46

CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERENCIAS	55
ANEXO A - Protocolo de Extração de DNA.....	61
ANEXO B - Divergência evolutiva entre as sequencias. A análise foi realizada usando Tamura 3-parameter model.....	62
ANEXO C - Delimitação de espécies, Modelo ABGD.....	63
ANEXO D - Modelo PTP.....	65
ANEXO E - Sequencias do gene Citocromo b extraídas de GenBank utilizadas na rede de haplótipos	66
ANEXO F - Sequencias usadas na delimitação de espécie mediante o gene citocromo oxidase 1 (COI), <i>cytb</i> e <i>rag1</i>	68

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A família Cichlidae é um grupo monofilético (CHAKRABARTY, 2004; STAUFFER et al., 2006) pertencente à ordem Perciformes, que teve a sua origem no Paleoceno (FRIEDMAN et al., 2013). Constitui um dos grupos mais ricos a nível mundial, seu habitat se encontra em regiões de água doce e salobra (CHAKRABARTY, 2004). A distribuição geográfica desta família vai desde regiões de água doce em África, regiões de água salobra ao sul da Índia e Sri Lanka, Madagascar, Cuba e A Hispaniola, até regiões de água doce de América do Norte, América central e América do Sul (Fig. 1) (KULLANDER, 2003). A filogenia dos ciclídeos é suportada por eventos de vicariância, que são explicados por padrões de distribuição (CHAKRABARTY, 2004; FARIAS et al., 1999), e é assim como a heterogeneidade morfológica dos ciclídeos a nível mundial é notória, incluindo também padrões de reprodução e especiação. Principalmente, pela sua grande taxa de evolução, os Ciclídeos têm mostrado interesse pelos cientistas, assim, (KOCHER, 2004) reúne diferentes mecanismos que poderiam levar a processos de adaptação de Ciclídeos, destacando os eventos de especiação em peixes do leste da África; como principais eventos sobressaem a seleção ecológica na ecologia trófica e a seleção sexual por causa dos padrões da cor, como forças importantes que governaram os processos de especiação na Lagoa de Malawi.

Figura 1- Distribuição dos ciclídeos a nível mundial



Fonte: SPARKS. Phylogeny and Biogeography of the Malagasy and South Asian Cichlid Fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae), including a Survey of the Freshwater Fishes of Madagascar. Unpublished doctoral dissertation, University of Michigan, MI, 2001.

1.1. CICLÍDEOS NEOTROPICAIS

Os Ciclídeos neotropicais representam um clado monofilético que incluem espécies da América Central, as Antilhas e América do Sul (Smith et al, 2008). Kullander (2003) fez uma lista da diversidade de ciclídeos no neotropico, que incluíam 54 gêneros e mais de 407 espécies. A família Cichlidae, assim como outras famílias no neotropico principalmente, representam uma história de vida muito interessante, mas sua filogenia tem sido pouco entendida (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; WINEMILLER; HONEYCUTT, 2010), além disso, é pouco o que se conhece dos ciclídeos que habitam nos rios neotropicais em termos de riqueza, diversidade ecológica, morfológica e comportamental.

A maioria dos ciclídeos neotropicais estão distribuídos entre as subfamílias mais derivadas: Cichlasomatinae e Geophaginae (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; HONEYCUTT; WINEMILLER, 2005), sendo as tribos Geophagini, Heroini, e Cichlasomatini as principais representantes em todo o neotropico. As tribos Geophagini e Heroini (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; WINEMILLER; HONEYCUTT, 2010) mostram um típico padrão de radiação adaptativa, que pode ser denominada como uma “explosão inicial de divergência evolutiva”. Assim, a variação eco morfológica dos ciclídeos neotropicais tendem a ser maior entre gêneros com variações intra genéricas, sendo mais sutis ou limitada no caso de espécies sintopicas.

1.2. TRIBO CICHLASOMATINI

Pontualmente, Smith et al, 2008 separaram todos os Cichlasomatini dos outros Ciclídeos sul americanos por eventos de radiação. Os membros desta tribo são historicamente referidos como *Aequidens*, *Cichlasoma* e *Nannacara*. Atualmente, os ciclídeos da tribo Cichlasomatini compõem 69 espécies válidas distribuídas dentro de 10 gêneros (*Aequidens*, *Bujurquina*, *Cichlasoma*, *Cleithracara*, *Ivanacara*, *Krobia*, *Laetacara*, *Nannacara*, *Tahuantinsuyoa* e *Acaronia*) (KULLANDER, 1998). A distribuição cobre regiões que são cruciais biogeograficamente tais como a cordilheira dos Andes, as bacias amazônicas e formações geológicas antigas (Guyanas e o escudo brasileiro) (MUSILOVÁ et al, 2008).

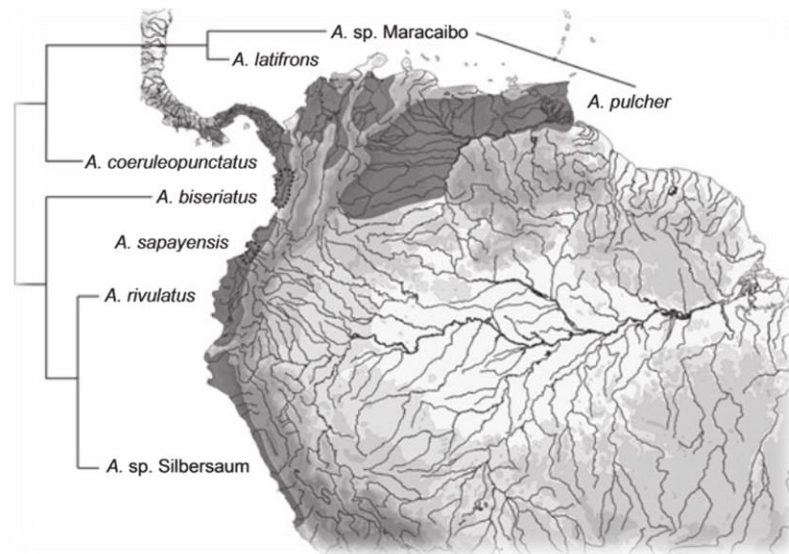
1.2.1. Gênero *Andinoacara*

Musilová et al, (2008) mediante estudos filogenéticos confirmaram que o grupo *Aequidens pulcher rivulatus* representa um gênero não nomeado com forte suporte. Logo, Musilová et al 2009

designou este grupo como um novo gênero que denominaria *Andinoacara* (MUSILOVÁ et al 2009).

Andinoacara pertence à tribo Cichlasomatini e atualmente inclui oito espécies válidas (Musilová et al.,2009). A distribuição de *Andinoacara* (Fig. 2) inclui a bacia do Magdalena e atinge a região transandina de América do Sul, também inclui a parte norte da região *cis-andina*, ao sul chega até Lima na região central do Perú (Musilová et al, 2015). Assim como outros ciclídeos, os processos de diversificação na região *trans* andina estão governados por eventos de vicariância (Musilová et al, 2015).

Figura 2 - Distribuição do gênero *Andinoacara*



Fonte: MUSILOVÁ; ŘÍČAN; NOVÁK. Phylogeny of the neotropical cichlid fish tribe cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae) based on morphological and molecular data, with the description of a new genus. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 47, n. 3, p. 234–247, 2009.

1.2.1.1. *Andinoacara latifrons*, (Steindachner, 1878)

Nomes comuns: Azulejo, Casasola, Mojarra azul

Andinoacara latifrons foi descrita dentro do gênero *Aequides*, este gênero era descrito como um grupo polifilético consistentemente resolvido (MUSILOVÁ et al, 2008; SMITH et al, 2008). As sinonímias de esta espécie são, *Aequidens latifrons* e *Acara latifrons*. A localidade tipo desta espécie é o Rio Magdalena, Colômbia. O comprimento máximo de *A. latifrons* é de 17 cm. A distribuição de esta espécie está reconhecida especificamente na Colômbia, no rio Magdalena, Atrato, Sinú, Cauca, e bacias de San Juan (KULLANDER, 1998).

Musilovà et al, 2015 reconstruíram a história de alguns ciclídeos transandinos mediante o gene mitocondrial Citocromo b (*Cyt b*), entre eles, espécies do gênero *Andinoacara*. Neste estudo, *A. latifrons* formou um clado separado do Magdalena, Sinú e Cauca, apoiando a alopatria mediante mtDNA. É importante conhecer as relações de *A. latifrons* em níveis mais estreitos e com mais dados, para analisar os padrões genéticos e a influência dos processos de diversificação por barreiras geográficas.

1.3. ICTIOFAUNA E SISTEMAS DE DRENAGENS NA COLÔMBIA

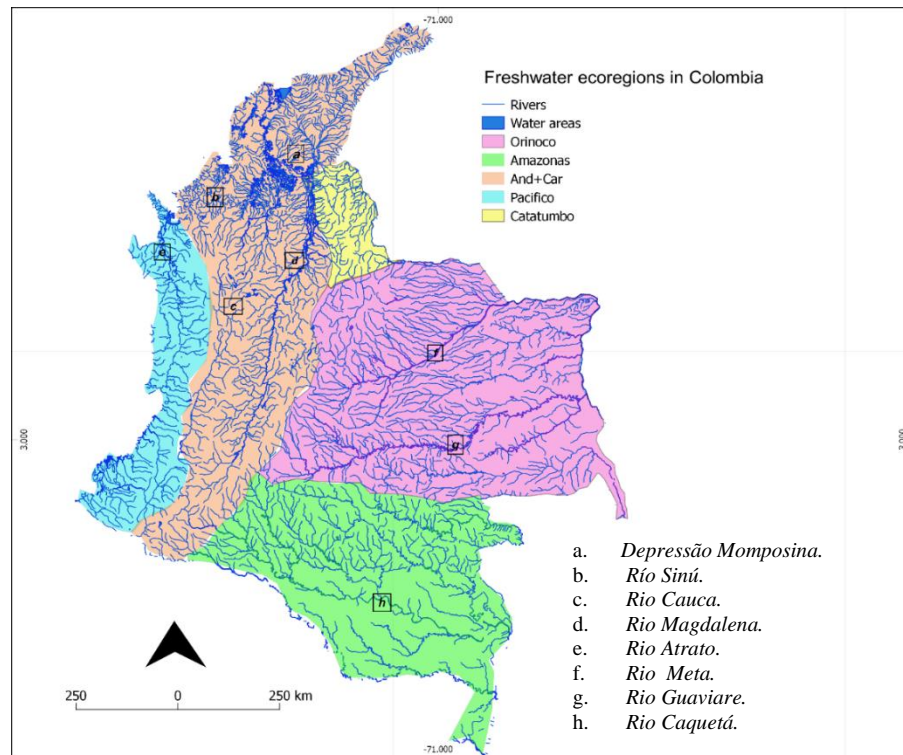
Os países mais altamente biodiversos na América do Sul são Brasil e Colômbia (sendo Brasil o primeiro) (MALDONADO OCAMPO RICHARD P.; SAULO USMA, JOSÉ, 2008). Entretanto, a Colômbia poderia ser o país mais diverso se fosse medida a quantidade de espécies por unidade de área (JIMÉNEZ-SEGURA et al., 2016). A Colômbia possui em seus sistemas de água doce aproximadamente 1435 espécies distribuídas em 14 ordens e 47 famílias. A superordem mais abundante é Ostariophysi que inclui as ordens com mais espécies: a ordem Characiformes com 637 espécies e a ordem Siluriformes com 524 espécies. As localidades dos 65% dos peixes colombianos estão distribuídas na região *transandina*, sendo a região da cordilheira dos Andes amplamente rica e diversa (MALDONADO-OCAMPO; VARI; USMA, 2008). Todas as espécies reportadas para Colômbia possuem uma história de vida interessante, especialmente pela presença desta cadeia montanhosa, levando a processos de diversificação por conta da migração e posterior isolamento geográfico (MALDONADO-OCAMPO; VARI ; USMA, 2008).

A diversidade de peixes nesta região norte de América do Sul está concentrada em drenagens de água doce distribuídas em todo o país, as quais tem uma história geológica muito complexa e atraente; estes processos geológicos foram presentes desde o início do Cretáceo, onde se deu um evento que levou a formação de um arco magmático, que seria depois a cordilheira central. Outros processos tectônicos levaram a formação dos lados orientais e ocidentais que hoje seriam conhecidos como cordilheira dos Andes, mas o evento mais concreto ocorreu a meados e final do Mioceno com a elevação dos Andes Orientais e a cordilheira costeira caribe. Este foi um evento biogeográfico muito importante pois, foram formadas novas drenagens que dividem e cortam as bacias do Magdalena e Maracaibo das bacias do Orinoco, estas novas drenagens conteriam espécies endêmicas que muito provavelmente se originaram pelos eventos de vicariância (LUNDBERG et al., 1998). Cala, (1987) definiu 9 regiões faunísticas onde há evidencia da

presença de peixes de água doce, sendo as seguintes: Altiplano andino, vertente do pacífico, sistema do rio Atrato, sistema do rio Sinú, bacia do rio Magdalena, vertente nordeste do Caribe, sistema de Catatumbo, Orinoquia e Amazônia Colombiana. Até 1987 os estudos nestas regiões eram muito escassos e algumas zonas precisavam mais atenção do que outras em relação à ictiofauna. Hoje, estas regiões têm sido mais estudadas e o conhecimento das comunidades ícticas é maior, porém, ainda não é muito completo. Por outra parte, Jiménez-Segura et al. (2016), em sua revisão indicaram que estas regiões tem sido mudadas ao longo do tempo. De acordo com Abell et al., (2008) algumas regiões chegaram a se fundirem: a região do rio Atrato, a qual foi juntada com a vertente Andina do pacífico, o rio Sinú foi anexado ao rio Magdalena e os sistemas do Caribe foram anexados à região Trinidad; este é o conhecimento atual das zonas de ocorrência da ictiofauna colombiana, com sítios de endemismo e de alta diversidade.

A região do rio Magdalena é a mais rica em espécies pois, está localizada justamente na zona das cordilheiras (Fig.3), sendo este rio um dos principais sistemas fluviais e um dos mais complexos na América do sul, representando 24% da área total da Colômbia (JIMÉNEZ-SEGURA; PALACIO; LEITE, 2010).

Figura 3 - Eco regiões de água doce na Colômbia.



Fonte: O autor.

1.4. A BIOLOGIA MOLECULAR COMO UMA FERRAMENTA DA SISTEMÁTICA

Desde há umas décadas a taxonomia tradicional tem tido que buscar ajuda em outras áreas pois, ela só não consegue classificar de forma correta algumas espécies, especialmente aquelas que são designadas como espécies crípticas. Para resolver este problema, a integração da biologia molecular tem sido muito útil, começando com a amplificação de DNA (KRESS; ERICKSON, 2012). O uso de genes nucleais, mitocondriais e ribossômicos são chaves para reconstruir histórias evolutivas e compreender de maneira precisa os eventos que levaram a processos de especiação. Alguns dos genes que possuem atributos que permitem inferir e esclarecer relações de parentesco são 1) ribossomais: ETS, SSU (pequena subunidade), ITS1, 5.8S, ITS2, LSU (subunidade maior) região D1-D2; 2) genes mitocondriais: COX-1, COX-2, COX-3, CytB, ND1, ND2 e 3) genes nucleares: FGB intron 7 DHX29 intron 20, intron 6 HDAC1, HDAC2 intron 4 DIS3 intron 19, R1OK3 intron 6 e TUFM intron 9 (SONNENBERG; NOLTE; TAUTZ, 2007).

1.4.1. O Gene citocromo oxidase 1 (COX1) como código de barras

As vantagens de trabalhar com o gene COX1 e sua relação com a análise filogenética é dado, em primeiro lugar, pelos iniciadores universais usados porque são muito robustos e permite a recuperação de uma sequência representada na maioria, se não todos, os filos animais (FOLMER et al., 1994). Adicionalmente, o COX1 parece ter a maior amplitude de sinal filogenética mitocondrial que qualquer outro gene. Em comum com outros genes codificadores de proteínas, a terceira posição do nucleotídeo apresenta uma incidência elevada de substituições de bases, guiando uma taxa de evolução molecular cerca de três vezes maior do que 12S ou ADNr, mas menor do que a taxa evolutiva em Cytb (KNOWLTON; WEIGT, 1998). Por estes motivos HEBERT et al., (2003), propuseram o gene COX1 como a região de código de barras para os grupos que pertencem ao filo animal, pois é capaz de discriminar entre grupos animais intimamente relacionados. Em peixes, o COX1 tem sido muito eficaz, já que tem permitido reconhecer, confirmar e identificar espécies de água doce (HUBERT et al., 2008); para peixes neotropicais também tem sido útil, permitindo identificar fauna que recentemente tem radiado e fauna megadiversa, PEREIRA et al.,(2013) discriminaram 99.2% de suas espécies analisadas, demonstrando o poder das sequencias de código de barras para identificar espécies, ainda com divergências interespecíficas baixas.

Neste sentido, o uso de genes mitocondriais e nucleais são de importância enorme para dilucidar os modelos evolutivos que fazem que as populações se isolem, além disso, que as populações tenham diferenças genéticas específicas, fazendo que essa dinâmica crie novos padrões em nível de reprodução, ecológico, etológico, etc. Os genes nucleais por sua parte algumas vezes mostram um nível de eficiência mais baixo do que os genes mitocondriais, muito provavelmente devido às regiões iniciadoras não conservadas e pelo risco de contaminação (THOMAZ et al., 2015), no entanto, deveriam ser sempre utilizados.

1.4.2. Gene ativador de recombinação (RAG1- Recombination-Activating Gene)

Os genes RAG tem sido excelentes marcadores para reconstruções filogenéticas, e as principais razões são: i) estão compostas por longas sequencias de DNA e proteínas (proporcionando mais sítios para análises estatísticas), ii) mostram altos níveis de conservação e iii) ausência de introns. Além disso, os genes nucleares não codificantes estão sob contextos evolutivos diferentes aos genes mitocondriais (DE CAMARGO, M. M.; NAHUM, L. 2005.), o que permite analisar a filogenia desde uma história diferente.

1.4.3. Citocromo b (Cyt-b)

O gene citocromo b tem sido muito utilizado para resolver questões a nível filogenético, que envolvem problemas de ancestralidade, além de ser utilizado como marcador populacional ou relações taxonômicas em níveis mais específicos (LOVEJOY, N; DE ARAUJO, 2000). O gene Cyt-b contém posições de códon que evoluem lenta e rapidamente, bem como regiões ou domínios mais conservadores e mais variáveis. Farias et al, (2001), analisaram o uso do marcador citocromo b na filogenia dos ciclídeos para dilucidar o comportamento de este gene frente às filogenias que já tem sido bem suportada com vários conjuntos de dados. Embora tenham se apresentado algumas limitações na congruência de alguns grupos neotropicais principalmente, o teste de partição de homogeneidade não mostrou níveis de heterogeneidade significativa na comparação entre os dados de Cyt-b e uma árvore com evidências totais, concluindo que para ciclídeos, este gene junto com outros marcadores pode gerar topologias confiáveis.

1.5. ANÁLISES FILOGENÉTICAS E MODELOS DE DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES

A diversidade de peixes na América do Sul e especialmente na Colômbia é muito grande, porém, ainda falta muita pesquisa para descobrir os padrões evolutivos, ecológicos e taxonômicos

que fazem parte desta ictiofauna nesta região. O descobrimento de novas espécies e corroboração delas era ainda muito fraca faz alguns anos, mas neste momento, para considerar espécies como unidade fundamental e verídica se estão fazendo uso de alguns modelos que incluem ferramentas bioestatísticas e algorítmicas que são capazes de delimitar uma espécie de outra, isto com ajuda inicial dos dados moleculares que brindam os genes mitocondriais e nucleais. Alguns dos modelos para delimitar espécies são apresentados a continuação:

1.5.1. Modelo misto Yule-coalescente (GMYC)

Por suas siglas em inglês, *Generalized Mixed Yule Coalescent approach (GMYC)* é um modelo de delimitação de espécie proposto por FUJISAWA; BARRACLOUGH, (2013), que assume a partir de um único locus se os clados tem diversificado dentro de grupos ou evoluíram independentemente, e se for assim, delimitar essas espécies. O modelo GMYC se baseia em que os padrões dos ramos dentro dos *clusters* genéticos refletem processos de coalescência neutral dentro de espécies e esses padrões entre *clusters* refletem eventos de especiação; de forma simples, o modelo GMYC estima os limites entre espécies a partir de sequências de ADN, identificando em uma árvore filogenética os padrões dos ramos como uma transição entre fenômenos de coalescência e de especiação de linhagens que tem evoluído independentemente, examinando os maiores valores de verossimilhança em cada transição. Os eventos de ramificação entre espécies são modelados com o modelo de Yule, o seja, supõe uma taxa de especiação constante e zero extinções, e os eventos de ramificação dentro das espécies são modelados mediante um processo coalescente neutral (TALAVERA; DINCĂ; VILA, 2013).

1.5.2. Modelo de processos de árvores por Poisson (PTP)

Poisson Tree Process (PTP) é um modelo descrito por ZHANG et al., (2013) que pode dar uma hipótese de delimitação de espécie baseada em árvores de genes que são inferidas de sequências moleculares, PTP usa diretamente o número de substituições, GMYC usa o tempo para identificar taxas de ramificação nos pontos de transição, é simples, rápido e robusto e só exige uma árvore filogenética de entrada. O modelo assume que cada substituição tem uma pequena probabilidade de gerar um evento de especiação; assim, o número de substituições entre as espécies se espera que seja significativamente maior que dentro das espécies, também implementa dois tipos de processos independentes de Poisson (um descreve a especiação e outro descreve os eventos dentro dos ramos) e procura pontos de transição entre padrões de ramos inter e intraespecíficos.

1.5.3. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)

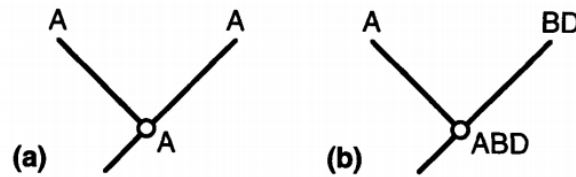
O uso de DNA barcode tem sido substancialmente usado nos últimos anos. Estratégias mais refinadas com o gene COI estão sendo construídas para validar e delimitar espécies, isto pois o DNA barcoding tem sido eficiente quando a diversidade intraespecífica para o gene COI é menor do que a diversidade interespecífica. Na distribuição de diferenças pareadas entre todas as sequencias de um típico conjunto de dados barcode, podemos observar um gap entre a diversidade intraespecífica e a diversidade interespecífica, este gap é nomeado como “*barcode gap*”. Apesar de muitos intentos por estabelecer um limite padrão entre a divergência intra e inter específica, por exemplo, a regra 10X proposta por (HEBERT et al., 2003), não tem conseguido ser generalizada a muitos grupos de organismos. Para resolver estes inconvenientes metodológicos, PULLANDRE et al., 2012 propõem um método para encontrar automaticamente a distância onde os *barcode gaps* estão localizados, este método é ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery), o qual propõe uma definição padrão de barcode gap e pode ser utilizada inclusive. Este método usa como entrada sequencias alinhadas.

1.6. USO DE ANÁLISES DE DISPERSÃO-VICARIÂNCIA PARA INFERÊNCIAS BIOGEOGRÁFICAS

Em 1997, Fredrick Ronquist, propôs um novo enfoque para quantificar a biogeografia histórica a partir de eventos de vicariância, aludindo à ideia de que barreiras geográficas aparecem e desaparecem ao longo da história evolutiva, causando efeitos diferentes nas espécies. Assim, como resultado, a biota de uma área poderia estar constituída de vários componentes com histórias separadas as quais podem ser reticuladas e não ramificadas, tais relações então, deveriam ser consideradas como possíveis explicações históricas de padrões biogeográficos observados.

No clássico cenário de vicariância, um ancestral comum sofre especiação, respondendo a subdivisões sucessivas de sua área de distribuição. O conceito de especiação está maiormente relacionado com condições de alopatria na grande parte dos organismos, assim, a especiação alopátrica junto com a vicariância geográfica poderia ser aceitado como a hipótese nula na biogeografia histórica. No entanto, a dispersão poderia ter um papel importante na especiação. Na figura 4 pode se observar dois resultados de especiação (a) quando a espécie ancestral ocorre numa área só, as espécies filhas, espera-se que ocorram na mesma área, (b) quando as espécies ancestrais ocorrem em diferentes áreas, as espécies irmãs, esperasse que ocorram em conjuntos de áreas mutuas exclusivas.

Figura 4 - Resultados biogeográficos esperados de especiação



Fonte: RONQUIST, F. Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Syst Biol*, v. 46, n. 1, p. 195–203, 1997.

Ronquist (1997) propõe a dispersão-vicariância como uma ferramenta poderosa para procurar relações de área em ao menos duas formas. Primeiro, hipóteses diferentes acerca relações de área poderiam ser comparadas por meio de cladogramas de área ajustado a eles, o custo da matriz em cada caso pode ser ajustado de acordo com a hipóteses de área a ser testada. Segundo, o uso de reconstruções de distribuições ancestrais obtido com uma simples análise de dispersão-vicariância como uma ferramenta heurística para explorar relações gerais de área, mais do que o uso de uma otimização de Fitch de mudança de caracteres para investigar transições/transversões na evolução de sequencias de DNA.

Algumas metodologias têm sido criadas objetivando entender a biogeografia histórica, fazendo esses problemas biogeográficos acessíveis a modelos de máxima verossimilhança e metodologias que usam a inferência bayesiana. O modelo de cladogenesis dispersão-extinção (DEC), está definido como uma de estas metodologias (MATZKE, 2014; REE; SANMARTÍN, 2009). A maioria dos pesquisadores que usam LAGRANGE DEC tem focado a inferência de intervalos nos nós ancestrais e na estimação dos parâmetros que regem as taxas de dispersão anagênica e extinção (MATZKE, 2014). Este modelo pode ser usado para definir eventos de especiação do evento fundador (*“founder-event speciation”*), onde um pequeno número de indivíduos, às vezes até mesmo um único indivíduo, participa de um evento de colonização raro e de longa distância que funda uma população, a qual é instantaneamente isolada geneticamente da população ancestral. Eventos de cladogenesis poderiam ser avaliados com o modelo DEC, e são apresentados na figura 5. O foco de divergência geográfica e biogeografia histórica é também usado na metodologia DEC, as inferências geográficas a partir de um modelo bayesiano, exemplo, árvores geradas no software BEAST permitem resolver conflitos, entre eles, 1) Inferências de eventos de vicariância e dispersão, 2) Inferências a nível de biogeografia, incluído eventos tectônicos, 3) Identificação de áreas de endemismo para estabelecer áreas protegidas.

Figura 5 - Exemplo de eventos de alcance-herança na cladogênese. Os eventos permitidos pelo modelo DEC de LAGRANGE são destacados em cinza. Cada evento permitido é fixado para ter a mesma probabilidade no modelo DEC. DEC exige que, na cladogênese, pelo menos uma espécie filha deve ter um tamanho de intervalo de 1, o que exclui alguns eventos.

Types of speciation, and example descendant ranges:

Ancestral ranges:	Sympatric (range copying)	Sympatric (subset)	Vicariance		Founder Event	
A		--	--			
AB						
ABC						
ABCD						

Fonte: MATZKE, N. J. Model selection in historical biogeography reveals that founder-event speciation is a crucial process in island clades. *Systematic Biology*, v. 63, n. 6, p. 951–970, 2014.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O conhecimento da ictiofauna neotropical deve ser uma prioridade em termos de conservação populacional de espécies e das bacias onde elas estão, principalmente aquelas que representam uma história de vida que permite reconstruir e analisar a biogeografia de América do sul. A Colômbia é um país que ocupa uma posição geográfica privilegiada no Noroeste do neotropico. O levantamento da cordilheira dos Andes gerou uma dinâmica biológica que permite explicar histórias de vida que podem ser elucidadas sob conceitos evolutivos de especiação, isolamento geográfico, eventos de vicariância, dinâmicas populacionais, entre outros. Todos estes eventos levaram a Colômbia a ter uma diversidade de peixes muito ampla, e padrões de distribuição de espécies particulares, sendo o segundo país mais diversos. Nos últimos anos, as ferramentas da biologia molecular têm sido muito eficazes para compreender os processos de diversificação, busca de espécies endêmicas e execução de programas de conservação.

Devido à escassez de informação dos grupos de peixes colombianos, especialmente daqueles que possuem um modelo de especiação crucial para entender as dinâmicas populacionais, decidi se estudar a nível genético a espécie *Andinoacara latifrons*. Assim, os padrões biogeográficos que poderia apresentar por meio do estudo de mais genes, podem ajudarmos a entender os processos evolutivos de muitas outras espécies endêmicas da Colômbia. Como uma espécie chave, poderíamos estabelecer unidades evolutivas significativas (ESUs) para a conservação, assim como elucidar processos evolutivos que reflitam a história da formação das bacias hidrográficas.

Os estudos com análises moleculares para comparar e delimitar espécies são os mais usados hoje em dia, o que faz que o nível de compreensão dos peixes a nível global seja mais completo, podendo interpretar as dinâmicas evolutivas de forma holística, não só de forma tradicional senão considerando a genética um apoio importante para entender a biologia das espécies, especialmente da ictiofauna no neotrópico.

Com base nestas lacunas de informação de *Andinoacara latifrons* se pretende atingir os seguintes objetivos:

Objetivo Geral

Analisar a diversidade genética e confirmar a filogenia e filogeografia da espécie *Andinoacara latifrons* para propor estratégias para sua conservação.

Objetivos específicos

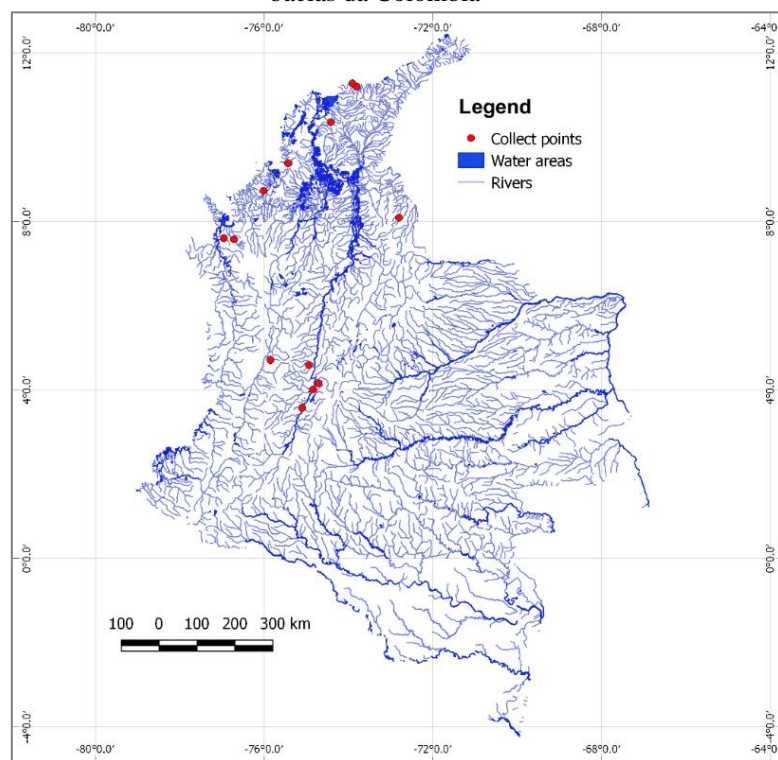
1. Estabelecer as relações filogenéticas e filo geográficas de *Andinoacara latifrons* dentro da biogeografia Colombiana.
2. Comparar a diversidade de *Andinoacara latifrons* por meio de redes de haplotipos.
3. Ratificar meio de modelos de delimitação de espécies (GMYC, PTP e ABGD) a veracidade da espécie *Andinoacara latifrons* nas diferentes bacias Colombianas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DISTRIBUIÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Os tecidos para análises moleculares foram adquiridos pela doação da coleção zoológica da Universidad del Tolima (CZUT-IC), os quais são apresentados na tabela 2 e sua distribuição é apresentada na Fig. 6. O tecido muscular foi extraído seguindo o protocolo de (WEIGT et al., 2012).

Figura 6 - Pontos vermelhos indicam os lugares pertencentes aos indivíduos processados nas diferentes bacias da Colômbia



Fonte: O autor.

3.2. ANALISES MOLECULARES

A extração de ADN foi realizada a partir de tecido muscular preservado em etanol 96%, mediante o método de fenol-clorofórmio e CTAB. Para fazer os análises de sistemática molecular estão sendo usados os genes mitocondriais: (Citocromo oxidase 1) COX1, Cyt b (Citocromo b) e o gene nuclear: Recombination activating gene (RAG1). Para a amplificação de um fragmento do gene citocromo oxidase 1 (COX1) foram usados os primers *forward* FishF1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e o *reverse* FishR1 5'-

TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (WARD et al., 2005). As condições de reação de PCR em 25 µL foram as seguintes: 2,5 µL de Buffer (10X), 1,25 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de mix dNTPs (10mM), 0,5 µL de cada primer (10mM), 0,2 µL de polimerase Taq (1U), 17,3 µL de água ultrapura e 2,5 de template DNA (50ng/ µL). O perfil térmico consistiu em um passo inicial de 2 minutos a 94 °C seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 52 °C e 1 minuto a 72 °C, com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C, sendo depois mantido a 4 °C. O fragmento de 940 pb do gene Cytb foi amplificado com os primers FishCytB-F 5'-ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC-3' e TrucCytB-R 5'-CCGACTTCCGGATTACAAGACCG-3'. As condições de reação de PCR em 25 µL foram as seguintes: 2,5 µL de Buffer (10X), 0,8 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de mix dNTPs (10mM), 0,5 µL de cada primer (10mM), 0,2 µL de polimerase Taq (1U), 18,1 µL de água ultrapura e 2,5 de template DNA (50ng/ µL). o perfil térmico consistiu numa desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido por 36 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, alinhamento de 1 minuto a 55 °C e extensão de 1 minuto a 72 °C, com uma extensão final de 8 minutos a 72 °C. O gene rag1 foi amplificado com os primers 5'-CTGAGCTGCAGTCAGTACCATAAGATGT-3' e reverse primer 5'-CTGAGTCCTTGTGAGCTTCCATRAAYTT-3' (GRANDE et al, 2004) as condições e perfil térmico para a amplificação de 1481 pb de produto de PCR foram as mesmas usadas para o gene Cytb. Os produtos foram purificados com o Kit de purificação da Illumina GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE HealthCare), seguindo as instruções do fabricante, os produtos foram sequenciados a través da empresa ACTGene Análises Moleculares e também da empresa Macrogen Inc. (Coréia).

3.3. DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES

As sequências obtidas do gene mitocondrial COI, foram alinhadas usando o software MUSCLE inserido no software MEGA v7.0.26; foi realizada uma seleção estatística do modelo de substituição que melhor se ajustasse aos dados com o software jModelTest seguindo o critério de informação de Akaike (POSADA, 2008) também inserido no software MEGA v7.0.26. Foi realizada uma árvore bayesiana, no software BEAST v1.8.0 (DRUMMOND et al., 2012) Os análises obtidos foram produto de duas corridas independentes seguindo MCMC de 50 milhões de gerações cada uma. As topologias foram analisadas a cada 100 gerações, e uma árvore consenso foi obtido usando logCombiner v1.8.0, com um burn-in de 10000 árvores, o resultado foi

inspecionado em Tracer v1.6.0 (RAMBAUT et al, 2014), finalmente a árvore foi obtida usando TreeAnnotator v. 1.8.0 (DRUMMOND et al., 2012).

A delimitação de espécie foi realizada mediante três modelos: GMYC, PTP e ABGD, considerando como marcador barcode o gene Citocromo C oxidase (COI). O modelo GMYC (Generalized Model Yule Coalescent) (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013) foi realizado a partir de uma árvore ultramétrica consenso construída no software BEAST v1.8 com 50 milhões de MCMC, a qual foi submetida no site <http://species.h-its.org/gmyc/> usando o método Single threshold. O modelo PTP (Poison Tree Process) (ZHANG et al., 2013) foi realizado a partir de uma árvore filogenética construída em PHYML (GUINDON; GASCUEL, 2003), integrado no software Geneious v.7.1.3, o site <http://species.h-its.org/ptp/> foi usado para gerar as análises, deixando os parâmetros por default. O modelo ABGD (PUILLANDRE et al., 2012) foi realizado no site <http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>, usando como entrada um arquivo .phylip, o modelo de distância Kimura (K80) e a distância simples foram analisadas no resultado final.

3.4. REDE DE HAPLÓTIPOS

O gene citocromo b foi selecionado para construir a rede de haplotipos, pois possuía a maior quantidade de indivíduos. Decidiu-se utilizar sequencias de (MUSILOVÁ et al., 2015) e este estudo (n=61) (Anexo X). A rede de haplotipos foi construída a partir do método TCS Network (CLEMENT et al., 2001) incorporado no software PopArt v.1.7.(LEIGH; BRYANT, 2015). Foram calculados também, o índice de diversidade nucleotídica, os sítios parcimoniosamente informativos e segregados.

3.5. ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Foi construída uma árvore bayesiana a partir de uma matriz concatenada com os genes COX1, Cytb e rag1. O modelo de evolução molecular foi selecionado a partir do *Akaike Information Criterion* (AIC), na web server de IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>) (TRIFINOPOULOS et al., 2016). Foi construída uma árvore filogenética no mesmo software e também no software Mr. Bayes v. com 200000 MCMC, com o objetivo de contrastar as topologias. O modelo DEC (*Dispersal-Extinction Cladogenesis*) foi realizado no software RASP v. 4.0 (YU et al., 2015), usando sequencias do gene Cytb.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão organizados em um capítulo que corresponde ao artigo científico

Diversidade genética de *Andinoacara latifrons* (Steindachner, 1878) como estratégia de conservação em diferentes bacias hidrográficas colombianas

Genetic diversity of *Andinoacara latifrons* (Steindachner, 1878) as a conservation strategy in different Colombian basins

De la Ossa-Guerra, Luz E¹; Santos, Mateus¹; Artoni, R¹

¹Universidade Estadual de Ponta Grossa, programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

4.1. DIVERSIDADE GENÉTICA DE *ANDINOACARA LATIFRONS* (STEINDACHNER, 1878) COMO ESTRATÉGIA DE CONSERVAÇÃO EM DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS COLOMBIANAS

RESUMO

Os cíclideos neotropicais representam um clado monofilético, que incluem espécies de América Central, Antilhas e América do Sul. *Andinoacara*, pertencente à tribo Cichlasomatini, se reconheceu recentemente como um novo gênero, ocorrendo na região andina do norte da América do Sul. A espécie endêmica, *A. latifrons*, representa uma espécie tipo que ocorre na Colômbia, devido à escassa informação em termos de genética e filogeografia, o objetivo deste estudo é investigar a diversidade genética de *A. latifrons* após eventos biogeográficos no Norte de Sul América. Os genes mitocondriais Citocromo oxidase 1 (COI) e Citocromo b (Cytb), e o gene nuclear rag1 foram sequenciados, e foram usadas sequências das bases de dados BOLD e GenBank. O modelo GMYC, PTP e ABGD foram usados para delimitar OTUs dentro da tribo Cichasomatini, e identificar os indivíduos da espécie *A. latifrons* das diferentes bacias como pertencentes a este clado. Uma rede haplotípica mediante o método TCS e uma árvore filogenética usando Mr. Bayes foi construída para estabelecer as relações dos indivíduos desde a perspectiva geográfica. Um possível novo OTU (Lomas Aisladas, Caribe) foi encontrado na análise de delimitação de espécie (GMYC, PTP, ABGD) e a árvore concatenada (COI+Cytb+rag1= 2778 pb) reforça esta ideia mostrando este grupo como um clado separado. A complexidade geográfica da Colômbia permitiu que existisse uma ampla diversidade genética, que segue uma linha histórica paralela ao levantamento dos Andes, confirmado também com a análise do modelo DEC. Estes resultados reforçam a estrutura biogeográfica da região andina, dilucidando eventos históricos de vicariância desta espécie. Conexões antigas entre a bacia de Magdalena e Maracaibo e possíveis eventos de dispersão de Maracaibo até os rios costeiros da Serra Nevada de Santa Marta podem ser considerados como possíveis explicações da distribuição *A. latifrons*. A possível explicação da relação entre a bacia do Caribe e do Cauca-Magdalena pode ser devida a uma zona de contato antiga ou a uma zona de hibridação anterior à elevação da Cordilheira dos Andes. Os dados apresentados neste estudo estão fortemente relacionados com áreas de grande importância que podem ser consistentemente tratadas como unidades de conservação.

Palavras-chave: Endemismo, rotas de dispersão, Neotropico, vicariância.

ABSTRACT

Neotropical cichlids represent a monophyletic clade, including species from Central America, the Antilles, and South America. *Andinoacara*, belonging to the Cichlasomatini tribe, was recently recognized as a new genus occurring in the Andean region of northern South America. The endemic species, *A. latifrons*, represents a type species that occurs in Colombia, due to the scarce information in terms of genetics and phylogeography, the objective of this study is to investigate the genetic diversity of *A. latifrons* after biogeographic events in North of South America. The mitochondrial genes Cytochrome oxidase 1 (COI) and Cytochrome b (Cytb), and the nuclear *rag1* gene were sequenced, and sequences from the BOLD and GenBank databases were used. The GMYC, PTP and ABGD model were used to delimit OTUs within the Cichlasomatini tribe, and to identify the individuals of *A. latifrons* species from the different basins as belonging to this clade. A haplotype network using the TCS method and a phylogenetic tree using Mr. Bayes was constructed to establish the individuals' relationships from the geographic perspective. A possible new OTU (Lomas Aisladas, Caribbean) was found in species delimitation analysis (GMYC, PTP, ABGD) and the concatenated tree (COI + Cytb + *rag1* = 2778 bp) reinforces this idea by showing this group as a separate clade. The geographical complexity of Colombia allowed for a wide genetic diversity, which follows a historical line parallel to the uplift of the Andes, also confirmed by the analysis of the DEC model. These results reinforce the biogeographic structure of the Andean region, elucidating historical vicariance events of this species. Ancient connections between the Magdalena and Maracaibo basin and possible dispersal events from Maracaibo to the coastal rivers of the Sierra Nevada de Santa Marta can be considered as possible explanations of the *A. latifrons* distribution. The possible explanation for the relationship between the Caribbean basin and the Cauca-Magdalena basin may be due to an old contact zone or a hybridization zone prior to the elevation of the Andes Mountains. The data presented in this study are strongly related to areas of great importance that can be consistently treated as conservation units.

Keywords: Endemism, dispersal routes, Neotropics, vicariance.

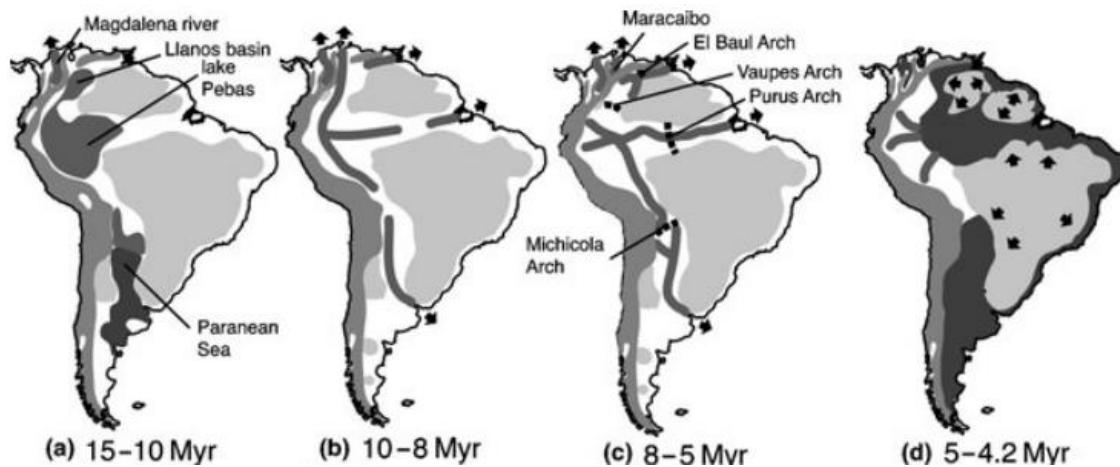
Introdução

O Neotrópico é considerado uma área de alto endemismo e uma alta riqueza de espécies, isto é visto por sua biogeografia e excepcional diversificação, embora exista essa alta diversidade genética, os estudos ainda continuam sendo escassos (BAGLEY et al., 2016), principalmente no grupo dos ciclídeos. O norte de América do Sul representa uma das áreas com maior riqueza depois do Brasil, a ictiofauna do rio Magdalena, tem sido a mais conhecida desde há muito anos, e ainda a situação não é diferente (CALA, 1987). Os ciclídeos são a família mais diversa dentro da ordem perciformes. Evidencia paleontológica sugere que este grupo teleósteo não se diversificou dentro de formas reconhecidas como famílias modernas e gêneros até o cretáceo tardio ou Paleogeno inferior (REIS et al., 2016). Assim, a evolução dos ciclídeos é vista desde a fauna ribeirinha, pois é a mais diversa e generalizada geograficamente, conservando padrões ancestrais e distribuições

geográficas (KULLANDER, S. 1998). Na região de América do Sul estima-se que existam ao redor de 450 espécies e 50 gêneros.

Há cerca de 11 milhões de anos, a direção das correntes do vale do Magdalena mudou na direção oeste em relação à etapa de levantamento do noroeste dos Andes e esta nova extensão foi suficientemente alta para isolar a bacia do Magdalena (HOORN et al, 1995). Estes eventos, propiciaram altas taxas de endemismo na Colômbia, e uma situação biogeográfica que chama a atenção desde o ponto de vista geológico e biológico.

Figura 7- Evolução dos sistemas de rios de América do Sul, durante os últimos 15 milhões de anos. a) incursões marinhas e lagoas continentais desde 15-10 Myr. b) regressões marinhas e rios continentais desde 10-8 Myr. c) estabelecimento final dos rios Amazonas, Paraguai, e Orinoco, desde 8-5 Myr. d) incursões marinhas desde 5- 4.2 Myr.



Fonte: LUNDBERG, J.G. The temporal context of the diversification of Neotropical fishes. Em: Malabarba, L.R., Vari, R.E., Lucena, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 49-68, 1998.

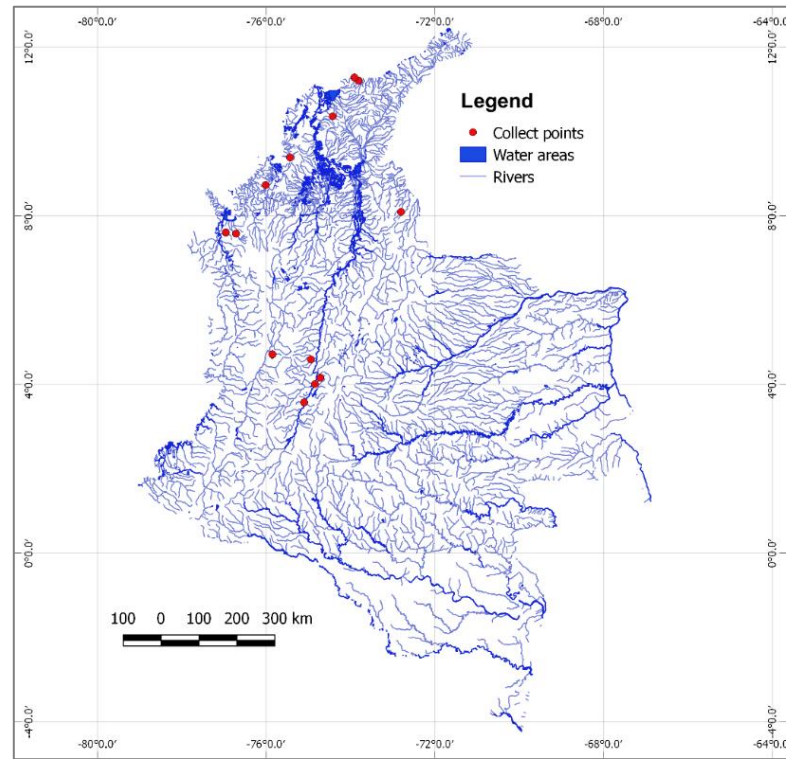
A figura 7 resume os principais acontecimentos que levaram a diversificação da fauna neotropical. Os aspectos filo geográficos e biogeográficos dos ciclídeos colombianos não tem tido muita atenção pelos ictiólogos, listas de ocorrência, alguns aspectos ecológicos e taxonômicos são as informações que atualmente se conhecem. Neste contexto filogeográfico, o gênero *Andinoacara* segue muito bem o processo de diversificação mediante o fenômeno de vicariância, pois, anterior aos eventos dos Andes, já este gênero existia nas bacias do Magdalena, Maracaibo e bacias do Equador. Embora a história já começou a se contar por (MUSILOVÁ et al, 2009; MUSILOVÁ et al, 2015), a espécie *Andinoacara latifrons* não tem sido estudada desde o ponto de vista genético, e por isto que o principal objetivo deste trabalho é dilucidar e compreender a diversidade genética de *A. latifrons* no contexto biogeográfico da Colômbia.

Material e Métodos

Área

Os tecidos para análises moleculares foram adquiridos pela doação da coleção zoológica da Universidad del Tolima (CZUT-IC), os quais são apresentados no Anexo 7 e sua distribuição é apresentada na Fig. 8. O tecido muscular foi extraído seguindo o protocolo de (LEE *et al.*, (2012).

Figura 8 - Pontos vermelhos indicam os lugares pertencentes aos indivíduos processados nas diferentes bacias da Colômbia.



Fonte: O autor.

Análises moleculares

A extração de ADN foi realizada a partir de tecido muscular preservado em etanol 96%, mediante o método de fenol-clorofórmio e CTAB (Anexo 1). Para fazer os análises de sistemática molecular estão sendo usados os genes mitocondriais: (Citocromo oxidase 1) *COX1*, *Cyt b* (Citocromo b) e o gene nuclear: *Recombination activating gene (RAG1)*. Para a amplificação de um fragmento do gene citocromo oxidase 1 (*COX1*) foram usados os primers *forward* FishF1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e o *reverse* FishR1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (WARD *et al.*, 2005). As condições de reação de PCR em 25 µL foram as seguintes: 2,5 µL de Buffer (10X), 1,25 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de mix dNTPs (10mM), 0,5 µL de cada primer (10mM), 0,2 µL de polimerase Taq (1U), 17,3 µL de

água ultrapura e 2,5 de template DNA (50ng/ μL). O perfil térmico consistiu em um passo inicial de 2 minutos a 94 °C seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 52 °C e 1 minuto a 72 °C, com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C, sendo depois mantido a 4 °C. O fragmento de 940 pb do gene *Cytb* foi amplificado com os primers FishCytB-F 5'-ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC-3' e TrucCytB-R 5'-CCGACTTCCGGATTACAAGACCG-3'. As condições de reação de PCR em 25 μL foram as seguintes: 2,5 μL de Buffer (10X), 0,8 μL de MgCl_2 (50mM), 0,5 μL de mix dNTPs (10mM), 0,5 μL de cada primer (10mM), 0,2 μL de polimerase Taq (1U), 18,1 μL de água ultrapura e 2,5 de template DNA (50ng/ μL). o perfil térmico consistiu numa desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido por 36 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, alinhamento de 1 minuto a 55 °C e extensão de 1 minuto a 72 °C, com uma extensão final de 8 minutos a 72 °C. O gene *rag1* foi amplificado com os primers 5'-CTGAGCTGCAGTCAGTACCATAAGATGT-3' e reverse primer 5'-CTGAGTCCTTGTGAGCTTCCATRAAYTT-3' (GRANDE et al, 2004) as condições e perfil térmico para a amplificação de 1481 pb de produto de PCR foram as mesmas usadas para o gene *Cytb*. Os produtos foram purificados com o Kit de purificação da Illumina GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (GE HealthCare), seguindo as instruções do fabricante, os produtos foram sequenciados a través da empresa ACTGene Análises Moleculares e também da empresa Macrogen Inc. (Coreia).

Delimitação de espécies

As sequências obtidas do gene mitocondrial COI neste trabalho e as sequências extraídas da base de dados BOLD (Anexo 6), foram alinhadas usando o software MUSCLE inserido no software MEGA v7.0.26; foi realizada uma seleção estatística do modelo de substituição que melhor se ajustasse aos dados com o software jModelTest seguindo o critério de informação de Akaike (POSADA, 2008) também inserido no software MEGA v7.0.26. Foi realizada uma árvore bayesiana, no software BEAST v1.8.0 (DRUMMOND et al., 2012) Os análises obtidos foram produto de duas corridas independentes seguindo MCMC de 50 milhões de gerações cada uma. As topologias foram analisadas a cada 1000 gerações, e uma árvore consenso foi obtido usando logCombiner v1.8.0, com um burn-in de 10%, o resultado foi inspecionado em Tracer v1.6.0 (RAMBAUT et al, 2014), finalmente a árvore foi obtida usando TreeAnnotator v. 1.8.0 (DRUMMOND et al., 2012).

A delimitação de espécie foi realizada mediante três modelos: GMYC, PTP e ABGD, considerando como marcador *barcode* o gene Citocromo C oxidase (COI). O modelo GMYC (*Generalized Model Yule Coalescent*) (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013) foi realizado a partir de uma árvore ultramétrica consenso construída no software BEAST v1.8 com 50 milhões de MCMC, a qual foi submetida no site <http://species.h-its.org/gmyc/> usando o método Single threshold. O modelo PTP (Poison Tree Process) (ZHANG et al., 2013) foi realizado a partir de uma árvore filogenética construída em PHYML, integrado no software Geneious v.7.1.3, o site <http://species.h-its.org/ptp/> foi usado para gerar as análises, deixando os parâmetros por default. O modelo ABGD (PULLANDRE et al., 2012) foi realizado no site <http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>, usando como entrada um arquivo .phylip, o modelo de distância Kimura (K80) e a distância simples foram analisadas no resultado final.

Rede de haplótipos

O gene citocromo b foi selecionado para construir a rede de haplótipos, pois possuía a maior quantidade de indivíduos. Decidiu-se utilizar sequências de (MUSILOVÁ et al., 2015) e este estudo (n=61) (Anexo 5). A rede de haplótipos foi construída a partir do método TCS Network (CLEMENT et al., 2001) incorporado no software PopArt v.1.7 (LEIGH; BRYANT, 2015). Foram calculados também, o índice de diversidade nucleotídica, os sítios parcimoniosamente informativos e segregados.

Análises filogenéticas

Foi construída uma árvore bayesiana a partir de uma matriz concatenada com os genes COX1, Cytb e rag1. O modelo de evolução molecular foi selecionado a partir do *Akaike Information Criterion* (AIC), na *web server* de IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>) (TRIFINOPOULOS et al., 2016). Foi construída uma árvore filogenética no mesmo software e também no software Mr. Bayes com 200000 MCMC, com o objetivo de contrastar as topologias. O modelo DEC (*Dispersal-Extinction Cladogenesis*) foi realizado no software RASP v. 4.0 (YU et al., 2015), usando sequências do gene Cytb.

Resultados

Delimitação de espécies

Foram analisados três modelos de delimitação de espécie para confirmar a validade das sequências de *Andinoacara latifrons*, a través do gene Citocromo C oxidase (COI). Os modelos GMYC (*Generalized Model Yule Coalescent*), PTP (*Poisson Tree Processes model*) e ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) foram selecionados como potenciais modelos estatísticos que permitem dilucidar mediante árvores ultramétricas e filogenéticas cluster consistentemente definidos que são atribuídos como OTUs. O resultado pode ser visualizado na figura 9. O modelo GMYC (Single method) delimitou 11 clusters, dos quais três deles são delimitados como possíveis espécies putativas que pertencem à linhagem *A. latifrons*, em contraste, o modelo PTP e ABGD delimitaram os mesmos cluster, com poucas variações.

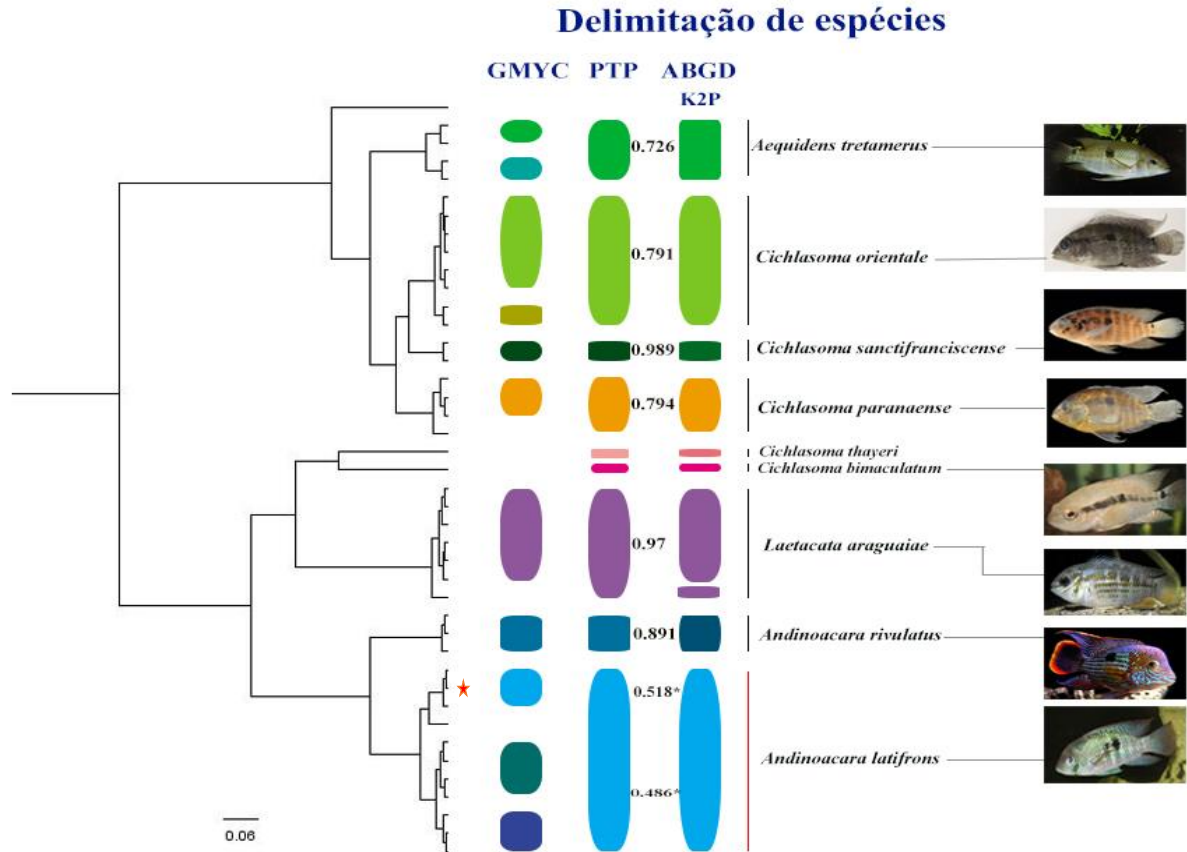
O modelo PTP definiu 12 espécies, os suportes de ramos podem ser visualizados no Anexo 4. pode ser observar também que o grupo identificado como *Andinoacara latifrons*, está como dois grupos com suporte de ramos 0.518*(167_CA,181_CA,272_CA) e 0.486* (203_CA_205, 545_SNSM, 606_SNSM, GBGCA11599, 70_CAT, 508_MA_662, LGT23_CAT), sugerindo uma revisão no primer cluster. Dados complementários da análise são considerados no anexo 4. A tabela 1 apresenta os resultados obtidos pelo modelo de substituição K2P e o modelo simples de substituição na análise ABGD, onde são analisadas as divergências intraespecíficas entre as sequências analisadas, considerando na sua maioria um total de 10 até 12 OTUs, divididos em agrupamentos dentro de uma árvore de máxima verossimilhança (Anexo 3).

Tabela 1 - Resultados da análise Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD).

Sub. model	X	Partition	Prior intraespecific divergence (P)						
			0.001	0.00167	0.00278	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215
K2P	1.5	Inicial	10	10	10	10	10	10	
	1.5	Recursiva	12	12	12	12	12		
Simple	1.5	Inicial	10	10	10	10	10	10	10
	1.5	Recursiva	12	12	12	12			

Fonte: O autor. X, relative gap width; Simple, p-distance; K2P, Kimura 2-parameter substitution model.

Figura 9 - Resultado dos modelos de delimitação de espécie. O modelo GMYC (*Generalized Model Yule Coalescence*) delimitou 11 espécies, o modelo PTP (*Poisson Tree Processes*) =9 espécies, indicando também uma possível separação no clado de *Andinoacara latifrons*, o que indicaria uma décima espécie putativa. Os valores indicam a nível de confiança dos ramos. O modelo ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) está representado por 10 OTUs=partição inicial e 12 OTUs=partição recursiva. A estrela em laranja indica a possível espécie nova. A árvore mostra os resultados da partição inicial (0.00167).



Rede de haplótipos

A rede de haplótipos construída a partir do gene citocromo b (Fig. 10), está formado por 28 haplótipos que constituem uma diversidade nucleotídica $pi= 0.0139306$, com um número de sítios segregados=84 e um número de sítios parcimoniosamente informativos=66. As populações dos tributários do Cauca (San Jorge, Nechí), estão relacionados diretamente com o rio Cauca com variações mutacionais próprias de cada localidade. As populações do baixo e alto Magdalena parecem estar bem diferenciadas. O baixo Magdalena (loMg) aparece como uma população separada com associações mais compreensíveis do baixo Cauca (Nechí) e a mesma bacia Cauca. Estas associações estão relacionadas diametralmente com a depressão Momposina e a mistura das bacias Cauca-Magdalena na região do baixo Cauca-Magdalena, aonde estão

localizadas as populações de Nechí. Embora, as populações do baixo Magdalena não apresentam relação com as populações dos afluentes San Jorge e Nechí. O alto Magdalena (20_Mg) aparece como um grupo com Catatumbo, relacionado com a história das duas bacias por conta do levantamento das cordilheiras, e também, indivíduos do alto Magdalena (18_UpMg), mostrando associação o rio Cauca.

As populações da bacia do Caribe estão amplamente relacionadas com as populações da bacia do Magdalena-Cauca. A população da região Quebrada Lomas Aisladas (25_Car, 26_Car, 27_Car, 28_Car), gera indícios de isolamento e fluxo genético baixo, o que pode ser uma evidencia de uma provável diferenciação, levando a uma incipiente especiação, embora o resultado de delimitação de espécie de GMYC e o modelo PTP separe esse grupo como uma espécie putativa, ainda os resultados precisam ser revisados e novos estudos nessa área geográfica precisam ser levantados.

Os grupos Cesar (Ces), Sinu (Sinu), estão associados entre si com os haplótipos próprios do Caribe. O haplótipo 10_Sinu está mais vinculado ao haplótipo do Cauca, enquanto os haplótipos 09_Sinu, 11_Sinu, 16_Sinu, estão diferenciados com as populações 22_Car e 23_Car. Os indivíduos pertencentes à Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM) como 24_SNSM, apresentam relação direta com haplótipos do Cesar.

Análises filogenéticas

A construção de uma árvore filogenética foi realizada com um total de 2778 pb (Tabela 2).

Tabela 2- Informação dos diferentes genes usados na construção de árvore concatenada.

ID	Seq	Sites	Unique	Infor	Invar	Const
COI	19	435	39	22	333	333
Cytb	19	908	47	58	720	720
Rag1	19	1435	27	6	1369	1369

Unique: Unique sites; Infor: Number of parsimony-informative sites; Invar: Number of invariant sites; Const: Number of constant sites (can be subset of invariant sites). Fonte: O autor.

A árvore concatenada foi construída com o modelo de substituição nucleotídica baixo o critério de informação de Akaike (AIC) escolhido para cada uma das partições (Tabela 3). O resultado visualizado na figura 11 supõe as mesmas relações geográficas apresentadas da rede haplotípica.

A nova espécie *Andinoacara* n.sp (167,180,181) aparece como um clado mais antigo, completamente isolado do clado reconhecido como *A. latifrons*.

Tabela 3 - Lista do melhor modelo ajustada a cada partição:

ID	Model	LogL	AIC	w-AIC	AICc	w-AICc	BIC	w-BIC
COI	TPM2u+F+G4	-1042.0819	2166.1637	- 0.0000	2174.9271	- 0.0000	2333.2529	- 0.0000
Cytb	HKY+F+G4	-2115.0447	4310.0895	- 0.0000	4313.8726	- 0.0000	4502.5392	- 0.0000
Rag1	K2P+I	-2444.5080	4963.0161	- 0.0000	4965.0289	- 0.0000	5157.9661	- 0.0000

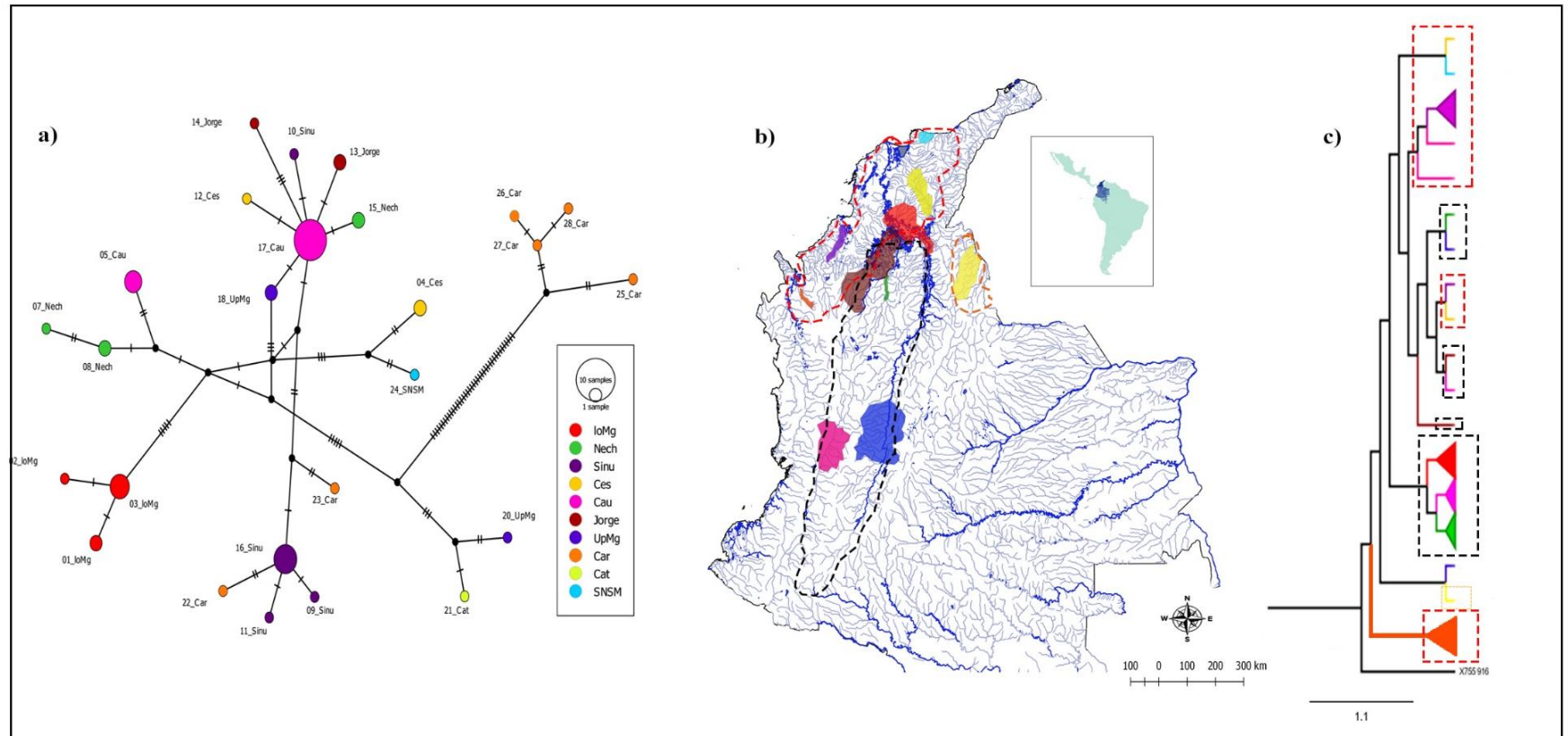
AIC, w-AIC : Akaike information criterion scores and weights.

*Plus signs denote the 95% confidence sets.

AICc, w-AICc: Corrected AIC scores and weights.

BIC, w-BIC : Bayesian information criterion scores and weights.

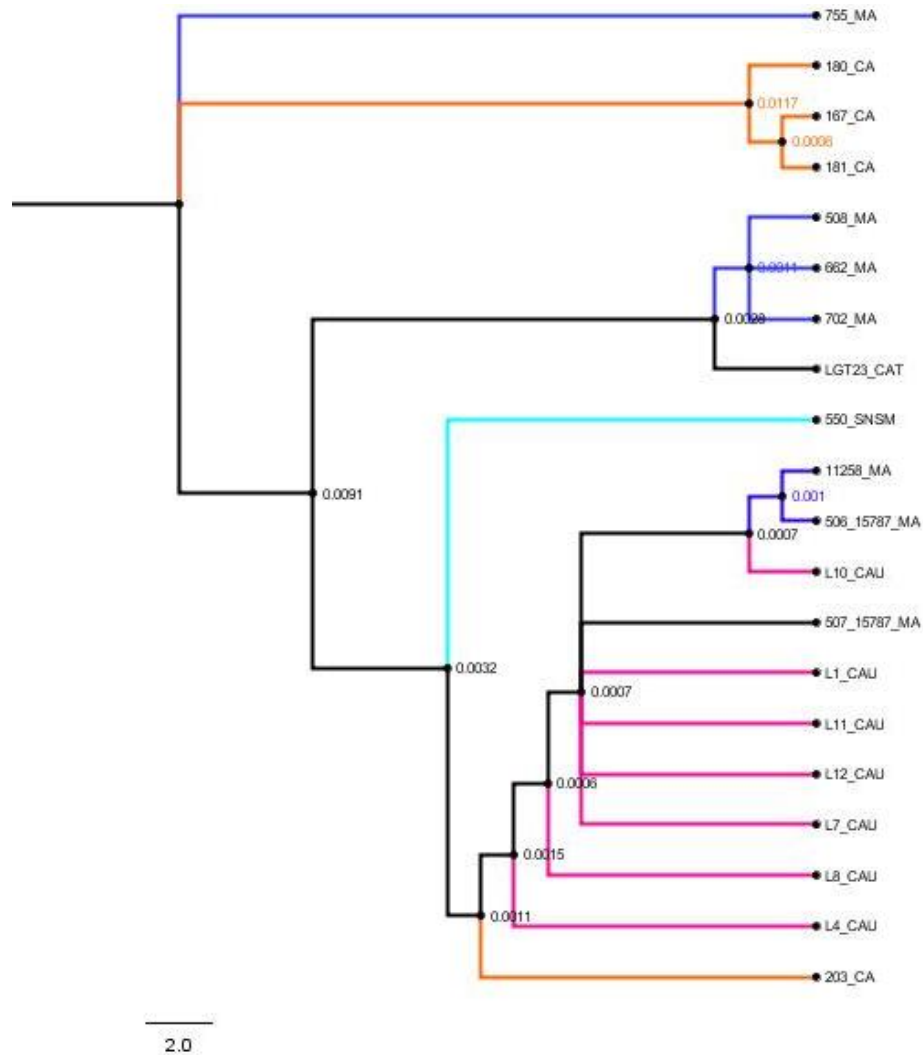
Figura 10 - Representação dos haplótipos encontrados com o gene Citocromo b. a) Rede de haplótipos construída mediante TCS Network, cores representam diferentes tributários das bacias hidrográficas do Caribe, Cauca, Magdalena e Catatumbo. loMg=Baixo Magdalena; Nech=rio Nechí; Sinu=rio Sinu; Ces=Cesar; Cau=rio Cauca; Jorge=rio San Jorge; UpMg=Alto Magdalena; Car=rios pertencentes à bacia do Caribe; Cat=rio Catatumbo; SNSM=rios costeiros da Sierra Nevada de Santa Marta. b) Mapa de Colômbia apresentando os rios pertencentes à bacia do Caribe, Cauca-Magdalena e Catatumbo. c) Árvore filogenética reforçando as relações dos indivíduos das diferentes bacias da Colômbia.



- Bacia hidrográfica do Caribe
- Bacia hidrográfica Cauca-Magdalena
- Bacia hidrográfica do Maracaibo (Rio Catatumbo)

Fonte: o autor

Figura 11 - Árvore filogenética concatenada (COI+Cytb+rag1= 2778 pb) gerada no software Mr. Bayes (200000 MCMC), mostra a mesma topologia que a árvore gerada em IQ-TREE. As cores correspondem às distribuições dos indivíduos. Azul= rio Magdalena, laranja=Caribe, Azul marinho=rios costeiros da SNSM, bacia Caribe, roxo=rio Cauca, preto=rio Catatumbo.



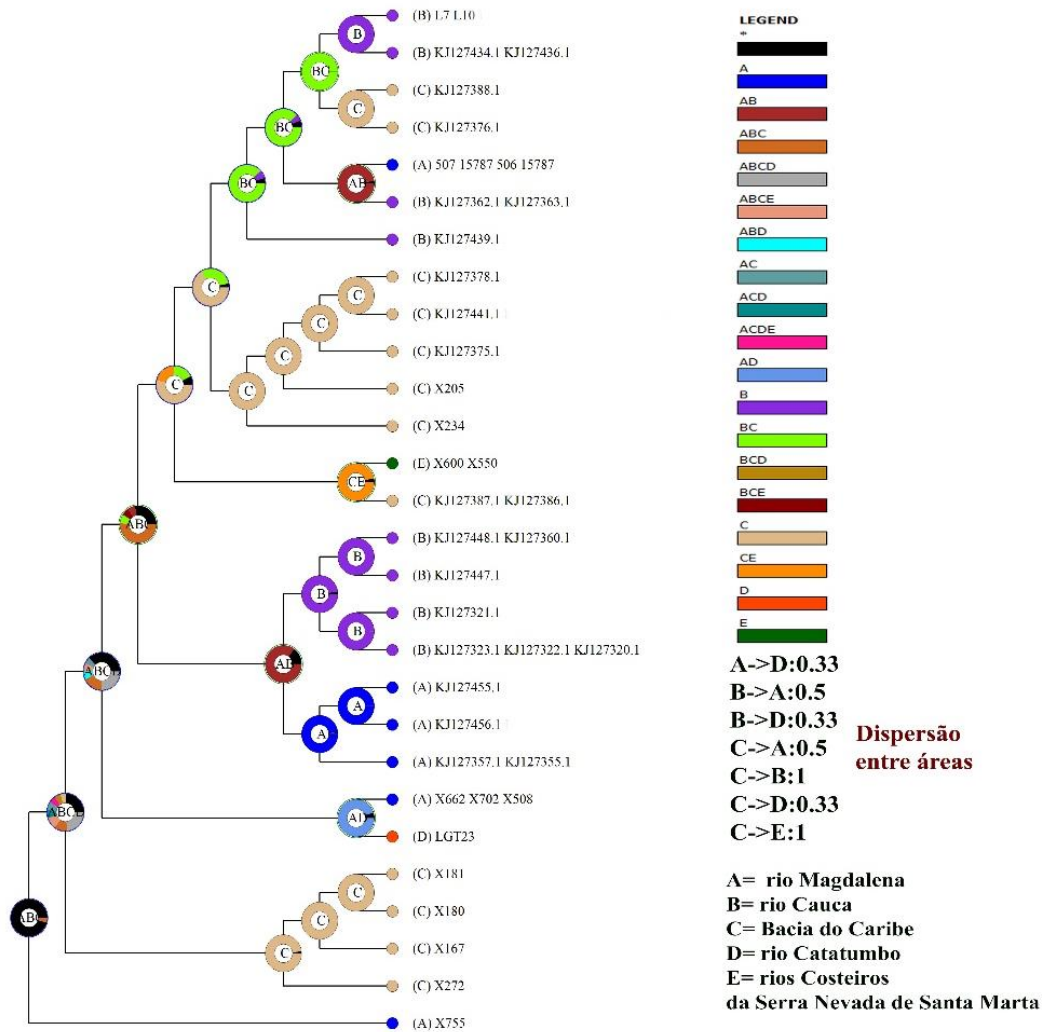
Fonte: O autor

Biogeografia histórica

Mediante o modelo DEC (*Dispersal-Extinction Cladogenesis*), podem ser inferidos diversos tipos de eventos, especialmente eventos de ancestralidade de áreas. *A. latifrons* é uma espécie não migradora, então, os eventos que são apresentados na Figura 12 não refletem uma situação de dispersão *per se*, mas sim, um cenário de vicariância que destaca o levantamento dos Andes e talvez uma possível zona de hibridação anterior a este evento. As populações que configuram a bacia do Caribe possuem informações chaves para compreender a história das bacias Colombianas, propondo então algumas hipóteses: 1) uma zona biogeográfica Caribe-Magdalena+Cauca; 2)

eventos de migração não poderiam acontecer devido à restrição de habitat; 3) alguns rios curtos do baixo Sinú representam isolados que poderiam ser considerados como unidades estruturadas.

Figura 12 - Modelo *Dispersal-Extinction-Cladogenesis* (DEC), implementado no software RASP v. 4.0. Eventos de dispersão são apresentados entre as bacias.



Fonte: O autor

Discussão

A espécie *trans-Andina Andinoacara latifrons*, como espécie tipo do gênero *Andinoacara* (MUSILOVÁ; RICAN; NOVÁK, 2009), representa uma entidade endêmica que tem distribuição nas bacias de Magdalena-Cauca e Caribe essencialmente, embora esteja distribuída também no rio Catatumbo, que pertence à bacia do Maracaibo (Venezuela). Este é o primer estudo que explora a diversidade de *A. latifrons* com os genes mitocondriais *COI*, *Cytb* e os genes *Rag1*. A estrutura

biogeográfica da Colômbia não tem sido estudada de forma aprofundada, mas, são conhecidos eventos significativos que permitiram a diversidade ictiológica que atualmente é reportada, influenciada na sua maioria por eventos de vicariância.

A análise de delimitação de espécies validou as espécies previamente estabelecidas na topologia conhecida da subfamília Cichlasomatini, o gene COI confirmou mediante os três métodos (GMYC, PTP, ABGD) ser um marcador com uma alta confiabilidade. Puillandre et al. (2012) demonstraram que o modelo ABGD funciona bastante bem com grandes conjuntos de dados *barcode* com espécies previamente hipotetizadas. Eles analisaram conjuntos de dados com uma divergência (prior) de 1% até 3%, sendo os melhores resultados obtidos, assim, neste estudo essas mesmas divergências proporcionaram resultados similares, indicando 10 OTUs consistentemente resolvidos (Fig. 9), mas quando usa a partição recursiva destaca 12 OTUs.

As sequências da espécie *Andinoacara latifrons*, pertencentes à localidade da Quebrada Lomas Aisladas (25_Car, 26_Car, 27_Car, 28_Car) (Bacia hidrográfica do Caribe) é mostrada como um grupo levemente separado do resto das populações, indicando mediante o modelo GMYC, PTP (0.518) e ABGD (partição recursiva) ser um grupo diferenciado. A Quebrada Lomas Aisladas está localizada na região de Urabá, sob a conhecida Serranía del Darién, o que corresponde à borda Colombia-Panamá, que termina no Golfo de Urabá. Lomas Aisladas é uma colina baixa, junto com Cerro Cuchillo que conformam uma conexão descontínua que finaliza no oeste dos Andes Colombianos. O tamanho, a elevação, o número e a localização exata dessas colinas ainda não estão indicados em nenhum mapa publicado. As colinas destacam-se muito claramente das planícies pantanosas densamente arborizadas do Vale do Atrato e são facilmente vistas dos contrafortes da Serrania de Abibe a leste (HAFFER, 1970). Esta população pode ter sido isolada faz milhões de anos, indicando uma incipiente especiação. A presença de este possível clado *Andinoacara* n. sp. precisa ser revisado em níveis mais estreitos, a diferenciação de esta espécie pode ser corroborada com análises morfológicas pois esta região do baixo Atrato, junto com Chocó e a Serranía del Darién além de ter significativa riqueza, também é caracterizada por apresentar diferenças faunísticas notórias que precisam ser conhecidas, revisadas e conservadas (Kullander, comunicação pessoal).

A diversidade haplotípica do gene *Cytb* das populações Colombianas de *A. latifrons* mostrou-se convergente com os acidentes geográficos desta região. Em este estudo, as populações do alto Magdalena-Cauca tiveram uma associação com as bacias do Caribe, isto é explicado pela

configuração e presença de Serranias, Serras e montanhas isoladas dos Andes Colombianos que permitem comprovar aspetos importantes da sua evolução biológica (CASTAÑO-URIBE, 1999).

Desde o Eoceno até o Mioceno, a subdução do prato do Caribe sob a placa sul americana produziu o levante andino da cordilheira central da Colômbia, isto permitiu o isolamento desta região, separando principalmente as drenagens do pacífico da região norte de América do Sul (RODRÍGUEZ-OLARTE; MOJICA CORZO; TAPHORN, 2011). Seguindo estes eventos, no plioceno, com o encerramento do istmo de Panamá aconteceu uma definitiva conexão geológica: baixo Mesoamérica - Norte de América do Sul (ITURRALDE-VINENT; MACPHEE, 1999). Assim, a cordilheira oriental terminou sua ascensão no plioceno inicial, isolando então o Magdalena, e a rápida ascensão dos Andes de Mérida no plioceno tardio finalizou com a separação da bacia do lago Maracaibo do rio proto Orinoco-Amazonas (RODRÍGUEZ-OLARTE; MOJICA CORZO; TAPHORN, 2011). No presente estudo, as populações de Catatumbo e Magdalena apresentam uma estreita relação (Fig 10), isto pode ser devido aos eventos de anastomoses que tiveram conexão Maracaibo-Magdalena, apoiando da mesma forma o proposto por (MUSILOVÁ et al, 2009, 2015).

A marcada similaridade das populações do San Jorge e Cauca poderia ser devido a que no baixo Cauca-Magdalena sob 200 m.s.n.m tem uma abertura que conforma um vale que forma uma planície de inundação, a Depressão Momposina (22 000km²), nesta depressão os rios Cauca e San Jorge convergem. Mas, A bacia do Magdalena - Cauca nasce no Parámo das Papas, o rio Cauca, cerca de 500 km mais a jusante flui através de um desfiladeiro profundo e estreito e passa por uma série de corredeiras que são uma barreira geográfica intransponível para muitas espécies de peixes, neste sentido, as populações do alto Cauca com o Caribe teriam teoricamente problemas para se misturar, assim, conformando grupos mais o menos estruturados, isto, poderia indicar uma relação biogeográfica anterior, que seria designada como áreas comuns antes do levantamento das cordilheiras. Isto também pode ser justificado pois, *A. latifrons* é uma espécie não migradora, durante a estação seca permanece nas lagoas e pouco é conhecido acerca das suas estratégias, acredita-se que poderia desenvolver estratégias similares aos irmãos em outras bacias de América do Sul para respirar e obter oxigênio, e poder encontrar recursos em habitats disponíveis com o fim de sobreviver (WELCOMME, 1985; VAL; RANDALL, 2005).

Além disso, o rio Magdalena que corre paralelamente com o rio Cauca também converge nesta planície (JIMÉNEZ-SEGURA et al., 2016). O rio Sinú flui de norte ao leste entre San Jerónimo e Abibe, até o mar Caribe.

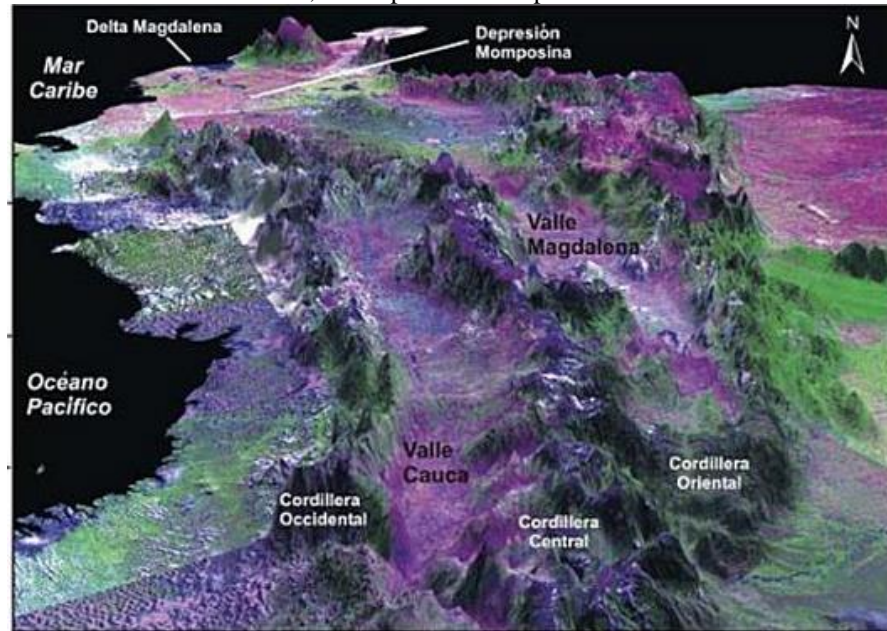
Implicações biogeográficas

O gênero *Andinoacara* representa claramente o melhor modelo dentro dos ciclídeos, onde sua diversificação aponta à orogenia dos Andes, é por esta razão recebe este nome, *Acara* dos Andes (MUSILOVÁ; RICAN; NOVÁK, 2009).

A diversificação de *Andinoacara* teve a sua origem mais o menos há 19 milhões de anos, assim, estima-se que *Andinoacara* teve dois eventos de dispersão, i) colonização do Maracaibo, e ii) re-colonização do Magdalena. Considerando os últimos eventos de elevação da cordilheira dos Andes, referindo-nos principalmente à cordilheira oriental há 12-10 milhões de anos, considera-se o gênero *Andinoacara* como anterior aos últimos eventos geomorfológicos que hoje conformam a estrutura de paisagens e serranias de Colômbia e Venezuela (Fig. 13).

A árvore filogenética concatenada (Fig.11) mostra eventos de dispersão que originaram as populações de SNSM desde as populações do Magdalena, o que pode ser justificado, por eventos de dispersão desde a região transandina venezuelana, como já foi reportado em *Pimelodella* (CONDE et al, 2016). A Serra Nevada de Santa Marta (SNSM), nasce de uma série de eventos tectônicos que deslocaram-na 200 km ao Norte, gerando afundamentos que formaram um complexo de pântanos, e lagoas fluviais, as quais recebem águas do rio San Jorge, Sinú, Cauca e Magdalena. Por outro lado, a SNSM é um sistema de montanhas isolado e independente da cordilheira dos Andes, onde já tem sido encontrado couraças lateríticas a mais de 2000 m de altura, o que indica que foram terras emergidas com pouca altitude no Eoceno (GALVIS et al, 2006), constituindo uma barreira que impedia a conexão com a bacia do Magdalena. Isto, reforça a ideia dos eventos de dispersão desde a região transandina até os rios curtos da SNSM (Fig. 13).

Figura 13 - Representação das Cordilheiras da Colômbia, com as suas elevações. Ressaltando a Serra Nevada de Santa Marta, e a Depresión Momposina.



Fonte: Geologia de los Andes Colombianos. Fuente: Colciencias, 2005.

Implicações a nível de Conservação

As estratégias de conservação para estabelecer unidades prioritárias sempre tem sido uma tarefa difícil. O cenário genético está constantemente mudando os processos evolutivos que hoje são conhecidos, a IUCN considera a variabilidade genética como um fator importante para planejar programas de conservação (MCNEELY et al., 1991). Considera-se que o mundo tem mais variabilidade do que pensamos, neste sentido, as unidades taxonômicas têm que ser conservadas considerando estes aspectos.

Frankham (2010) destaca três níveis de contribuição da genética e da biologia molecular na genética da conservação: O foco seria o primeiro. No segundo lugar, os fatores genéticos contribuem no risco de extinção a traves da depressão endogâmica, perda de diversidade genética e perda de potencial evolutivo. Terceiro, a diversidade genética impacta a sobrevivência dos ecossistemas, sua função e sua diversidade. Quando pensamos em estas considerações, é necessário então discutir as unidades a conservar, é quando falamos de unidades evolutivamente significativas (ESUs) como unidades populacionais que merecem gerenciamento separado e tem uma alta prioridade para conservação. Para preservar processos evolutivos, o manejo deveria preservar redes naturais de conexões genéticas entre populações, mais do que só as diferentes

populações dentro daquela rede. Técnicas genéticas são também essenciais porque proporcionam estimativos do fluxo genético entre as populações e isto guia esforços para manter os níveis históricos de intercâmbio entre populações (CRANDALL et al., 2000)

Os dados genômicas resultam ser melhores que os dados de microssatélites para delinear Unidades de conservação (CUs), pois os dados genômicas podem quantificar a variação adaptativa (FUNK et al., 2012). Mais trabalhos também são necessários no desenvolvimento de novas análises para delinear CU e testar a diferenciação adaptativa. Por exemplo, uma análise ideal poderia delinear as Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs), Unidades de Manejo (MUs) e quantificar a diferenciação adaptativa entre essas diferentes UCs hierárquicas em uma única estrutura analítica, análoga às atuais abordagens MCMC Bayesianas desenvolvidas para inferir simultaneamente filogenias, tempo de divergência e parâmetros demográficos históricos da sequência dados (DRUMMOND et al., 2012). Este foco pode ser realmente importante para delinear estratégias de conservação nas bacias Magdalena-Cauca e Caribe da Colômbia.

Ecologicamente relevantes na parte superior da bacia do Magdalena são os peixes da montanha que vivem em rios de alta energia e altamente oxigenados, como *Astroblepus* (Astroblepididae), *Chaetostoma* (Loricariidae) e *Trichomycterus* (Trichomycteridae) (REIS et al., 2016). *A. latifrons* é uma espécie capturada como pesca artesanal, embora a IUCN não considera isto como um risco. Por outro lado, a IUCN menciona que poderia ser afetada por sedimentação e poluição, relacionado com deflorestação (exploração madeireira, uso da terra por agricultura e pecuária) e também em menor grau, mineração (poluição, sedimentação). A drenagem do médio e baixo Magdalena poderia afetá-la. Justamente, no baixo Magdalena, na bacia Momposina, está se concentrando cerca do 80% de “Ciénagas”, depressões na base rochosa do cretáceo tardio com corpos de água estagnados ou dependentes do rio que acumulam sedimentos. As plumas enlameadas do rio Magdalena e do Canal del Dique afetaram em grande parte a qualidade da água e tanto a lama arrastada como a redução da salinidade podem ter causado danos graves aos recifes de corais. Dados indicam que o rio Magdalena contribui com aproximadamente 10% da carga total de sedimentos descarregada da costa leste da América do Sul (RESTREPO et al., 2006).

Andinoacara latifrons é uma espécie de planícies de inundação e de coluna de água que está diretamente relacionado com os processos de sedimentação e de oxigenação, que afeta em maior medida o baixo Magdalena-Cauca, que tem sua repercussão maior no Caribe e finalmente

nos recifes de corais. Esta é uma espécie abundante que representa a história evolutiva dos Andes colombianos e que está sendo afetada por contaminação ambiental. A preferência de nicho de esta espécie não migradora representa um ponto chave para a conservação e implementação de políticas públicas que possibilitem o bom uso da produção mineira.

4.2. PRIMEIRO REGISTRO E INTRIGANTE DESCOBERTA DE REGIÕES ITS NA ESPÉCIE TRANSANDINA *ANDINOACARA LATIFRONS* (STEINDACHNER, 1878)

First record and intriguing finding of ITS regions in the transandean specie

***Andinoacara latifrons* (Steindachner, 1878)**

De la Ossa-Guerra, Luz E¹; Santos, Mateus¹; Artoni, R¹

¹Universidade Estadual de Ponta Grossa, programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

RESUMO

A ordem Perciformes é a mais abundante enquanto ao número de espécies entre os teleósteos. Estudos citogenéticos realizados em Teleostei têm apresentado uma quantidade diversa de números cromossômicos, variando de 14 até 140, havendo, uma frequência em torno de $2n=48$, sendo este número constante na maioria dos ciclídeos neotropicais. Para entender as variações e a composição biogeográfica dos ciclídeos do neotropico, decidi se caracterizar o cariótipo da espécie *A. latifrons*, partindo da idéia de entender os padrões de diversificação na região dos Andes Colombianos. Para isto, foram realizadas técnicas convencionais de obtenção de cromossomos, bandeamento C, técnica para visualização de regiões organizadoras de nucléolo, e finalmente hibridização fluorescente *in situ* com sonda de DNA telomérico. O número diploide encontrado para *A. latifrons* foi de 48 cromossomos com formula cariotípica $FC= 6m+8sm+16st+18a$, e $NF=78$. Foram detectados um par de cromossomos com marcações NOR e heterocromatina constitutiva na maioria dos cromossomos pericentromérica. A FISH com DNA telomérico revelou 2 pares de cromossomos metacêntricos com presença de sítios intersticiais. O conservado número diploide e o intrigante padrão de DNA telomérico intersticial sugere, 1) Regiões de DNA satélite, como já tem sido observado em outros ciclídeos, e 2) Eventos de translocações/inversões e fusões, como eventos que guiam os padrões de reorganização cromossômica nos ciclídeos. Desta forma, fica em aberto novos estudos para confirmar estes padrões e dilucidar a história evolutiva de esta espécie *trans* andina.

Palavras-chave: Ciclídeos, sítios intersticiais teloméricos, rearranjos cromossômicos.

ABSTRACT

The Perciformes order is the most abundant in number of species among the teleosts. Cytogenetic studies carried out in Teleostei have presented a diverse amount of chromosome numbers, ranging from 14 to 140, having a frequency $2n = 48$, being this number constant in most Neotropical cichlids. To understand the variations and biogeographic composition of the cichlids of the Neotropics, the karyotype of the *A. latifrons* species was determined, starting from the idea of understanding the patterns of diversification in the Colombian Andes region. For this, conventional techniques of obtaining chromosomes, C-banding, technique for visualizing nucleolar organizing regions, and finally fluorescence *in situ* hybridization with telomeric DNA probe were performed. The diploid number found for *A. latifrons* was 48 chromosomes with karyotypic formula $FC = 6m + 8sm + 16st + 18a$, and $NF = 78$. A pair of chromosomes with NOR and constitutive heterochromatin were detected on most pericentromeric chromosomes. FISH with telomeric DNA probe revealed 2 pairs of metacentric chromosomes with presence of interstitial sites. The conserved diploid number and the intriguing pattern of interstitial telomeric DNA suggests (1) regions of satellite DNA, as has already been observed in other cichlids, and (2) events of translocations / inversions and fusions as events that guide chromosomal reorganization patterns in cichlids. In this way, new studies are open to confirm these standards and elucidate the evolutionary history of this *trans* Andean species.

Key words: Cichlids, telomeric interstitial sites, chromosomal rearrangements.

Introdução

A ordem Perciformes é a mais abundante enquanto ao número de espécies entre os teleósteos. Os estudos citogenéticos realizados em Teleostei têm apresentado uma quantidade diversa de números cromossômicos, variando de 14 até 140, havendo, uma frequência em torno de $2n=48$, sem a presença de microcromossomos no complemento cariotípico padrão (RIBEIRO, 2007). Em ciclídeos, os estudos citogenéticos tem sido na sua maioria usando técnicas convencionais, no entanto, tem aumentado consideravelmente, especialmente no novo mundo. Assim, nos últimos anos o cariótipo de 135 espécies de ciclídeos foi determinado, 106 do Novo Mundo (33 gêneros) e 29 do Velho (11 gêneros) (FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 2003), sendo o $2n=48$ o número diploide conservado no Novo Mundo (THOMPSON, 1979).

Muitos gêneros têm sido caracterizados dentro da subfamília Cichlasomatinae, especialmente *Cichlasoma*, com um número de $2n$ que vai desde 46 até 52 cromossomos (FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 2003; MARTINS; PORTELA-CASTRO; JULIO JUNIOR, 1995; RONCATI; PASTORI; FENOCCHIO, 2007), assim como outros grupos: *Aequidens*, *Heros*, *Bujurquina*, *Caquetaia*, mostrando padrões similares já mencionados. Marescalchi (2005) gera um

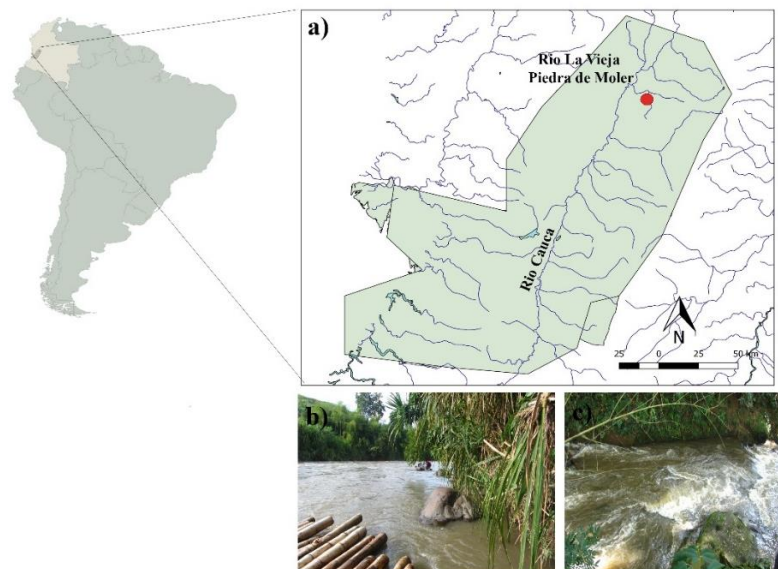
aporte à tribo Cichlasomatini, caracterizando citogeneticamente espécies do gênero *Aequidens*, bem reconhecido por seu debate entorno a sua taxonomia, também do gênero *Cichlasoma*, *Laetacara* e *Nannacara*, tendo algumas espécies do gênero *Aequidens* sua distribuição no Norte de América do sul, especificamente na Colômbia: *A. metae* e *A. tetramerus*. A história cariotípica desde grupo continua sendo pouco clara, a tendência dos grupos parece ser uma progressiva redução dos cromossomos heterobraquiais, indo das espécies mais basais até as mais especializadas, portanto, os cariótipos $2n=48$ com elementos principalmente heterobraquiais parecem caracterizar os primitivos Cichlasomatini.

A não resolvida evolução citogenética dos ciclídeos, essencialmente os Cichlasomatines, leva a plantear o objetivo deste estudo, que é aprimorar o conhecimento no gênero *Andinoacara*, como o primer reporte cariotípico da espécie *A. latifrons* com a finalidade de entender os padrões evolutivos de esta espécie no contexto do acidente geográfico da cordilheira dos Andes, isto, para entender desde outra perspectiva, como se diversificaram os ciclídeos neotropicais.

Material e Métodos

Os espécimes utilizados para o presente trabalho pertenciam a bacia hidrográfica do rio Cauca, Colômbia e foram coletados no departamento de Valle del Cauca, Corregimiento de Piedra de Moler (4.713373 N; -75.851625 W) (6 indivíduos) (Fig. 14).

Figura 14 - a) Departamento de Valle del Cauca-Colômbia, o ponto vermelho simboliza o lugar de coleta, Rio La Vieja. Piedra de Moler, e seu principal rio, O Rio Cauca. b) e c) Alguns dos ambientes onde foi coletado *Andinoacara latifrons*.



Fonte: O autor

As metáfases mitóticas foram obtidas utilizando o protocolo de Bertollo; Moreira-Filho e Galetti Jr (1986). Para a detecção da Heterocromatina Constitutiva foi adotado o protocolo proposto por Sumner (1972) utilizando a coloração com iodeto de propídio (LUI et al., 2009). Já para a localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980) com modificações.

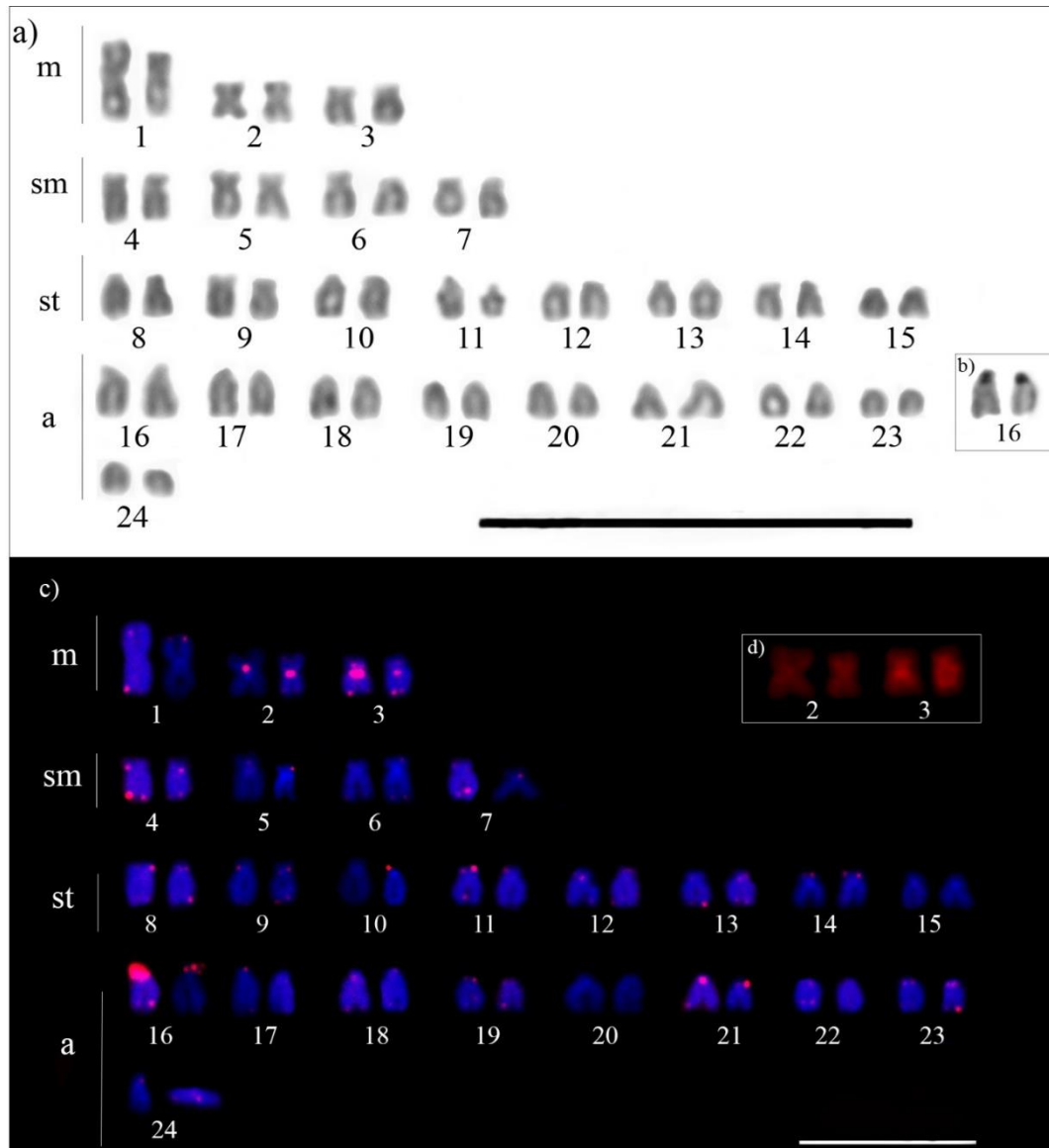
A hidridização *in situ* fluorescente (FISH) ocorreu de acordo com o protocolo proposto por Pinkel; Straume e Gray (1986), com a estringência de 77% (2,5 ng/ μ L sonda, 50 % formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, à 37 °C por 16 horas). Para a detecção da sonda foi utilizado o anticorpo anti-digoxigenina conjugada com rodamina (*Roche Applied Science*). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (0,2 μ g/mL) em meio de montagem *Vectashield*. A sonda de DNA telomérico foi obtida por meio de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos *primers* degenerados (TTAGGG)₄ e (CCCTAA)₄ (IJDO et al., 1991) e posterior marcação da sonda pelo Kit *Nick Translation* com digoxigenina-11-dUTP, segundo as orientações do fabricante (*Roche Applied Science*). A reação de amplificação da sonda foi a seguinte: 2,5 μ l de tampão 10x, 1,5 μ l de MgCl₂ (50Mm), 1 μ l de cada *primer* à 10ng/ μ l, , 2,5 de dNTPs (2nM), 0,2 U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura até completar o volume de 25 μ l. Com a programação do ciclador térmico: dez ciclos de desnaturação à 94°C por 1min, seguido de anelamento à 55°C por 30s e extensão à 72°C por 1min. Posteriormente 30 ciclos desnaturação à 94°C por 1min, seguido de anelamento à 60°C por 30s e extensão à 72°C por 1,30min seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 5 min e finalizando com uma temperatura de e 4°C. A integridade da sonda então, foi verificada em gel de agarose a 1%.

As lâminas foram analisadas no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS Pro 2011 (Carl Zeiss®) em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels. Os cariótipos foram montados com o auxílio do software Adobe Photoshop PSCS6 e os cromossomos foram classificados segundo Levan; Fredga, e Sandberg (1964) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a).

Resultados

Este estudo apresenta a primeira descrição cariotípica da espécie *Andinoacara latifrons* com um número diploide de 48 cromossomos. A fórmula cariotípica esteve composta por 6 cromossomos metacêntricos, 8 cromossomos submetacêntricos, 16 cromossomos subteloicêntricos, e 18 cromossomos acrocêntricos, com um número fundamental (FN) =78. O primer par metacêntrico se exibe de grande porte, quando comparado como resto de cromossomos do complemento (fig. 15, a). As regiões organizadoras de nucléolo foram simples, com marcação centromérica em um par de cromossomos acrocêntricos (par 16) (Fig. 15, b). A hibridização fluorescente *in situ* com sonda de DNA telomérico, mostrou marcações esperadas na maioria dos cromossomos, e revelou marcações intersticiais em dois pares de cromossomos metacêntricos (Fig.15, c), sendo confirmadas com a técnica de heterocromatina constitutiva (Fig.15, d). A maioria de cromossomos apresentaram marcações de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica, característica própria da família Cichlidae.

Figura 15 - Análise citogenética de *A. latifrons* numa população do Alto Cauca. a) Cariótipo corado convencionalmente (Giemsa). Barra=20µm. b) Par acrocêntrico 16 marcado com agNORs. c) Hibridização *in situ* com DNA telomérico, evidenciando o par 2 e 3 metacêntrico com marcação intersticial. Barra=10µm. d) Cromossomos marcados com heterocromatina constitutiva através de bandeamento C.



Fonte: O autor

Discussão

A família Cichlidae é considerada como modelo em estudos de radiação adaptativa, por sua ampla diversificação em termos de habitats, nichos e diversidade genética. O gênero *Andinoaca* não aparece na literatura como um grupo explorado cito geneticamente. Neste estudo *A. latifrons* com um N=48 cromossomos, e um padrão de manutenção de um maior número de cromossomos

acrocêntricos e poucos cromossomos bibraquias, aparecem como uma condição ancestral e uma tendência nos ciclídeos neotropicais, como mostrado em grupos como *Cichlasoma* e *Crenicichla* (MOLINA et al., 2014). Além disso, a constância do número diploide em ciclídeos neotropicais reforça a idéia de que a evolução cariotípica dos ciclídeos tem sido conservativa e que as diferenças na fórmula cariotípica pode ser devido ao fato de que os rearranjos ocorrem neste grupo por inversões pericêntricas e deleções (MARTINS; PORTELA-CASTRO; JULIO JUNIOR, 1995)

A família Cichlidae pode ser caracterizada como um grupo de peixes que apresenta um sistema único NOR localizado no cromossomo maior do complemento, o qual parece ser um estado de caráter plesiomórfico para ciclídeos (FELDBERG; BERTOLLO, 1985b). Em contraste, *A. latifrons* apresenta um par de cromossomos acrocêntricos, o qual parece ser um estado derivado. Hsu et al. (1975) sugeriram que as espécies que apresentam um único par de NORs podem ser consideradas mais primitivas em termos de distribuição de rDNA no cariotipo do que aquelas com NORs múltiplas.

Dentro da subfamília Cichlasomatinae, de 15 espécies que já têm sido estudadas, 5 apresentam NORs múltiplos, isto é, *Caquetaia spectabilis* (SALGADO et al., 1995), *Cichlasoma paranaense* de uma população (LOUREIRO; DIAS, 1998), *Mesonauta insignis* e *M. festivus* (SANTOS et al., 2001) e *Symphysodon aequifasciatus* (SALGADO et al., 1995; MESQUITA et al., 2000). Dentro do gênero *Andinoacara* este estudo é o primeiro em relatar marcações centroméricas em cromossomos acrocêntricos.

Os ciclídeos do novo Mundo apresentam heterocromatina constitutiva principalmente na região pericentromérica dos cromossomos, já tem sido reportado blocos de heterocromatina ao redor do centrômero e assim, poucas espécies apresentam braços curtos completamente heterocromáticos. *A. latifrons* apresenta marcações de este tipo e algumas marcações teloméricas, o padrão de marcação pericentromérica continua sendo um padrão, inclusive dentro das tribos mais derivadas: Cichlasomatini e Geophagini. A ausência de braços curtos heterocromáticos continua sendo uma característica ancestral nos ciclídeos.

O intrigante padrão de marcação dos cromossomos metacêntricos 2 e 3 em sítios intersticiais teloméricos (ITS) pode ser considerado um evento de rearranjo cromossômico que reafirma a ampla variação e adaptação dos ciclídeos neotropicais. Por outro lado, a diferença em intensidade de sinal das marcações teloméricas pode estar relacionada com às variações em seus respectivos comprimentos de telômero (LANSDORP et al., 1996).

A presença de ITS já tem sido reportada em ciclídeos africanos, como eventos de rearranjos: fusões, transversões, elementos transponíveis, que geraram o complexo e amplo registro cromossômico alguns grupos como *Oreochromis* (MOTA-VELASCO et al., 2010). Também, regiões ITS têm sido observadas em regiões intersticiais (entre região telomérica e centromérica) e regiões pericentroméricas de pares de cromossomos de alguns grupos como *Notothenia coriiceps* e *Sparus auratus* (OCALEWICZ, 2013). A manutenção do número cromossômico $2n=48$ de *A. latifrons* demonstra que eventos de rearranjos cromossômicos como fusões não poderiam ser considerados como únicos eventos. Únicos eventos de rearranjos cromossômicos não têm por que ser exclusivas opções a considerar. A permanência de um número cromossômico de caráter plesiomórfico poderia indicar também, sítios de DNA satélites localizados nas regiões pericentroméricas do par metacêntrico 2 e 3 de *A. latifrons*, como já foi reportado em outros grupos animais (METCALFE; ELDRIDGE; JOHNSTON, 2004). Mutações de tipo inversões, fusões e translocações tem que ser consideradas com um maior número de análises, assim, este resultado preliminar está indicando um novo foco de estudo para os ciclídeos pertencentes às regiões transandinas, e assim, uma vez mais, considerar estes eventos raros, como uma justificativa a mais para entender padrões de evolução dos ciclídeos neotropicais e promover planos de conservação nas bacias Colombianas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade genética de *A. latifrons* está relacionada com os padrões geomorfológicos que levaram a estruturar os sistemas hídricos da Colômbia. Como primer estudo que explora a sua diversidade, *A. latifrons* representa uma espécie com uma história biológica própria dos Andes Colombianos, significando isto, um argumento justificável para promover a conservação das suas bacias. Isto, também é visto pelo alto endemismo. O gene COI permitiu validar e descobrir uma nova unidade taxonômica, representando uma diversidade ainda não descoberta no litoral Colombiano, e demonstra uma vez mais a importância da preservação das diferentes áreas Colombianas.

A história dos peixes colombianos precisa ser reconstruída, pois elas vão reconstruir também a biogeografia, a multiplicidade de habitats e a riqueza biológica que permite uma compreensão global do território. Isto, objetivando estratégias de estudos biogeográficos na região e a união das entidades governamentais para incrementar o conhecimento social do espaço ambiental e a preservação do mesmo.

A utilização de ferramentas genéticas, citogenéticas e moleculares tem que ser usada em razão a analisar de forma mais abrangente os processos e dinâmicas que estão levando as populações de peixes neotropicais Colombianos. *A. latifrons* se comporta como uma espécie que se analisa desde a perspectiva filo geográfica, que explica conceitos de endemismo, de biogeográfica histórica e riqueza genética. Os estudos futuros devem estar focados em entender a diversificação da ictiofauna colombiana, usando organismos modelos, como *A. latifrons*. Da mesma forma, os estudos citogenéticos devem ser considerados para analisar de forma global, a diversificação dos ciclídeos neotropicais.

REFERENCIAS

- ABELL, R. et al. Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. **BioScience**, v. 58, n. 5, p. 403, 2008.
- BAGLEY, J. C. et al. Phylogeography and species delimitation in convict cichlids (Cichlidae: Amatitlania): Implications for taxonomy and Plio-Pleistocene evolutionary history in Central America. **Biological Journal of the Linnean Society**, n. September, 2016.
- BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O; GALETTI Jr., P. M. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v.28, p.153-159, 1986
- CASTAÑO-URIBE, C., Sierras y Serranías de Colombia. Colección Ecológica Banco de Occidente, Cali. Colombia. 205 pp, 1999.
- CALA, PLUTARCO. Ictiofauna Dulceacuícole de Colombia, [s.d.]. 1987. Disponible em: http://www.accefyn.org.co/revista/Volumen_16/62/69-84.pdf
- CHAKRABARTY, P. Cichlid biogeography: Comment and review. **Fish and Fisheries**, v. 5, n. 2, p. 97–119, 2004.
- CONDE, C.; VILLA-NAVARRO, F.; DERGAM, J. Evolutionary history of the genera *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) in the trans-Andean region: taxonomic implications. Universidade Federal de Viçosa. 2016.
- CLEMENT; SNELL; WALKER. TCS: estimating gene genealogies. **Memory**, v. 3, 2001.
- DE CAMARGO, M. M.; NAHUM, L. A. Adapting to a changing world: RAG genomics and evolution. **Human Genomics**, v. 2, n. 2, p. 132–137, 2005.
- DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012.
- FARIAS, I. P. et al. Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: monophyly and high genetic divergence of the neotropical assemblage. **J. Mol. Evol.**, v. in press, n. 1999, p. 703–711, 1999.
- FARIAS, I. P. et al. The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 53, n. 2, p. 89–103, 2001.
- FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C. 1985b. Nucleolar organising regions in some species of Neotropical cichlid fish (Pisces, Perciformes). **Caryologia** 38 (3-4)p.319-324.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.; BERTOLLO, L. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. **Fish adaptations**, p. 285–308, 2003.
- FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–299, 1994.

- FRIEDMAN, M. et al. Molecular and fossil evidence place the origin of cichlid fishes long after Gondwanan rifting. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1770, p. 20131733, 2013.
- FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. **Systematic biology**, v. 62, n. 5, p. 707–24, 2013.
- GALVIS, G., et al. Peces del medio Amazonas. Región de Leticia, Editorial. ed, **Conservación Internacional. Serie de guías tropicales de campo N.5**. Forma e Impresos, Bogotá, 2006.
- GRANDE T, LATEN H, LOPEZ JA. Phylogenetic relationships of extant esocid species (Teleostei: Salmoniformes) based on morphological and molecular characters. **Copeia**. 4:743–757, 2004.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696–704, 2003.
- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.
- HOORN, C., GUERRERO, J., SARMIENTO, G.A. & LORENTE, M.A. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. **Geology**, 23, 237–240, 1995.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.
- HUBERT, N. et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, 2008.
- HSU, T.C., SPIRITO S.E., PARDUE, L.M. Distribution of 18/28S ribosomal genes in Mammalian genomes. **Chromosoma** 53: 25-36. 1975.
- ITURRALDE-VINENT, M. A., AND R. D. E. MACPHEE. Paleogeography of the Caribbean region: Implications for Cenozoic biogeography. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 238:1–95,1999.
- JIMÉNEZ-SEGURA, L. F. et al. Freshwater fish faunas, habitats and conservation challenges in the Caribbean river basins of north-western South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 65–101, 2016.
- JIMÉNEZ-SEGURA, L. F.; PALACIO, J.; LEITE, R. River flooding and reproduction of migratory fish species in the Magdalena River basin, Colombia. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 19, n. 2, p. 178–186, 2010.
- KNOWLTON, N.; WEIGT, L. A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1412, p. 2257, 1998.

- KOCHER, T. D. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 4, p. 288–298, 2004.
- KRESS, W.; ERICKSON, D. DNA barcodes: methods and protocols. Humana Press, 2012.
- KULLANDER, S. O. **Family Cichlidae (Cichlids)**. 2003.
- KULLANDER, S.O. A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). Pp. 461-498. 1998. Em: L.R. MALABARBA, R.E. REIS, R.P. VARI, Z.M.S. LUCENA e C.A.S. LUCENA (eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. **Edipucrs**, Porto Alegre.
- LANSDORP, P. M. et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 5, p. 685–691, 1996.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclatura for Centromeric Position on Chromosomes, **Hereditas**, v.25, n.2, p.201-220, 1964.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; HONEYCUTT, R. L.; WINEMILLER, K. O. Molecular phylogeny and evidence for an adaptive radiation of geophagine cichlids from South America (Perciformes: Labroidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, n. 1, p. 227–244, 2005.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; WINEMILLER, K. O.; HONEYCUTT, R. L. Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 1070–1086, 2010.
- LOVEJOY NR, DE ARAÚJO MLG. Molecular systematics, biogeography, and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Mol Ecol* 9(3):259–268, 2000.
- LUI, R. L. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Mícron**, v.40, n.5-6, p.552–559, 2009.
- LUNDBERG, J.G. The temporal context of the diversification of Neotropical fishes. Em: Malabarba, L.R., Vari, R.E., Lucena, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (Eds.), Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. **Edipucrs**, Porto Alegre, pp. 49–68, 1998.
- MARESCALCHI, O. Karyotype and mitochondrial 16S gene characterizations in seven South American Cichlasomatini species (Perciformes, Cichlidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 43, n. 1, p. 22–28, 2005.
- MARTINS, I. C.; PORTELA-CASTRO, A. L. D. B.; JULIO JUNIOR, H. F. Chromosome Analysis of 5 Species of the Cichlidae Family from the Parana River. **Cytologia**, v. 60, n. 1971, p. 223–231, 1995.
- MALDONADO OCAMPO; VARI, R; USMA, J. A. Checklist of the Freshwater Fishes of Colombia. **Biota Colombiana**, v. 9, n. 2, p. 143–237, 2008.

- MATZKE, N. J. Model selection in historical biogeography reveals that founder-event speciation is a crucial process in island clades. **Systematic Biology**, v. 63, n. 6, p. 951–970, 2014.
- MCNELLY et al. conserving the world's biological diversity. **IUCN, Gland, Switzerland; WRI, CI, WWF-US, and the World Bank**, Washington, D.C, v. 23. 1991.
- MESQUITA, D. R.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. Chromosomal variability in the wild ornamental species of *Symphysodon* (Perciformes: Cichlidae) from Amazon. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 2, p. 181–190, 2008.
- METCALFE, C. J.; ELDRIDGE, M. D. B.; JOHNSTON, P. G. Mapping the distribution of the telomeric sequence (T2AG3)_n in the 2n = 14 ancestral marsupial complement and in the macropodines (Marsupialia: Macropodidae) by fluorescence in situ hybridization. **Chromosome Research**, v. 12, n. 4, p. 405–414, 2004.
- MOLINA, W. F. et al. Padrões citogenéticos de duas espécies de ciclídeos de bacias do semi-árido do Brasil : *Crenicichla menezesi* e *Cichlasoma orientale*. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 4, p. 33–39, 2014.
- MOTA-VELASCO, J. C. et al. Characterisation of the chromosome fusions in *Oreochromis karongae*. p. 575–586, 2010.
- MUSILOVÁ, Z. et al. Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 46, n. 2, p. 659–672, 2008.
- MUSILOVÁ, Z.; ŘÍČAN, O.; NOVÁK, J. Phylogeny of the neotropical cichlid fish tribe cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae) based on morphological and molecular data, with the description of a new genus. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 47, n. 3, p. 234–247, 2009.
- MUSILOVÁ, Z.; SCHINDLER, I.; STAECK, W. Description of *Andinoacara stalsbergi* sp.n. (Teleostei : Cichlidae : Cichlasomatini) from Pacific coastal rivers in Peru, and annotations on the phylogeny of the genus. **Vertebrate Zoology**, v. 59, n. 2, p. 131–141, 2009.
- MUSILOVÁ, Z. et al. Phylogeny and historical biogeography of trans-Andean cichlid fishes (Teleostei : Cichlidae). **Vertebrate Zoology**, v. 65, n. 3, p. 333–350, 2015.
- OCALEWICZ, K. Telomeres in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n. 2–3, p. 114–125, 2013.
- PEREIRA, L. H. G. et al. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 20, 2013.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.83, n.9, p.2934-2938, 1986.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.
- PULLANDRE, N. et al. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1864–1877, 2012.

RAMBAUT A, SUCHARD MA, XIE D & DRUMMOND AJ (2014) Tracer v1.6, Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>

REE, R. H.; SANMARTÍN, I. Prospects and challenges for parametric models in historical biogeographical inference. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 7, p. 1211–1220, 2009.

REIS, R. E. et al. Fish Biodiversity and Conservation in South America. **Journal of fish biology**, p. 12–47, 2016.

RESTREPO, J. D. et al. Fluvial fluxes into the Caribbean Sea and their impact on coastal ecosystems: The Magdalena River, Colombia. **Global and Planetary Change**, v. 50, p. 33–49, 2006.

RIBEIRO, H. B. Estrutura e evolução cariotípica de peixes ciclídeos sul americanos. **Biologia**, 2007.

RODRÍGUEZ-OLARTE, D., MOJICA, J.I., TAPHORN, D.C. Northern South America: Magdalena and Maracaibo Basins, in: Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. pp. 243–258, 2011.

RONCATI, H. A.; PASTORI, M. C.; FENOCCHIO, A. S. Fishes of the Family Cichlidae (Perciformes) from Parana River (Argentina). **Cytologia**, v. 72, n. 4, p. 379–384, 2007.

RONQUIST, F. Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. **Syst Biol**, v. 46, n. 1, p. 195–203, 1997.

SALGADO SM, FELDBERG E, PORTO JIR. Estudos citogenéticos em cinco espécies da família Cichlidae (Perciformes-Labroidei), da bacia amazônica central. **Braz J Genet** 18:463. 1995

SMITH, L; CHAKRABARTY, P.; SPARKS, J. S. Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). **Cladistics**. v. 24, p. 625–641, 2008.

SONNENBERG, R.; NOLTE, A. W.; TAUTZ, D. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. **Frontiers in zoology**, v. 4, p. 6, 2007.

STAUFFER, J. R. et al. Cichlid fish diversity and speciation. **Reconstructing the Tree of Life: Taxonomy and Systematics of Species Rich Taxa**, p. 213–225, 2006.

SUMNER, A. T. A. Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterocromatin. **Experimental Cell Research**, v.75. p.304-306, 1972.

TALAVERA, G.; DINČÁ, V.; VILA, R. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 12, p. 1101–1110, 2013.

THOMAZ, A. T. et al. Molecular phylogeny of the subfamily Stevardiinae Gill, 1858 (Characiformes: Characidae): classification and the evolution of reproductive traits. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, p. 146, 2015.

THOMPSON, K. W. Cytotaxonomy of 41 species of neotropical Cichlidae. **Copeia**, n. 4, p 679-691, 1979.

TRIFINOPOULOS, J. et al. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W232–W235, 2016.

WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847–1857, 2005.

WEIGT, L. A. et al. Using DNA barcoding to assess Caribbean reef fish biodiversity: Expanding taxonomic and geographic coverage. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

YU, Y.; HARRIS, A. J.; HE, X. S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 2, p. 848–850, 2010.

YU, Y. et al. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 87, p. 46–49, 2015.

ZHANG, J. et al. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869–2876, 2013.

ANEXO A - Protocolo de Extração de DNA

- **Extração de DNA método CTAB**

Tampão de extração **com CTAB separado**. Para 15 mL de solução tampão:

5mL de NaCl 5M ([] final 1M)

5mL EDTA 0,5M ([] final 0,1M) → Pesar 2g de NaOH pH→8

5mL TRIS-HCl 1M pH 8.0 ([] final 0,1M)

Processo de extração: (0,2g de tecido +-)

360µL de tampão **sem CTAB**;

240 µL de CTAB 5%;

13µL de proteinase K (10mg/mL);

10µL de RNase (10mg/mL); →37°C 3h.

15µL de DTT (1M) ou 5 µL de β-Mercaptoetanol.

1. Colocar a 50°C por 10 horas ou até que o tecido esteja totalmente digerido;
2. Adicionar 600µL de clorofórmio;
3. Agitar durante 5 min (vórtex suave). Centrifugar a 8000 rpm por 5 min;
4. Retirar sobrenadante (contém o DNA) e transferir para um novo tubo;
5. Adicionar 600 µL de Etanol (Absoluto) e deixar a -20°C por 2 horas ou *Over night*;
6. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 min. (alinhar os tubos na centrifuga). Descarta-se o sobrenadante;
7. Lavar o pellet com (não misturar) 500µL de etanol 70%. Centrifugar por 2 min e retirar o sobrenadante (14000 rpm).
8. Deixar secando na estufa a 40°C no MÁXIMO e ressuspender em 20µL de TE.
9. Banho maria 30°C+- (Se precisar, para diluir DNA).
10. Armazenar no freezer.

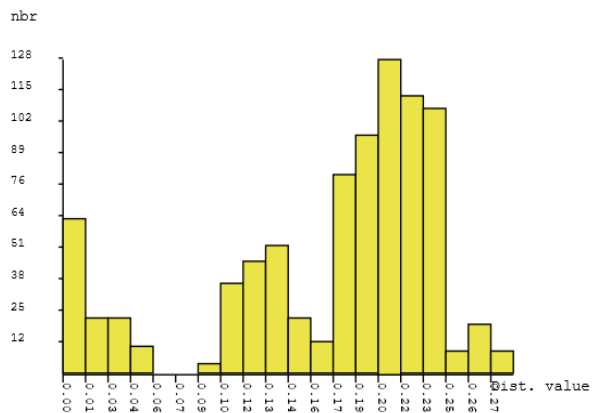
ANEXO B - Divergência evolutiva entre as sequencias. A análise foi realizada usando Tamura 3-parameter model. A taxa de variação entre os sitios

<i>Aequidens pulcher</i>																																					
<i>Andinoacara pulcher</i>	0.04																																				
11258_MA	0	0.04	0.00																																		
167_CA	0	0	0	0.05	0.03	0.03																															
181_CA	3	9	9	0.05	0.04	0.04	0.00																														
203_CA	6	2	2	2	2	0.03	0.00	0.00	0.04	0.04																											
205_CA	7	7	7	2	4	0	0.03	0.00	0.00	0.04	0.04	0.00																									
235_CA	7	7	7	2	4	0	0	0.03	0.00	0.00	0.04	0.04	0.00	0.00																							
272_CA	7	7	7	2	4	0	0	0.05	0.03	0.03	0.00	0.00	0.03	0.03	0.03																						
506_MA	0	0	0	9	2	7	7	7	7	6	0.04	0.00	0.00	0.03	0.04	0.00	0.00	0.00	0.03																		
5072_MA	0	0	0	9	2	7	7	7	7	6	0	0.04	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00																				
508_MA	0	0	0	9	2	7	7	7	7	6	0	0.03	0.01	0.01	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.04	0.01	0.01															
545_SNSM	1	4	4	4	7	2	2	2	2	2	4	4	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01																				
550_SNSM	2	2	2	7	0	9	9	9	4	2	2	7	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00																			
600_SNSM	2	2	2	7	0	9	9	9	4	2	2	7	0	0	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00																
606_SNSM	2	2	2	7	0	9	9	9	4	2	2	7	0	0	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00															
662_MA	5	4	4	0	3	2	2	2	7	4	4	9	2	2	2	0.03	0.01	0.01	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01											
70_CAT	1	4	4	4	7	2	2	2	2	4	4	0	7	7	7	9	0.03	0.00	0.00	0.04	0.04	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00						
702_MA	4	9	9	4	7	7	7	7	2	9	9	5	2	2	2	4	5	0.03	0.01	0.01	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00							
KY4544521_CA	1	4	4	4	7	2	2	2	2	4	4	0	7	7	7	9	0	5	0.04	0.00	0.00	0.03	0.04	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	
L1_CAU	0	0	0	9	2	7	7	7	6	0	0	4	2	2	2	4	4	9	4	0.04	0.00	0.00	0.03	0.04	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00
L10_CAU	0	0	0	9	2	7	7	7	6	0	0	4	2	2	2	4	4	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
L11_CAU	0	0	0	9	2	7	7	7	6	0	0	4	2	2	2	4	4	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
L12_CAU	0	0	0	9	2	7	7	7	6	0	0	4	2	2	2	4	4	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
L4_CAU	0	0	0	9	2	7	7	7	6	0	0	4	2	2	2	4	4	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
L7_CAU	0	0	0	9	2	7	7	7	6	0	0	4	2	2	2	4	4	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
L8_CAU	0	0	0	9	2	7	7	7	6	0	0	4	2	2	2	4	4	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
LGT23_CAT	0	0	0	9	2	7	7	7	6	0	0	4	2	2	2	4	4	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
	0.03	0.01	0.01	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.04	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	4	7	7	7	4	4	4	4	4	7	7	2	9	9	9	1	2	7	2	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	

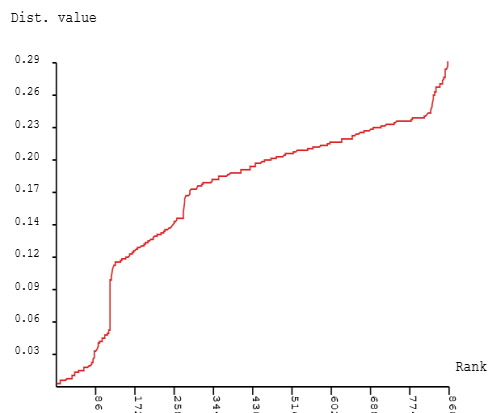
foi modelada seguindo a distribuição Gamma (shape parameter = 1). Um total de 436 posições foram analisadas no dataset final. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7.

ANEXO C - Delimitação de espécies, Modelo ABGD

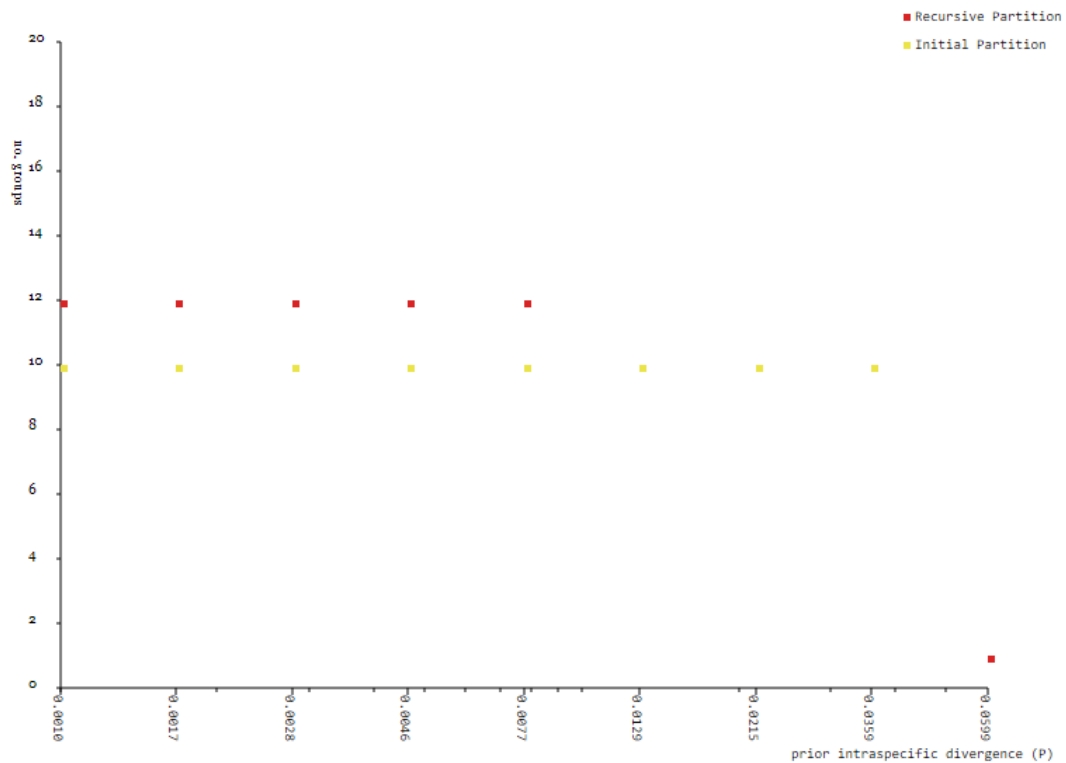
Modelo ABGB



Histogram of distances



Ranked distances



Group 2

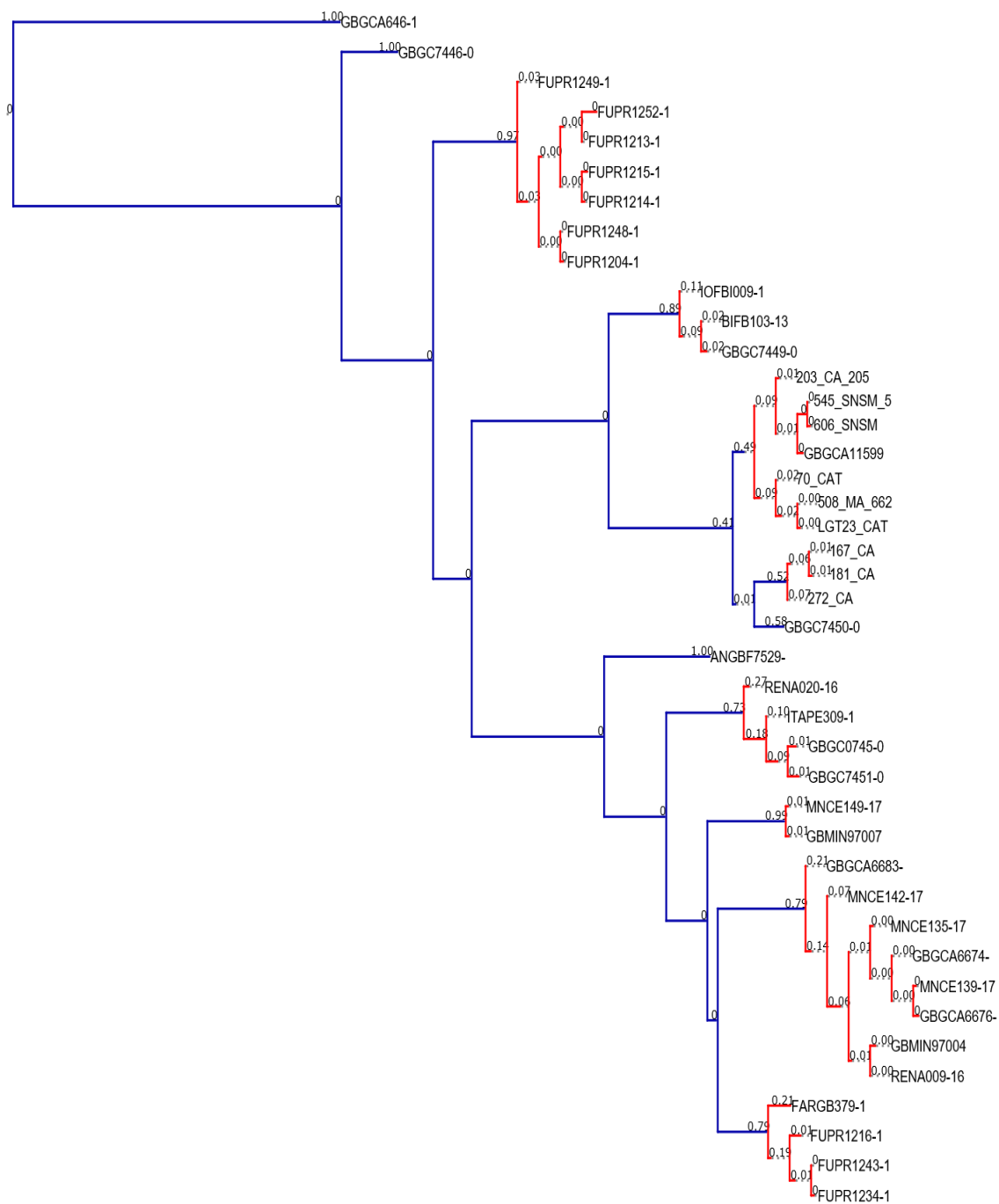
Initial Partition with prior maximal distance P=1.67e-03

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000



0.03

ANEXO D - Modelo PTP



0.10

ANEXO E - Sequencias do gene Citocromo b extraídas de GenBank utilizadas na rede de haplótipos.

Código	Voucher	Drenagem
KJ127456.1	IoMagd054	Baixo Magdalena
KJ127455.1	IoMagd051	Baixo Magdalena
KJ127453.1	IoMagd055	Baixo Magdalena
KJ127449.1	Nech074	rio Nechí
KJ127448.1	Nech072	rio Nechí
KJ127447.1	Nech073	rio Nechí
KJ127445.1	Jorg041	Rio San Jorge
KJ127442.1	Sinu013	Rio Sinú
KJ127441.1	Sinu014	Rio Sinú
KJ127440.1	Sinu012	Rio Sinú
KJ127439.1	Jorg031	Rio San Jorge
KJ127436.1	Jorg032	Rio San Jorge
KJ127434.1	Jorg034	Rio San Jorge
KJ127388.1	Cesa08	rio Cesar
KJ127387.1	Cesa03	rio Cesar
KJ127386.1	Cesa02	rio Cesar
KJ127385.1	Jorg13	Rio San Jorge
KJ127384.1	Jorg12	Rio San Jorge
KJ127378.1	Sinu09	rio Sinú
KJ127377.1	Sinu10	rio Sinú
KJ127376.1	Sinu08	rio Sinú
KJ127375.1	Sinu07	rio Sinú
KJ127374.1	Sinu06	rio Sinú
KJ127363.1	Nech01	rio Nechí
KJ127362.1	Nech02	rio Nechí
KJ127361.1	Nech03	rio Nechí
KJ127360.1	Nech04	rio Nechí
KJ127359.1	IoMagd07	Baixo Magdalena
KJ127358.1	IoMagd06	Baixo Magdalena
KJ127357.1	IoMagd04	Baixo Magdalena
KJ127356.1	IoMagd03	Baixo Magdalena
KJ127355.1	IoMagd02	Baixo Magdalena
KJ127323.1	Cauc05	rio Cauca
KJ127322.1	Cauc04	rio Cauca
KJ127321.1	Cauc02	rio Cauca
KJ127320.1	Cauc01	rio Cauca

ANEXO E - Continuação...

Voucher Número de Catálogo	Número de tecido	Seq-code	Bacia	Região hidrográfica
11629	272	CZUT-IC-TE	Río León	Caribe
11730	180	CZUT-IC-TE	Quebrada Lomas Aisladas	Caribe
11730	181	CZUT-IC-TE	Quebrada Lomas Aisladas	Caribe
11717	167	CZUT-IC-TE	Quebrada Lomas Aisladas	Caribe
	LGT23	CZUT-IC-TE	Quebrada NN-Tabrio	Valle del Cauca
	662	CZUT-IC-TE	Río Anchique	Magdalena
	702	CZUT-IC-TE	Río Anchique	Magdalena
15787	508	CZUT-IC-TE	Carmen de Apicala, Humedal Gavilan	Tolima
	600	CZUT-IC-TE	Río Piedras	Caribe
	550	CZUT-IC-TE	Río Cañas	Caribe
15787	507	CZUT-IC-TE	Carmen de Apicala, Humedal Gavilan	Tolima
15787	506	CZUT-IC-TE	Carmen de Apicala, Humedal Gavilan	Tolima
17045	L7	CZUT-IC-TE	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
17045	L10	CZUT-IC-TE	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
17045	L12	CZUT-IC-TE	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
17045	L8	CZUT-IC-TE	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
	11258	CZUT-IC-TE	Desague la española	Magdalena
17045	L4	CZUT-IC-TE	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
17045	L13	CZUT-IC-TE	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
17045	L11	CZUT-IC-TE	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
17045	L1	CZUT-IC-TE	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
	234	CZUT-IC-TE	Arroyo Pechelin	Sucre
	205	CZUT-IC-TE	Arroyo Pechelin	Sucre
	235	CZUT-IC-TE	R. Sinu-Isla Blanca-01	Cordoba
	203	CZUT-IC-TE	R. Sinu-Isla Blanca-01	Cordoba

ANEXO F - Sequencias usadas na delimitação de espécie mediante o gene citocromo oxidase 1 (COI), *cytb* e *rag1*

Código	Voucher	Espécie	País
FARGB379-11	UNMDP-T 0547	<i>Cichlasoma dimerus</i>	Argentina, Buenos Aires
FARGB380-11	UNMDP-T 0548	<i>Cichlasoma dimerus</i>	Argentina, Buenos Aires
FUPR1216-10	LBPV-25907	<i>Cichlasoma paranaense</i>	Brazil, Sao Paulo, Upper Parana Basin
FUPR1234-10	LBPV-29783	<i>Cichlasoma paranaense</i>	Brazil, Sao Paulo, Upper Parana Basin
FUPR1243-10	LBPV-31795	<i>Cichlasoma paranaense</i>	Brazil, Sao Paulo, Upper Parana Basin
FUPR1244-10	LBPV-31796	<i>Cichlasoma paranaense</i>	Brazil, Sao Paulo, Upper Parana Basin
FUPR1251-10	LBPV-32210	<i>Cichlasoma paranaense</i>	Brazil, Sao Paulo, Upper Parana Basin
GBGC0745-06	AY263863	<i>Cichlasoma bimaculatum</i>	
GBGCA646-10	GQ341594	<i>Cichlasoma bimaculatum</i>	
GBGCA6674-15	KF938515	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6675-15	KF938516	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6676-15	KF938517	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6677-15	KF938518	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6678-15	KF938519	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6679-15	KF938520	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6680-15	KF938521	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6682-15	KF938523	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6683-15	KF938524	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6684-15	KF938525	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6685-15	KF938526	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6686-15	KF938527	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6687-15	KF938528	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6688-15	KF938529	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6689-15	KF938530	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6690-15	KF938531	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBMIN97004-17	KY348990	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBMIN97005-17	KY348995	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBMIN97006-17	KY348996	<i>Cichlasoma orientale</i>	
GBMIN97007-17	KY349002	<i>Cichlasoma sanctifranciscense</i>	
MNCE130-17	TIUFRN0801	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Rio Grande do Norte, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE131-17	TIUFRN0723	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Ceara, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE132-17	TIUFRN2166	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Ceara, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE133-17	TIUFRN1575	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Ceara, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE134-17	TIUFRN1559	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Ceara, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE136-17	TIUFRN1186	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Ceara, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE137-17	TIUFRN1825	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Ceara, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion

MNCE139-17	TIUFRN1104	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Ceara, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE140-17	TIUFRN2010	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Rio Grande do Norte, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE141-17	TIUFRN2064	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Rio Grande do Norte, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE143-17	TIUFRN1551	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Paraiba, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE144-17	TIUFRN2271	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Paraiba, Mid-Northeastern Caatinga
MNCE145-17	TIUFRN0990	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Paraiba, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE146-17	TIUFRN1021	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Paraiba, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE147-17	TIUFRN1002	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Paraiba, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE148-17	TIUFRN1238	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Rio Grande do Norte, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE149-17	TIUFRN1711	<i>Cichlasoma sanctifranciscense</i>	Brazil, Alagoas, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE151-17	TIUFRN1715	<i>Cichlasoma sanctifranciscense</i>	Brazil, Alagoas, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE152-17	TIUFRN1719/ UFRN108	<i>Cichlasoma sanctifranciscense</i>	Brazil, Alagoas, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE153-17	UFRN1086	<i>Cichlasoma sanctifranciscense</i>	Brazil, Alagoas, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE154-17	UFRN1087	<i>Cichlasoma sanctifranciscense</i>	Brazil, Alagoas, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE155-17	UFRN1086	<i>Cichlasoma sanctifranciscense</i>	Brazil, Alagoas, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
RENA009-16	CARA 32R/CZMA	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Maranhao, Nordeste
RENA010-16	CARA 35	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Maranhao, Nordeste
GBGCA6681-15	KF938522	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
GBGCA6691-15	KF938532/SFR45	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil
MNCE129-17	UFRN938	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Ceara, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE135-17	UFRN1013	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Ceara, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE138-17	UFRN1162	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Ceara, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE142-17	UFRN667	<i>Cichlasoma orientale</i>	Brazil, Paraiba, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
MNCE150-17	UFRN1085	<i>Cichlasoma sanctifranciscense</i>	Brazil, Alagoas, Mid-Northeastern Caatinga ecoregion
PDCAP182-14	PDapt01	<i>Cichlasoma paranaense</i>	Brazil, Parana, Upper Parana River Basin
FUPR1204-10	LBPV-19752	<i>Laetacara araguaiae</i>	Brazil, Mato Grosso do Sul, Upper Parana Basin
FUPR1205-10	LBPV-19753	<i>Laetacara araguaiae</i>	Brazil, Mato Grosso do Sul, Upper Parana Basin
FUPR1213-10	LBPV-24778	<i>Laetacara araguaiae</i>	Brazil, Mato Grosso do Sul, Upper Parana Basin
FUPR1214-10	LBPV-24779	<i>Laetacara araguaiae</i>	Brazil, Mato Grosso do Sul, Upper Parana Basin
FUPR1215-10	LBPV-25861	<i>Laetacara araguaiae</i>	Brazil, Mato Grosso do Sul, Upper Parana Basin
FUPR1248-10	LBPV-32098	<i>Laetacara araguaiae</i>	Brazil, Mato Grosso do Sul, Upper Parana Basin
ANGBF7529-12	GU817291	<i>Aequidens diadema</i>	Brazil, Parana, Upper Parana Basin
GBGC7451-09	EU888037	<i>Aequidens tetramerus</i>	

ITAPE309-15	ENBIMOL-091101-125	<i>Aequidens tetramerus</i>	Brazil, Maranhao, Nordeste
ITAPE310-15	GENBIMOL-091101-111	<i>Aequidens tetramerus</i>	Brazil, Maranhao, Nordeste
ITAPE311-15	GENBIMOL-091101-004	<i>Aequidens tetramerus</i>	Brazil, Maranhao, Nordeste
ITAPE312-15	GENBIMOL-091101-280	<i>Aequidens tetramerus</i>	Brazil, Maranhao, Nordeste
RENA019-16	CARA 12	<i>Aequidens tetramerus</i>	Brazil, Maranhao, Nordeste
RENA020-16	CARA 24	<i>Aequidens tetramerus</i>	Brazil, Maranhao, Nordeste
RENA021-16	CARA 28R/CZMA	<i>Aequidens tetramerus</i>	Brazil, Maranhao, Nordeste
BIFB103-13	MZB-BIF00128	<i>Andinoacara rivulatus</i>	Indonesia, Jawa Barat, West Java
BIFB104-13	MZB-BIF00129	<i>Andinoacara rivulatus</i>	Indonesia, Jawa Barat, West Java
GBGC7449-09	EU888042	<i>Andinoacara rivulatus</i>	
GBGC7450-09	EU888039	<i>Andinoacara pulcher</i>	
GBGCA11599-15	KJ669374	<i>Andinoacara pulcher</i>	Australia, Aquarium Trade
IOFBI009-11	OM 6	<i>Andinoacara rivulatus</i>	India, Maharashtra, Mumbai
IOFBI109-11	OM 118	<i>Andinoacara rivulatus</i>	India, Maharashtra, Mumbai
FUPR1249-10	LBPV-32099	<i>Laetacara araguaiae</i>	Brazil, Parana, Upper Parana Basin
FUPR1252-10	LBPV-3221	<i>Laetacara araguaiae</i>	Brazil, Parana, Upper Parana Basin
GBGC7446-09	EU888052	<i>Laetacara thayeri</i>	
GBMIN126563-17	KY454452	<i>Andinoacara latifrons</i>	Colombia

Sequencias CZUT-IC (Coleção zoológica da Universidade do Tolima-Ictiologia)

Número	Seq-code	Family	Basin	Hydrogeographic regions
11258	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Desague la española	Magdalena
167	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Quebrada Lomas Aisladas	Caribe
181	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Quebrada Lomas Aisladas	Caribe
203	CZUT-IC-TE	Cichlidae	R. Sinu-Isla Blanca-01	Cordoba
205	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Arroyo Pechelin	Sucre
235	CZUT-IC-TE	Cichlidae	R. Sinu-Isla Blanca-01	Cordoba
272	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Río León	Caribe
506	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Carmen de Apicala, Humedal Gavilan	Tolima
507	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Carmen de Apicala, Humedal Gavilan	Tolima
508	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Carmen de Apicala, Humedal Gavilan	Tolima
545	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Río Cañas	Caribe
600	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Río Piedras	Caribe
606	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Río Piedras	Caribe
662	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Río Anchique	Magdalena
70	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Nte Santander-Tibu	Rio Sardinata-Rio Zulia-Catatumbo
702	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Río Anchique	Magdalena
L1	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
L10	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
L11	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca

L12	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
L4	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
L7	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
L8	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
LGT23	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Quebrada NN-Tabrio	Valle del Cauca

Secuencias amplificadas do gene Rag1 (Recombinating activating gene 1)

Voucher	Código	Seq-code	Family	Basin	Hydrogeographic regions
	755	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Quebrada Batatas	Magdalena
	702	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Río Anchique	Magdalena
	11258	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Desague la española	Magdalena
	662	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Río Anchique	Magdalena
17045	L1	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
	550	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Río Cañas	Caribe
	LGT23	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Quebrada NN-Tabrio	Valle del Cauca
15787	506	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Carmen de Apicala, Humedal Gavilan	Tolima
15787	508	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Carmen de Apicala, Humedal Gavilan	Tolima
17045	L10	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
17045	L7	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
15787	507	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Humedal Gavilan	Tolima
17045	L11	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
17045	L12	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
11717	167	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Quebrada Lomas Aisladas	Caribe
11730	180	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Quebrada Lomas Aisladas	Caribe
11730	181	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Quebrada Lomas Aisladas	Caribe
17045	L8	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca
	203	CZUT-IC-TE	Cichlidae	R. Sinu-Isla Blanca-01	Cordoba
17045	L4	CZUT-IC-TE	Cichlidae	Rio La Vieja, Piedra de Moler	Valle del Cauca