

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Diversidad Crítica y Relaciones Filogenéticas de la Familia Characidae  
(Ostariophysi: Characiformes) en el Yasuní, Ecuador**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias  
Biológicas**

**DANIEL ESCOBAR CAMACHO**

**Quito, 2013**

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Daniel Escobar Camacho ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Santiago R. Ron

Director de la Disertación

Abril, 2013

A mi madre, por su apoyo y amor incondicional

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia por haberme brindado su confianza durante toda mi carrera y en la vida.

Al Dr. Santiago Ron quien decidió apoyar este trabajo y supo dirigirme, guiarme y aconsejarme durante todo el desarrollo del mismo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Karen Carleton de la Universidad Estatal de Maryland quien financió parcialmente esta investigación.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en particular a Herpetología por permitirme usar las instalaciones para los diversos análisis. El trabajo de laboratorio tuvo apoyo del proyecto PUCE PIC 08-0470 “Inventario y caracterización genética y morfológica de la diversidad de reptiles, aves y anfibios de los Andes del Ecuador”, financiado por la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología del Ecuador, SENESCYT y por proyectos financiados por la Dirección General Académica de la PUCE dirigidos por Santiago R. Ron.

De igual manera al Museo de Mastozoología de la PUCE por siempre abrirme las puertas de sus instalaciones.

Al Dr. Ramiro Barriga por su asesoramiento y guía en el trabajo museológico en la identificación de especímenes y por su cooperación en este proyecto. Por su ayuda con el trabajo de campo agradezco enormemente a Diego Ortiz, Carlos Ortiz y Natalia Andrade. Así mismo, un agradecimiento enorme a todas las personas del QCAZ que colaboraron conmigo durante este proceso: Teresa Camacho-Badani, Andrea Manzano, Diana Pazmiño, Simón Lobos, Marcel Caminer, Daniela Pareja, Francy Mora, Paloma Lima y Daniel Rivadeneira.

Finalmente a todos mis irremplazables amigos biólogos que siempre han estado dispuestos a ayudarme.

## TABLA DE CONTENIDOS

1.RESUMEN .....	1
2.ABSTRACT .....	3
3. INTRODUCCIÓN .....	5
3.1 ICTIOLOGÍA EN LA AMAZONÍA.....	5
3.2 LOS CHARACIFORMES.....	6
3.3 CHARACIDAE.....	7
3.3.1 SISTEMÁTICA DE CHARACIDAE .....	7
3.4 MARCADORES GENÉTICOS, DIVERSIDAD CRÍPTICA Y CÓDIGO DE BARRAS.....	9
3.5 OBJETIVOS .....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
4.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	13
4.2 TRABAJO DE CAMPO.....	13
4.3 LABORATORIO .....	14
4.3.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	14
4.3.2 EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN .....	15
4.4 ANÁLISIS FILOGNÉTICOS.....	16
4.4.1 ENSAMBLAJE, EDICIÓN Y ALIENAMIENTO DE SECUENCIAS DE ADN	17
4.4.2 MÁXIMA VEROSIMILITUD .....	17
4.4.3 INFERENCIA BAYESIANA .....	18
4.5 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES.....	19

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
5.1 RELACIONES FILOGENÉTICAS.....	20
5.2 DIVERSIDAD CRÍPTICA.....	26
5.3 CONCLUSIONES.....	33
6. LITERATURA CITADA.....	34
7. FIGURAS .....	48
8. TABLAS.....	59
9. ANEXOS .....	85

## LISTA DE FIGURAS

1. Localidades de colección. ....	49
2. Árboles consenso del gen 16S de characidae bajo el modelo de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud.....	50
3. Familias de Characiformes y Subfamilias de Characidae bajo el criterio de Inferencia Bayesiana.....	51
4. Filograma resultante del fragmento del gen 16S del análisis bayesiano.....	52
5. Filograma resultante del fragmento del gen 16S del análisis de máxima verosimilitud .....	55
6. Fotografía de las Especies Candidatas Confirmadas.....	58

## LISTA DE TABLAS

1. Coordenadas de localidades .....	60
2. Regiones de ADN y cebadores utilizados .....	61
3. Lista de especímenes empleados en el estudio.....	62
4. Modelos de evolución seleccionados .....	78
5. Distancias genéticas del gen 16S de <i>Thoracocharax</i> y <i>Gasteropelecus</i> .....	79
6. Distancias genéticas del gen 16S entre los peces del género <i>Triportheus</i> .....	80
7. Distancias genéticas del gen 16S entre los tetras de <i>Paragoniates alburnus</i> .....	81
8. Distancias genéticas del gen 16S entre los tetras <i>Aphyocharax</i> .....	82
9. Distancias genéticas del gen 16S entre las sardinitas <i>Moenkhausia</i> .....	83
10. Distancias genéticas del gen 16S entre los tetras americanos <i>Astyanacinus</i> .....	84

## LISTA DE ANEXOS

1. Protocolo de extracción de ADN usando Tiocinato de Guanidina .....	86
2. Protocolo de visualización en geles de agarosa .....	89
3. Resultados del factor bayesiano.....	91

## 1. RESUMEN

Characidae es una familia de peces neotropicales perteneciente al orden Characiformes. Esta familia ha sido analizada durante las últimas décadas en base a caracteres morfológicos y genéticos. Characidae se caracteriza por su gran riqueza de especies y por tener relaciones filogenéticas complejas y presumiblemente alta diversidad críptica. En este trabajo se realizó un análisis filogenético de especies de carácidos colectadas en el Parque Nacional Yasuní, provincia de Orellana, Ecuador, para identificar posibles linajes de especies nuevas y contribuir al entendimiento de sus relaciones filogenéticas. Se amplificó un fragmento (~600 pb) del gen mitocondrial 16S. Las secuencias de ADN obtenidas junto con secuencias de Characidae provenientes del GenBank fueron analizadas bajo los criterios filogenéticos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. En base a la información genética se identificó especies nuevas candidatas que fueron analizadas morfológicamente para, de ser posible, confirmar su estatus taxonómico. Los análisis filogenéticos muestran que Characidae es parafilética. Entre las subfamilias en Characidae se revelaron seis especies candidatas confirmadas para los géneros *Aphyocharax*, *Moenkhausia*, *Paragoniates*, *Thoracocharax*, y tres especies candidatas no confirmadas (*Astyanacinus*, *Gasteropelecus*, *Triportheus*). Las especies candidatas poseen una distancia genética significativa y seis presentan diferencias morfológicas, confirmando la importancia de la aplicación de técnicas moleculares para detectar diversidad críptica en regiones con alta riqueza de especies.

**Palabras clave:** Characidae, código de barras genético, diversidad críptica, filogenética, Yasuní.

## 2. ABSTRACT

Characidae is a neotropical family of freshwater fishes in the order Characiformes. This family has been analyzed during the last decades based on genetic and morphological characters. Characidae is characterized by a broad species richness and for its complex phylogenetic relationships and a presumably high cryptic diversity. In this work a phylogenetic analysis was made with characids species sampled at Yasuni National Park, Orellana Province, Ecuador, in order to identify possible lineages of new species and contribute to the understanding of its phylogenetic relationships. A fragment (~600 pb) of the 16S mitochondrial gene was amplified. The DNA sequences obtained together with sequences of Characidae from GenBank were analyzed under the phylogenetic criteria of Maximum Likelihood and Bayesian Inference. Based on the genetic information new candidate species were identified which were also morphologically inspected to further evaluate its taxonomic status. The phylogenetic analysis shows that Characidae is paraphyletic. Within the subfamilies of Characidae six confirmed candidate species were revealed for the genera *Aphyocharax*, *Moenkhausia*, *Paragoniates*, *Thoracocharax*, and three unconfirmed candidate species for *Astyanacinus*, *Gasteropelecus*, *Triportheus*. The candidate species exhibit significant genetic distances and six present morphological differences, confirming the importance of the application of molecular techniques for detecting cryptic diversity in regions with high species richness.

**Keywords:** Characidae, genetic barcoding, cryptic diversity, phylogenetics, Yasuni.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 ICTIOLOGÍA EN LA AMAZONÍA

El Neotrópico abarca una de las mayores concentraciones de diversidad en el planeta. En esta región varios grupos de plantas y animales alcanzan su más alta riqueza. Un grupo particularmente diverso es el de los peces, con más de 5,600 especies, representando a la mayoría de peces de agua dulce en el mundo y tal vez el 10% de todas las especies de vertebrados (Albert *et al.*, 2011). Esta gran abundancia de especies sería producto de la alta especialización de sus nichos ecológicos y la especiación por aislamiento geográfico (Albert *et al.*, 2011).

En la región Amazónica del Ecuador la cuenca hidrográfica del Río Napo tiene una gran riqueza de especies junto con un endemismo excepcional, por lo que debería ser considerada un área prioritaria para la conservación (Barriga, 1991). En esta región se han reportado más de 600 especies de peces (Barriga 2012), y se estima que este número es mayor debido a la falta de muestreo, especies crípticas y especies migratorias (Barriga, 1991; Ibarra y Stewart, 1989; Galacatos *et al.*, 1996; Galacatos *et al.*, 2004).

Estudios ecológicos realizados en la cuenca hidrográfica del Napo concluyen que en la Amazonía existe la dominancia de ciertos grupos en hábitats específicos, como los carácidos en playas superficiales o los siluros en aguas profundas y turbias (Stewart, *et al.*, 2002). Estudios de impacto ambiental realizados en este sistema fluvial por Bojsen y Barriga, (2002) sugieren que la diversidad de estos organismos no

solo se ve afectada por la deforestación, sino también por otros factores como la cobertura vegetal y el tamaño de área donde viven. Por último, se sabe que los ensambles de peces del Parque Nacional Yasuní varían de acuerdo a la estación del año, por lo tanto, los patrones de diversidad y abundancia están estrechamente relacionados con las lluvias y sequías (Galacatos *et al.*, 2004).

### **3.2 LOS CHARACIFORMES**

En la Amazonía uno de los órdenes dominantes en abundancia de especies es el de los Characiformes. Los Characiformes son uno de los mayores componentes de la ictiofauna de agua dulce en el mundo con aproximadamente 2.000 especies formalmente descritas que provienen de cientos de drenajes en el Nuevo Mundo y África (Nelson, 2006; Reis *et al.*, 2003). Los componentes africanos del orden incluyen aproximadamente unas 220 especies reconocidas mientras que en el Nuevo Mundo están reconocidas más de 1.700 especies. Habitan un rango de ecosistemas que se extienden desde ríos de rápido flujo y riachuelos andinos al pie de montañas, hasta aguas lénticas de tierras bajas en América y África. Dentro de estos hábitats los Characiformes presentan varias especies miniatura y diminutas (Mirande, 2009; Weitzman y Vari, 1988).

Los Characiformes africanos están conformados por cuatro familias, Alestidae, Citharinidae, Distichodontidae y Hepsetidae; mientras que en el Nuevo Mundo hay 14 familias (Acestrorhynchidae, Anostomidae, Characidae, Chilodontidae, Crenuchidae, Ctenoluciidae, Curimatidae, Cynodontidae, Erythrinidae, Gasteropelecidae, Hemiodontidae, Lebiasinidae, Parodontidae,

Prochilodontidae) y Serrasalminidae (pirañas y pacus) que es incluida por algunos autores (Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011).

### **3.3 CHARACIDAE**

La familia Characidae es la más diversa y con más problemas taxonómicos del orden. Es la cuarta familia más especiosa del mundo después de Cyprinidae, Cichlidae y Gobiidae; y es la más especiosa en el Neotrópico con alrededor 1,100 especies, representando un 58% de las especies del orden. También, es un taxón activo en cuanto a descripción de nuevas especies ya que en los últimos 10 años se han descrito más de 250 especies (Oliveira *et al.*, 2011; Mirande, 2010; Mirande, 2009; Eschmeyer y Fong, 2009).

Characidae se caracteriza por tener una aleta anal larga, el hueso maxilar no muy pequeño y dentado, y la aleta dorsal con 10 a -13 radios (Gery, 1977). Su distribución es amplia encontrándose desde Texas en EEUU, hasta el norte de la Patagonia en Argentina, siendo especialmente diversos en la Cuenca del Amazonas, Orinoco y Río de La Plata. A muchos peces de esta familia se los conoce comúnmente como “tetras” (Mirande, 2010; Nelson, 2006); en el Ecuador se los conoce como “sardinias” o “sardinitas” (Barriga, 1991).

#### **3.3.1 SISTEMÁTICA DE CHARACIDAE**

La composición y relaciones evolutivas de Characidae todavía están lejos de ser entendidas adecuadamente. La familia carece de sinapomorfías conocidas y su clasificación ha sido inestable (Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011).

La sistemática de Characidae en el pasado fue definida por combinaciones de estados alternativos de 17 caracteres. Esta definición fue seguida por Greenwood *et al.* (1966) y Géry, (1977) (Mirande, 2009). Rosen, (1972) y posteriormente Weitzman y Fink, (1983), resaltaron por primera vez la importancia de la filogenia para definir la taxonomía de la familia. Muchos de los carácidos son morfológicamente conservados y las fuentes de variación importantes están relacionadas a la dieta y eventos de miniaturización que a menudo resultan en caracteres altamente homoplásicos. Las homoplasias impiden inferir las relaciones filogenéticas dentro del grupo en base a morfología (Weitzman y Fink, 1983; Weitzman y Vari, 1988). Durante la última década, varios estudios morfológicos (Reis *et al.*, 2003; Malabarba y Weitzman, 2003; Mirande, 2009; Mirande, 2010) y moleculares (Ortí y Meyer, 1997; Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011) han contribuido a dilucidar las relaciones filogenéticas en la familia.

Recientemente Oliveira *et al.* (2011), evidenció por primera vez la monofilia de Characidae. No obstante, muchas de las relaciones evolutivas entre las subfamilias y géneros considerados como *incertae sedis* están por resolverse por lo que son necesarios estudios que incluyan más especies, sobre todo de géneros especiosos y que hasta la actualidad presentan una naturaleza polifilética como *Astyanax*, *Hyphessobrycon*, *Hemigrammus*, *Jupiaba* y *Moenkhausia*.

Por los aspectos antes mencionados, las especies de Characidae frecuentemente son difíciles de identificar. La existencia de taxa crípticos, la variación ontogenética de la morfología y el dimorfismo sexual hacen que sea necesaria mucha experiencia para identificar especies (Hebert *et al.*, 2003).

### 3.4 MARCADORES GENÉTICOS, DIVERSIDAD CRÍPTICA Y CÓDIGO DE BARRAS

Las limitaciones en la identificación en base a caracteres morfológicos crea la necesidad de acercarse al reconocimiento de especies por medio de caracteres genéticos. Estas herramientas son eficaces para estimar la variación dentro de las poblaciones y especies para así probar diferentes hipótesis taxonómicas. Los caracteres genéticos son universales y tienen la ventaja de evidenciar la base genética de la variación (Desmond, 2008; Eguiarte *et al.*, 2007).

Dentro de los marcadores genéticos se encuentran los genes mitocondriales. Estos genes carecen de intrones, tienen exposición limitada a la recombinación por lo que sus tiempos de coalescencia son menores debido a la condición haploide del genoma mitocondrial (Hebert *et al.*, 2003; Mueller, 2006). El gen mitocondrial 16S rRNA ha sido utilizado en estudios filogenéticos sobre Characidae donde ha contribuido positivamente en el análisis evolutivo de esta familia (Ortí y Meyer, 1997; Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). Los estudios usando este gen son convenientes ya que conserva información filogenética y tiene una alta tasa de evolución, haciéndolo útil en la discriminación de especies. (Ortí y Meyer, 1997).

Las especies crípticas son dos o más especies que erróneamente han sido clasificadas bajo el nombre de una sola especie por su similitud morfológica. Las especies crípticas pueden ser un obstáculo a la hora de estimar la biodiversidad, lo cual a su vez puede dificultar la implementación de estudios ecológicos y evolutivos. Por otra parte, las especies crípticas presentan interrogantes

evolutivas como la persistencia de la similaridad fenotípica o los mecanismos de estasis o convergencia que favorecen esa similitud morfológica (Piggott *et al.*, 2011; Bickford, *et al.*, 2007). Generalmente, las especies crípticas son superficialmente indistinguibles en cuanto a su morfología. Se cree que la selva tropical es uno de los ecosistemas donde la especiación críptica es mayor debido a la riqueza de hábitats y porque muchos de los organismos que habitan este ecosistema tienen interacciones interespecíficas especializadas (Bickford *et al.*, 2007). El estudio de especies crípticas puede ser valioso para el manejo de la conservación y para análisis evolutivos sobre los mecanismos de especiación de diferentes organismos, incluyendo a los peces de la Amazonía. Además, se cree que la diversidad críptica en las selvas tropicales presenta una gran riqueza (Bickford *et al.*, 2007; Hebert *et al.*, 2003); donde la especiación de peces pequeños está relacionada a su limitada dispersión (Castro, 1999) y su ictiofauna está ampliamente subestimada (Piggott *et al.*, 2011).

Durante los últimos años, la propuesta sobre el “Código de barras” del ADN o “Barcoding” ha ido creciendo y siendo aceptada por el mundo científico. La idea principal se basa en utilizar un sistema que emplea secuencias genómicas para identificar a los organismos. Se lo denomina código de barras del ADN haciendo una analogía al uso de códigos de barras de productos vendidos en un supermercado (Hebert *et al.*, 2003). El “Código de barras” del ADN es una herramienta importante en cuanto a la detección de diversidad críptica. La ventaja del código de barras es que usa secuencias de una misma región génica existente en grupo de taxa (Hebert *et al.*, 2003). Por lo tanto, el código de barras busca usar secuencias cortas ADN (~600 pb) para la identificación estandarizada

de especies. Este estudio es exploratorio y busca descubrir especies “candidatas” no descritas. A menudo el “código de barras” utiliza el gen mitocondrial CO1, pero otro locus usado para este propósito es el gen mitocondrial 16S (Vences., *et al.*; 2005; Teletchea, 2009). Además, se ha visto que en Characidae el gen COI no es tan efectivo a la hora de discriminar entre especies (Valdez-Moreno *et al.*, 2009, Carvalho *et al.*, 2011). Al momento en que este estudio empezó existían pocas secuencias de COI de carácidos en GenBank por lo que se decidió usar el gen 16S.

Aunque el código de barras si proporciona información filogenética a cierto nivel, el principal objetivo de esta metodología es acelerar el proceso de identificación de especies; mas no esclarecer relaciones evolutivas muy profundas, ya que para ello se necesita un mayor número de terminales y de genes (Hebert *et al.*, 2003; Mueller, 2006; Hajibabaei *et al.*, 2007). Por consiguiente, el código de barras del ADN es una herramienta importante que puede diagnosticar posibles nuevas especies y dar valiosa información sobre el grupo de estudio.

A pesar de que el Ecuador presenta una gran diversidad en cuanto a carácidos (Barriga, 2012); no se han realizado estudios que usen marcadores genéticos para detectar la existencia de especies crípticas o para conocer las relaciones evolutivas de Characidae en nuestra región. El análisis de la filogenia de Characidae junto con el posible descubrimiento de especies crípticas puede ser un aporte importante para el uso, manejo y conservación de la ictiofauna del Ecuador ya que la precisión en la identificación de especies es esencial para implementar programas de manejo y conservación.

### 3.5 OBJETIVOS

- (1) Caracterizar las especies de Characidae por medio de análisis moleculares usando el gen mitocondrial 16S.
- (2) Identificar, especies candidatas, si las hubiera.
- (3) Contribuir al entendimiento de las relaciones filogenéticas de los carácidos incluyendo del Parque Nacional Yasuní.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 ÁREA DE ESTUDIO**

El estudio se realizó en las inmediaciones y localidades cercanas de la Estación Científica Yasuní (ECY) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. La ECY se encuentra en la provincia de Orellana, en la ribera oriental del Río Tiputini medio, con las coordenadas  $0^{\circ} 40' 27.732''$  S;  $-76^{\circ} 23' 49,3794''$  O y un rango altitudinal entre los 210 y 310 msnm. La ECY está localizada dentro del Parque Nacional Yasuní y cerca de la Reserva Étnica Waorani (Quendez, 2010).

Se realizaron colecciones de especímenes de carácidos en dos ríos y lagunas cercanas a la ECY, y también se colectó en tres puntos diferentes en orillas y playas del río Tiputini (Tabla 1). Los sistemas hidrográficos en la zona son de aguas blancas y negras. El cauce del Río Tiputini es serpenteante y su nivel de agua varía en forma brusca, de acuerdo a la intensidad de las lluvias presentes en sus cabeceras hidrográficas. Debido al arrastre de sedimentos, se forman barreras ocasionando cambios de curso del río que forman lagunas aisladas en el cause antiguo (Barriga, 2011).

### **4.2 TRABAJO DE CAMPO**

El muestreo de peces se realizó durante el día y principalmente en la noche. Los peces fueron colectados mediante redes de agallas de 20 m de largo por 2 m de alto y 3 cm de diámetro que fueron usadas en las lagunas y en las bocas de ríos pequeños. Las atarrayas de 1.5 m de diámetro fueron utilizadas en

las playas de ríos y lagunas libres de troncos. Las trampas con carnada fueron colocadas a las orillas de lagunas y en pozas. Se usaron también líneas de anzuelo de diferentes tamaños. Para muestrear en riachuelos se utilizaron pequeñas redes de mano.

Luego de la captura, los peces fueron trasladados a la ECY donde a cada espécimen se le asignó un número de campo, se le tomaron fotografías, se le extrajo tejido muscular y se lo preservó en etanol al 75% en frascos de vidrio. El tejido se preservó en etanol al 95% en viales a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente en la PUCE-Quito, se los mantuvo a  $-80^{\circ}\text{C}$  en la ultracongeladora. Los especímenes y tejidos están depositados en la colección de ictiología del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (acrónimo QCAZ).

### **4.3 LABORATORIO**

#### **4.3.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA**

En el Museo de Zoología de la PUCE se asignó un número QCAZ a los especímenes colectados. Para la identificación y clasificación de las especies colectadas se utilizó principalmente la clave sobre los Characiformes de Gery, 1977. También se inspeccionaron los individuos junto con el asesoramiento del Dr. Ramiro Barriga en la colección de peces del Instituto de Ciencias Biológicas de la Escuela Politécnica Nacional (EPN). Para inspeccionar los especímenes se utilizó un estéreo microscopio ZEISS, modelo Stemi 1000, donde se tomaron datos de número de escamas en la línea lateral, presencia o ausencia y número de dientes en la segunda fila del premaxilar y maxilar, posición de la boca, lugar de origen de la aleta dorsal, presencia o ausencia de quilla, número de radios en

las aletas anal, dorsal, pectoral y pélvicas, presencia o ausencia de manchas humerales, pedunculares, caudales y dorsales, número de escamas bajo y sobre la línea lateral, número de arcos branquiales, y presencia o ausencia y número de suborbitales. Con un calibrador digital MITUTOYO, modelo 505-645-50, se tomó medidas de la longitud total y largo estándar, longitud de cabeza, diámetro del ojo, espacio interorbital, longitud del hocico, ancho del premaxilar y profundidad del cuerpo.

Como referencia para las identificaciones, se tomó en cuenta las listas de especies que habitan en la Amazonía Ecuatoriana (Barriga, 1991; Barriga, 1994; Barriga, 2011) y la literatura más reciente para los diferentes grupos examinados (Torres-Mejía, 2012; Malabarba, 2004; Menezes, 2007; Benine *et al.*, 2004).

#### **4.3.2 EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN**

El ADN fue extraído a partir de tejidos de músculo preservados en etanol al 95%. Se empleó el protocolo de fenol-cloroformo de M. Fujita (no publicado) con modificaciones realizadas por M. E. Ordoñez y posteriormente por D. Escobar (Anexo 1). Se cuantificó la cantidad de ADN en la extracción con un Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc). A partir del ADN extraído se realizó la amplificación del fragmento del gen mitocondrial 16S de rRNA (16S). Las amplificaciones se realizaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones se realizaron con un volumen final de 25µl (2.5µl de Buffer PCR 5X, 1.5µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.5µl de cada primer 10µM, 0.5µl de dNTPs 10mM, 0.25 µl de Taq polimerasa, 1 unidad de ADN y 18.25µl de H<sub>2</sub>O). El protocolo de amplificación consistió de las siguientes condiciones:

desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30 s y 72°C por 1 min, con una extensión final de 72°C por 7 min. Para el proceso anteriormente mencionado se emplearon los cebadores descritos en la Tabla 2, y estandarizados previamente en el laboratorio de Biología Molecular de la sección de Herpetología del QCAZ. Para visualizar los productos de PCR se emplearon geles de agarosa al 1% (Anexo 2). El kit de purificación ExoSap-IT (GE healthcare) se utilizó para eliminar los residuos de cebadores y dNTPs no incorporados previa a la secuenciación de los productos amplificados. La secuenciación se llevó a cabo en la empresa Macrogen en Corea (Macrogen Inc., Seúl, Korea). Las extracciones de ADN fueron depositadas en el banco de genoma del Museo QCAZ.

#### **4.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS**

Se utilizaron 54 secuencias de carácidos del Yasuní y 178 secuencias del GenBank para del gen 16S (Tabla 3). Los análisis filogenéticos fueron realizados bajo el criterio de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. Los modelos de evolución fueron seleccionados en JModelTest v.0.1.1. (Posada, 2008) (Tabla 4). Como grupos externos y en base a filogenias recientes (Oliveira *et al.*, 2011; Javonillo *et al.*, 2010) se escogió a representantes de familias del mismo orden (Alestidae, Anostomidae, Chilodontidae, Citharinidae, Crenuchidae, Ctenoluciidae, Curimatidae, Cynodontidae, Distichodontidae, Erythrinidae, Gasteropelecidae, Hemiodontidae, Hepsetidae, Lebiasinidae, Parodontidae, Prochilodontidae, Serrasalminidae) y al ciprínido *Carassius auratus* (Goldfish) como grupo externo.

#### **4.4.1 ENSAMBLAJE, EDICIÓN Y ALIENAMIENTO DE SECUENCIAS DE ADN**

Las secuencias obtenidas con ambos cebadores (derecha y reversa) para cada muestra, fueron editadas en Geneious Pro 5.3.4 eliminando los extremos con mala resolución y corrigiendo manualmente cualquier incongruencia con la finalidad de ensamblar las secuencias y generar una secuencia consenso de cada espécimen (Drummond *et al.*, 2010). Posteriormente, se agregó al análisis 178 secuencias de Characidae disponibles en GenBank (Tabla 4) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y se procedió a su alineación con la aplicación MAFFT Multiple Alignment (Kato *et al.*, 2002) con el algoritmo automático, que fue el adecuado de acuerdo al tamaño de la muestra, y Geneious Pro 5.3.4 (Drummond *et al.*, 2010). El ajuste manual de las secuencias se realizó en el programa Mesquite 2.74 (Maddison y Maddison. 2010).

#### **4.4.2 MÁXIMA VEROSIMILITUD**

La Máxima Verosimilitud es un criterio de optimalidad que infiere la distribución de la verosimilitud de que una matriz de secuencias haya sido el producto de la evolución bajo un set de parámetros evolutivos entre los que se cuenta una filogenia. La topología del árbol aceptada es la que genera la mayor verosimilitud. Los árboles de máxima verosimilitud fueron estimados con el programa GARLI v.2.0 (Zwickl, 2006). Se realizaron dos particiones: “tallos” (stems) y “lazos” (loops) en el gen 16S, para las cuales se asignaron dos modelos de sustitución estimados en JModeltest. Para los loops y stems se asignó el modelo de tiempo reversible general (GTR + I + G). Se realizaron 22 análisis independientes para asegurar que la zona de optimalidad encontrada era la máxima verosimilitud en el espacio paramétrico global. Se realizó un bootstrap no

paramétrico para evaluar el soporte de cada nodo con 100 réplicas (Felsenstein, 1985). El consenso de los árboles fue obtenido en Mesquite 2.74 (Maddison y Maddison, 2010), utilizando la regla mayoritaria del 50%.

#### **4.4.3 INFERENCIA BAYESIANA**

Este análisis se llevó a cabo en el programa MrBayes v.3.2.1 (Huelsenbeck *et al.*, 2008). Las secuencias, como en Máxima Verosimilitud, fueron divididas en dos particiones que fueron analizadas con los mismos modelos de sustitución. Se realizaron dos búsquedas bayesianas independientes mediante el algoritmo de la cadena Markov de Monte Carlo con cuatro cadenas por búsqueda y 20.000.000 de generaciones. Se evaluaron las estrategias sin particiones y con particiones mediante el factor bayesiano (Anexo 3). El valor de factor bayesiano es el ratio de probabilidades de un modelo comparado con otro, estas probabilidades pueden ser estimadas por el cálculo de la media armónica de las probabilidades posteriores de las cadenas convergentes (Castañeda y de Queiroz, 2011), esta estimación logarítmica se obtuvo mediante el programa TRACER V1.3 (Rambaut y Drummond, 2007) donde valores superiores a 10 significan un fuerte soporte. La convergencia de las cadenas así mismo fue verificada con el programa TRACER v1.3 donde se tomó en cuenta que el tamaño efectivo de la muestra (ESS) sea mayor a 200. Las primeras 2.000.000 generaciones fueron descartadas como *burnin*.

#### 4.5 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES CANDIDATAS

Se usó los criterios de Vieites *et al.* 2009 y Padial *et al.* 2010 para identificar especies candidatas no confirmadas (ECN) y especies candidatas confirmadas (ECC). ECC son aquellos especímenes o poblaciones con diferenciación genética detectable en concordancia también con diferencias en un carácter que media la reproducción o que es un carácter morfológico diagnóstico para el respectivo grupo, mientras que a las ECN presentan una diferenciación genética pero los datos son deficientes en cuanto a morfología, ecología y distribución. Finalmente, los linajes profundos conespecíficos (LPC) son casos en los que la diferenciación genética se encuentra sobre el umbral del valor típico entre especies cercanamente relacionadas y además no se muestran diferencias morfológicas en las poblaciones, o en caracteres de aislamiento pre-reproductivo.

Se identificó a las ECC en base a sus distancias genéticas asumiendo que diferencias mayores al 3% sugiere diferenciación entre especies; y la topología de los árboles filogenéticos, y diferenciación morfológica. En las ECN se examinó caracteres morfológicos no variables de relevancia taxonómica para cada grupo. Patrones de variación congruentes entre varios sets de caracteres, sean moleculares, morfológicos, ecológicos o de distribución fueron considerados evidencia para asignar a una especie a la categoría de ECC. La ausencia de congruencia fue considerada una indicación de que los grupos comparados eran LPC.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 RELACIONES FILOGENÉTICAS

En este trabajo se analizó un fragmento del gen 16S para identificar posibles linajes nuevos entre los carácidos del Yasuní. También se contribuyó al entendimiento de sus relaciones evolutivas. Los resultados muestran que Characidae es parafilética. Se obtuvieron 54 secuencias de individuos de Characidae en 7 localidades del Parque Nacional Yasuní para el gen 16S (~600 pb) (Figura 1).

Las filogenias bajo los criterios de máxima verosimilitud (MV) y Bayesiano se muestran en las figuras 4 y 5. El nivel de soporte de los clados es muy variable pero tiende a ser mayor en las ramas más recientes. Muestran algunos puntajes altos indicando un buen desempeño del gen. En varios clados los valores no son significativos indicando algún tipo de señal conflictiva. Según el Factor Bayes el mejor modelo de análisis fue el modelo con dos particiones (Anexo 3). Por defecto, en los análisis de MV también se escogió al árbol resultante del modelo con dos particiones.

La topología general de los árboles de máxima verosimilitud y Bayesiano fue muy similar (Figura 2). Se utilizará los resultados de Inferencia Bayesiana para discutir las relaciones entre los taxa. Por conveniencia, las familias y subfamilias fueron ordenadas similarmente a los resultados de estudios anteriores (Figura 3). Casi todos los carácidos del Yasuní se posicionaron en los clados esperados.

En los Characiformes, las familias Africanas Citharinidae y Distichodontidae forman el grupo hermano del resto de representantes del orden. La mayoría de las familias (africanas y neotropicales) como grupos externos no presentan un buen soporte y forman una politomía. La superfamilia Anostomoidea (Anostomidae, Chilodontidae, Curimatidae, Prochilodontidae) no es monofilética mientras que Serrasalmidae y Parodontidae sí lo son (Figuras 4 y 5). Los linajes anteriormente mencionados forman el grupo externo X (Figuras 2 y 3) en relación a Characidae. Los grupos externos a Characidae obtuvieron bajo soporte probablemente debido al número reducido de secuencias utilizadas en el análisis. La posición de las familias Citharinidae y Distichodontidae como grupos hermanos al resto de las familias en el orden, concuerda con la hipótesis de Vari (1979); y la posición de estos no cambia en la topología de los diferentes árboles analizados. Erythrinidae y Lebiasinidae aunque con bajo soporte, aparecen como grupo hermano de las familias neotropicales, lo cual concuerda con los resultados de Oliveira *et al.* (2011). Cynodontidae no es monofilética ya que si bien *Cynodon gibbus* aparece en los grupos externos, *Roestes* se encuentra cercano a Acestrorhynchidae, corroborando nuevamente la propuesta de Oliveira *et al.* (2011). Las pirañas y pacus (Serrasalmidae) en este estudio forman notablemente un grupo monofilético distinto al resto de grupos a pesar de que faltan muchas especies en el análisis dentro de esta familia. Históricamente este grupo ha sido considerado una subunidad de Characidae pero por su anatomía externa distintiva y su separación filogenética de otros taxa asociados a Characidae se ha llegado a la conclusión de considerar a Serrasalmidae como un grupo diferente a Characidae (Ortí *et al.*, 2008; Gery, 1977; Calcagnotto *et al.*, 2005). Prochilodontidae y Curimatidae son cercanos confirmando la hipótesis de Vari,

1983, pero Anostomidae y Chilodontidae no entran en este patrón. Esto sugiere que estas familias necesitan una revisión sistemática.

Otro set de familias más cercanas a Characidae se encuentran en la sección Y. En ambos análisis *Brycinus carolinae* perteneciente a Alestidae está con abjo soporte inesperadamente posicionado en Y. Las relaciones evolutivas de esta familia Africana son conocidas por acercarse a Hepsetidae (Ortí y Meyer, 1997) o *Chalceus* (Mirande, 2009; Mirande, 2010), sin embargo la posición de *Brycinus carolinae* sugiere una identificación incorrecta de la secuencia o un error en la submisión al GenBank. Chalceidae, con bajo soporte, en el análisis Bayesiano presenta una divergencia basal con el resto de grupos (Figura 4) corroborando la hipótesis de Calcagnotto *et al.* (2005) y confirmando el rango como familia propuesto por Oliveira *et al.* (2011). Los resultados del análisis bayesiano contrastan con los de máxima verosimilitud ya que en éste *Chalceus* se encuentra junto a las familias cercanas a Characidae en Y. No obstante, se sabe que *Chalceus* diverge basalmente de este grupo (Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011); ya que es un linaje monofilético en los ensamblajes de carácidos neotropicales.

Se encontró buen soporte a Gasteropelecidae, Bryconidae, Iguanodectidae y sin soporte a grupos como Acestrorhynchidae y Triportheidae (Figuras 4 y 5). En Bryconidae *Brycon* es parafilético ya que hay politomías entre las especies analizadas y una de ellas está más relacionada a *Henochilus wheatlandi*; se confirma entonces que la familia Bryconidae incluye a Salmininae (Oliveira *et al.*, 2011). Gasteropelecidae (peces hacha) muestra a *Thoracocharax* como parafilético. A este género se lo ha considerado como el linaje que diverge más

tempranamente que los demás géneros (Gery, 1977). Sin embargo, en los resultados de este estudio aparece *Gasteropelecus sternicla* como un linaje basal y *Carnegiella* más cercanamente relacionado a *Thoracocharax*. El género *Thoracocharax* por primera vez es parafilético, por consiguiente, se necesita un análisis más profundo para esta familia. *Gasteropelecus* sp (QCAZ 2855) aparece relacionado a *Thoracocharax stellatus* en lugar de sus especies congénicas.

En Iguanodectidae al secuencia del espécimen de *Piabucus melanostomus* del Yasuní (QCAZ 2644) es igual a la de un individuo de la misma especie de Brasil. Iguanodectidae en los resultados está compuesto, como se esperaba por *Piabucus*, *Iguanodectes* y *Bryconops*.

En Triportheidae el largo de la rama de *Engraulisoma taeniatum* sugiere una tasa de evolución excepcionalmente alta o errores en las secuencias (Figuras 4 y 5). Para esta familia se incluyeron varias especies, pero el análisis bayesiano falló en agruparlas en un grupo monofilético, probablemente por la falta de señal filogenética.

Characidae no es monofilética y se divide en 2 clados (A y B). En el subclado B (Figuras 4 y 5) son monofiléticas las subfamilias Tetragonopterinae y Cheirodontinae. No son monofiléticos Stevardiinae, Glandulocaudinae, Characinae y Aphyocharacinae.

Characinae no forma un clado en el análisis bayesiano. Se posicionaron en Y especies del Yasuní como, *Cynopotamus amazonum* y *Charax caudimaculatus*. Characinae en Y, no forma un grupo monofilético pero sí en los análisis de máxima verosimilitud aunque aparece con bajo soporte. *Cynopotamus*, por otra parte, es polifilético, al igual que en Oliveira *et al.* (2011). La polifilia puede ser

producto de una mala identificación de *Cynopotamus kincaidi* ya que *C. venezuelae* si se agrupa con el espécimen de Ecuador de *C. amazonum*. Las relaciones filogenéticas de Characinae contrastan con la hipótesis de Mattox y Toledo-Piza, (2012) en la cual restringe Characinae a siete géneros que no están estrechamente relacionados en los resultados.

La subfamilia Stevardiinae fue parafilética con respecto a Glandulocaudinae y Aphyocharacinae (Figuras 4 y 5). *Aphyocharax* aparentemente comparte un origen común con *Prionobrama* pero el resto de los integrantes de la subfamilia (*Paragoniates*, *Leptagoniates* y *Xenagoniates*) forman una politomía con Characinae, Cheirodontinae y Tetragonopterinae. Por lo tanto, Aphyocharacinae es parafilética. Recientemente Tagliacollo *et al.* (2012) estableció que Aphyocharacinae alberga dos clados, el primero integrado por *Prionobrama* y *Aphyocharax* y el segundo formado por *Paragoniates*, *Leptagoniates* y *Xenagoniates*; que en los resultados no se muestran estrechamente relacionados, probablemente porque el fragmento usado no posee suficiente señal filogenética.

Cheirodontinae es monofilética, con alto soporte en concordancia con estudios cladísticos (Mirande, 2009; Mirande, 2010) y filogenéticos (Javonillo *et al.*, 2010; Calcagnotto *et al.*, 2005). En el presente estudio no se usaron secuencias de *Spintherobolus* que provoca la parafilia de Cheirodontinae en otros estudios (Oliveira *et al.*, 2011). Finalmente, en el clado B Stevardiinae y Glandulocaudinae presentan una naturaleza polifilética. Aunque se ha establecido la monofilia de Stevardiinae en base a caracteres morfológicos del aparato reproductivo, características espermáticas, (Baicere-Silva *et al.*, 2011). Se necesitan más análisis y secuencias para una mejor resolución.

El subclado A (Figuras 4 y 5) tiene buen soporte y contiene varios géneros considerados *incertae sedis*, es el más rico en especies de la familia y el orden. Incluye géneros especiosos como *Hyphessobrycon*, *Hemigrammus*, *Jupiaba*, *Moenkhausia* y *Astyanax*, los cuales son polifiléticos en el presente estudio, en concordancia con estudios anteriores (Mirande, 2009; Mirande, 2010; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). Cabe recalcar que los géneros polifiléticos del clado A no se encuentran en otros clados. También, se encuentran como se esperaba formas particulares como *Astyanacinus* por su similaridad a *Astyanax* y Stethaprioninae que se caracterizan por un cuerpo profundo. Generalmente, se les ha catalogado a la mayoría de estos grupos como *incertae sedis* (Reis *et al.*, 2003). *Hyphessobrycon copelandi*, presente en Yasuní, forma parte de un clado monofilético, no obstante *H. herbertaxelrodi* aparece cercanamente relacionado a Stethaprioninae. El género *Moenkhausia* es parafilético, y algunos clados con especies colectadas en este estudio (*Moenkhausia lepidura* y *M. oligolepis*) tienen buen soporte. En el presente estudio se presentan por primera vez secuencias de *Moenkhausia grandisquamis*, *M. copei* y *M. cotinho*. En Stethaprioninae, *Gymnocorymbus thayeri* es el grupo hermano de *G. ternetzi* la especie similar de Brasil mientras que en cambio *Brachyhalcinus copei* no está cercanamente relacionado a *Brachyhalcinus nummus* de Ecuador. Stethaprioninae está compuesta por *Brachyhalcinus*, *Stethaprion*, *Orthospinus*, *Poptella* y *Gymnocorymbus* (Reis, 1989; Mirande, 2009; Mirande 2010) pero en los resultados de este estudio no forman un clado y están dispuestos en una politomía en conjunto con otros géneros como *Hyphessobrycon* y *Moenkhausia*. *Hemigrammus unilineatus* coincide con su descripción morfológica, pero no se

agrupa con las demás especies de *Hemigrammus* sino se encuentra relacionado a *Moenkhausia melanogramma*. En cuanto *Astyanax* (tetras americanos), las especies ecuatorianas (*A. maximus* y *A. zonatus*) están en diferentes clados que las del grupo Centroamericano.

Así como varios grupos brindan información sobre sus relaciones filogenéticas, muchos también presentan una topología no resuelta. Existe un poco de discordancia entre los análisis de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Son diferentes en la ubicación de *Chalceus* con respecto a Characidae, la posición de *Phenacogaster* en Characinae, y politomías de Stevardiinae y Cheirodontinae en el árbol de Inferencia Bayesiana. Aunque, en ambos análisis los clados tenían bajo soporte para estas topologías. También, algunas ramas en los árboles son más largas como las de *Engraulisoma* o de *Aphyocharax* y *Prionobrama*. Esto podría explicarse por una alta tasa de evolución o errores en las secuencias de ADN del GenBank.

## 5.2 DIVERSIDAD CRÍPTICA

Se analizaron aproximadamente menos del 50% de especies de Characidae registradas para el Parque Nacional Yasuní, de las cuales muchas no han sido caracterizadas anteriormente a ningún nivel molecular. Mucha de la identificación se vio limitada a nivel morfológico, por lo que de algunos especímenes se conoce muy poco. Se procesaron 35 muestras de especies diferentes en Characidae excluyendo muestras de los grupos externos (X). De

estas muestras, 6 son ECC (Figura 6) y 3 ECN, por lo que se comprueba que los marcadores moleculares son una herramienta valiosa para la identificación de especies y que existe la posibilidad de una gran diversidad críptica en la amazonía ecuatoriana. Las diferencias moleculares y morfológicas dan un mayor soporte a la diferenciación de especies que un análisis basado en un solo tipo de evidencia. Si bien no se analizaron variables ecológicas o comportamentales; la detección de estas especies es apoyada debido a que las características que las separan de sus congéneres son informativas y particulares de cada grupo.

Se utilizó el gen mitocondrial 16S RNA ya que es un gen ampliamente usado en estudios de identificación y discriminación de especies de peces (Teletchea, 2009), ha demostrado ser eficaz en el código de barras y ha sido utilizado en estudios de diversidad críptica (Craig *et al.*, 2009; Lakra *et al.*, 2009; Casciotta *et al.*, 2012). El análisis falla en cuanto a resolver relaciones evolutivas muy profundas; pero nuevamente esto puede estar determinado por la longitud del fragmento, por ser un gen mitocondrial y por el uso de un solo gen. En este estudio se delimitó el umbral de la distancia génica a un 3%, no obstante el umbral puede cambiar en cuanto al estudio de otros grupos (Pereira *et al.*, 2011). Este valor debe ser cuidadosamente evaluado porque existe variación entre diferentes grupos. Los umbrales con valores bajos no necesariamente significan que los diferentes organismos estudiados son una sola entidad biológica. Los valores pueden ser diferentes por que la tasa de evolución puede variar entre diferentes taxa y consecuentemente la acumulación de sustituciones puede variar, ó puede estar relacionado a la edad de las especies, donde las especies evolutivamente “jóvenes” puede que no hayan tenido tiempo suficiente para acumular muchas mutaciones en sus “barcodes” (Pereira *et al.*, 2011).

Las especies crípticas en Characidae no son una novedad (Medrado *et al.*, 2008; Piggott *et al.*, 2011; Ferreira-Neto *et al.*, 2012; Frehner *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011), y su detección puede ser difícil debido a sus caracteres de naturaleza altamente homoplásica. Las especies crípticas también pueden diferenciarse en otras propiedades como las llamadas de apareamiento y señales químicas, o simplemente tienen una apariencia similar debido a que la selección a la que están sujetas mantiene la estasis (Bickford *et al.*, 2007). Sin embargo esa información suele ser difícil de detectar, por lo que muchas veces los métodos moleculares producen un mejor acercamiento para identificar especies crípticas (Piggott *et al.*, 2011).

Gasteropelecidae (peces hacha) alberga sus tres géneros. *Gasteropelecus* sp. (QCAZ 2855) presenta una distancia genética  $p$  no corregida del 7% con respecto a *Gasteropelecus sternicla*, especie a la cual se asemeja morfológicamente, pero no presenta diferencias significativas por lo que se le asignó como una ECN. No se asignó como ECC a *Gasteropelecus* sp. (QCAZ 2855) debido a la falta de especímenes para analizar y por la limitada información que se tiene sobre la sistemática del género. Por otra parte, los especímenes ecuatorianos de *Thoracocharax* sp. (QCAZ 2649—2664) tienen una distancia genética del 8% en cuanto a sus conespecíficos amazónicos, *Thoracocharax stellatus* (Tabla 5) y difieren morfológicamente en el color de la aleta dorsal, caudal, y en el número de escamas que recubren la base de la aleta anal. La especie de *Thoracocharax* colectada presenta color negro en los bordes de la aleta caudal, la mancha de la aleta dorsal se extiende desde la base de la misma hasta la punta; lo que la diferencia de las únicas dos especies del género:

*Thoracocharax stellatus* que posee la mancha en la base y *T. securis*, que solo la posee en la punta (Gery, 1977). Igualmente *T. stellatus* posee de 2 a 3 filas de escamas sobre la base de la aleta anal y *T. securis* tiene 5 o 6 (Gery, 1977), mientras que la especie colectada tiene de 3 a 4. En estudio morfométricos (da Silva *et al.*, 2009) se tomaron medidas anatómicas de diferentes poblaciones de *Thoracocharax* del Orinoco. Estos valores morfométricos se compararon con las medidas de las especies ecuatorianas las cuales presentaron diferencias, confirmando la posibilidad de que las poblaciones ecuatorianas representarían una ECC. Por otra parte el holotipo fue colectado en Perú en el Río Ambyiacu (Fowler, 1907), pero en la descripción no se menciona nada sobre la coloración; por lo tanto las poblaciones de Ecuador pueden ser probablemente ECC o puede representar un grupo de LPC con variación morfológica.

En Triportheidae (Figuras 7 y 9), encontramos a *Triportheus* (pechón), con las dos especies ecuatorianas, *T. albus* (QCAZ 2846—2699) y *T. auritus* (QCAZ 2889). Los especímenes de *T. albus* (QCAZ 2846—2699) se difieren en un 3.9% con *T. albus* del GenBank (Tabla 6), pero en cuanto a su morfología no difieren en caracteres informativos por lo que se reconocería como una ECN. Aunque divergen genéticamente puede que también el espécimen brasileño esté mal identificado, *T. albus* es una especie común en la cuenca amazónica (Malabarba, 2004) por lo que una mala identificación sería poco probable. Además los especímenes QCAZ de *T. albus* no difieren en el número de arcos branquiales, el número de escamas en la línea lateral, profundidad del cuerpo, número de radios de la aleta anal, ni en el número de escamas en el origen de las aletas dorsal, pectoral y pélvicas. La localidad tipo de *Triportheus albus* es del Río Ambyiacu,

Perú y la secuencia del GenBank es del Brasil (Malabarba, 2004). Entonces, podría existir la posibilidad que la especie de Brasil represente el linaje diferente.

*Paragoniates* ha sido mayormente conocido por la especie *P. alburnus* (Steindachner, 1907; Gery, 1977). Gery, (1977) se refiere a *Paragoniates* como monotípico. Los especímenes del Yasuní de *Paragoniates* (QCAZ 2564-2781) difieren morfológicamente en cuanto a características cuantitativas de la especie. Difieren en el número de radios de la aleta anal (34—36 vs. 43—48), en el número de escamas en la línea lateral (39—42 vs. 50) y número de escamas transversales (10 vs. 15). En la filogenia tienen un soporte alto bajo ambos análisis y su distancia genética  $p$  no corregida es del 5.8% con respecto al espécimen de *Paragoniates* de Brasil (Tabla 7). Los holotipos de *Paragoniates alburnus* fueron colectados en la cuenca amazónica este, lo cual sugiere que las poblaciones de Ecuador son una ECC de *Paragoniates*.

Para *Aphyocharax* en el Ecuador se sugieren dos ECC (Figuras 4 y 5). *Aphyocharax* sp.1 (QCAZ 2870) se parece a *Aphyocharax pusillus* en la coloración. A nivel molecular se diferencia de la secuencia del GenBank en un 4% (Tabla 8). *A. sp.2* (QCAZ 2851) se asemeja a *A. alburnus* pero presenta una distancia genética  $p$  no corregida del 3%. Ambas especies difieren de las demás y entre ellas en el número de dientes mandibulares, dientes maxilares y en el número de escamas en la línea lateral; y genéticamente tienen una distancia de 3.6%. La característica, de que la punta del maxilar no llegue al suborbital las posiciona como especies cercanas a *A. alburnus* y *A. pusillus* pero el número de dientes maxilares las relaciona más con el grupo de *A. dentatus*. En el árbol

filogenético, las especies de *Aphyocharax* aparentemente son linajes diferentes relacionados a diferentes grupos de especies dentro del género pero se ha visto que las relaciones entre *Aphyocharax* pueden variar (Tagliacollo *et al.*, 2012). A pesar de que faltarían más especímenes del Yasuní por secuenciar, las características mencionadas son razones para posicionarlas como ECC.

En el subclado A (Figuras 4 y 5) se encontraron especies candidatas cercanas al complejo de *Moenkhausia* "*lepidura*". Entre estas especies existe una distancia génica del 5-6% (Tabla 9) y en relación a la secuencia de Brasil usada de *M. lepidura* una aún mayor del 8-11%. La diferenciación morfológica de estos especímenes junto con la bibliografía infiere dos ECC. Las especies de *Moenkhausia* debido a su parafilia se las ha agrupado en tres grupos artificiales: *Moenkhausia lepidura*, *Moenkhausia grandisquamis* y *Moenkhausia chrysagyrea* (Gery, 1977; Benine, 2004). Dentro del grupo de *M. lepidura* el complejo de especies de este mismo grupo se diferencia primordialmente de sus congéneres por la presencia de una mancha negra en el lóbulo caudal superior, la cual se encuentra ausente en las especies colectadas. Las especies de *Moenkhausia* complejo *lepidura* del Ecuador están más cercanas al grupo hermano del complejo de especies de *M. lepidura*, el cual está conformado por *M. intermedia* y *M. dichrourea*, las mismas que se diferencian de igual manera en los colores de la punta de los lóbulos que son hialinas o blancas (Gery, 1977; Benine, 2004), mientras que en las especies colectadas son negras. Por tanto, las especies ecuatorianas se diferencian de las especies mencionadas. Además, las nuevas especies descritas del grupo *Moenkhausia lepidura* pertenecen exclusivamente al complejo del mismo (Marinho y Lageani, 2010). Ambas especies candidatas del

Ecuador presentan diferencias entre sí. *Moenkhausia* sp.1 (QCAZ 2908) tiene una profundidad corporal mayor (3.1 vs. 2.8—2.5) con relación a *Moenkhausia* sp.2 (QCAZ 2905—2769), y un mayor número de escamas en la línea lateral (35 vs. 31). También, *Moenkhausia* sp.1 (QCAZ 2908) presenta una mancha humeral más conspicua que la presente en *Moenkhausia* sp.2 (QCAZ 2905—2769). También, *Moenkhausia* sp.1 (QCAZ 2908) presenta un color oscuro grisáceo en ambos lóbulos caudales mientras que *Moenkhausia* sp.2 (QCAZ 2905—2769) tiene ambos lóbulos de color negro sin marcas hialinas en las puntas. La distancia génica entre estas especies (5-6%) y entre las demás especies de *Moenkhausia* incluidas en el análisis junto con las diferencias morfológicas indican que son ECC.

La especie ecuatoriana perteneciente a *Astyanacinus* si presenta una distancia genética de *A. moorii* y *A. multidentis*, (la última reportada para Ecuador, Tabla 10); presenta también diferencias ambiguas con las respectivas especies del género. Se propone como ECN a *Astyanacinus* sp. (QCAZ 2927) debido a que solo se capturó un espécimen juvenil. Aunque sus características morfológicas difieren de las demás especies (*A. moorii*, *A. multidentis*, *A. orthodus*, *A. superbus*, *A. sp n. Perú*, *A. sp n. Bolivia*, *A. sp n. Purus*) (Torres-Mejía *et al.*, 2012) estas diferencias podrían deberse a su condición de juvenil. Se necesitaría más material para analizar y más secuencias para hacer comparaciones más exhaustivas con las siete especies de este género.

### 5.3 CONCLUSIONES

En este estudio se encontró a Characidae como una familia parafilética y a seis ECC y tres ECN provenientes del Yasuní. El presente estudio demuestra que los marcadores genéticos tienen un buen desempeño a la hora de diferenciar especies. El fragmento del gen 16S utilizado fue mayormente ventajoso a la hora de diferenciar especies más no en resolver relaciones filogenéticas profundas. Por otro lado, fue de igual importancia examinar las características morfológicas, ya que ésto puede corroborar diferencias entre diferentes linajes evolutivos.

Finalmente, se recomienda enfáticamente seguir analizando a los carácidos del Yasuní para de esta manera obtener más información útil sobre la Ictiofauna de la región amazónica ecuatoriana ya que pocos estudios, tanto moleculares como de diversidad críptica, se han realizado en el Ecuador.

## 6. LITERATURA CITADA

Abe, K.T., Castro, R.M.C., Benine, R.C., Foresti, F. y Oliveira, C. 2009. Molecular phylogeny of the Gasteropelecidae (Ostariophysi: Characiformes; Gasteropelecidae; Carnegiella). Departamento de Morfología, Universidade Estadual Paulista (Julio de mesquita Filho), Sao Paulo, Brasil.

Aguileta, G., Marthey, S., Chiapello, H., Lebrun, M.-H., Rodolphe, F., Fournier, E., Gendrault-Jacquemard, A. y Giraud, T. 2008. Assessing the Performance of Single-Copy Genes for Recovering Robust Phylogenies. *Systematic Biology* 57: 613-617.

Albert, J.S., Carvalho, T.P., Petry, P., Holder, M.A., Maxime, E.L., Espino, J., Corahua, I., Quispe, R., Rengifo, Ortega, H. Y Reis, E.R. 2011. Aquatic Biodiversity in the Amazon: Habitat Specialization and Geographic Isolation Promote Species Richness. *Animals* 1: 205-241.

Barriga, R. 1991. Peces de agua dulce. *Revista Politécnica* 3(16): 7-88.

Barriga, R. 1994. Peces del Parque Nacional Yasuní. *Revista Politécnica* 2(19): 10-41.

Barriga, R. 2011. Peces. En: Fauna de Guiyero, Parque Nacional Yasuní (L.V. Albuja, eds) pp. 145-169. Escuela Politécnica Nacional, Ecofondo., Quito, Ecuador.

Barriga, R. 2012. Lista de peces de agua dulce e intermareales del Ecuador. Revista Politécnica 30(3): 83-119.

Baicere-Silva, C., Ferreira, K.L., Malabarba, L.R., Benine, R.C. y Quagio-Grassiotto, I. 2011. Spermatic characteristics and sperm evolution on the subfamily Stevardiinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology 9: 377-392.

Benine, R.C., Castro, R.M.C. y Sabino, J. 2004. *Moenkhausia bonita*: A New Small Characin Fish from the Rio Paraguay Basin, Southwestern Brazil (Characiformes: Characidae). Copeia 2004: 68-73.

Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, S.N., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K. y Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in Ecology and Evolution 22: 148-155.

Bojsen, B.H. y Barriga, R. 2002. Effects of deforestation on fish community structure in Ecuadorian Amazon streams. Freshwater Biology 47: 2246-2260.

Calcagnotto, D., Schaefer, S.A. y DeSalle, R. 2005. Relationships among characiforms fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 135-153.

Casciotta, J., Almirón, A., Piálek, L. y Rícan, O. 2012. *Cyanocharax obi*, a new species (Characiformes: Characidae) and the first record of the genus from tributaries of the río Paraná basin, Argentina. *Zootaxa* 3391: 39-51.

Castañeda, M.R. y de Queiroz, K. 2011. Phylogenetic relationships of the *Dactyola* clade of *Anolis* lizards based on nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 784-800.

Castro, R.M.C. 1999. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. *Oecologia Brasiliensis* 6: 139-155.

Craig, M.T., Graham, R.T., Torres, R.A., Hyde, J.R., Freitas, M.O., Ferreira, B.P., Hostim-Silva, M., Gerhardinger, L.C., Bertoni, A.A. y Robertson, D.R. 2009. How many species of goliath grouper are there? Cryptic genetic divergence in a threatened marine fish and the resurrection of a geopolitical species. *Endangered Species Research* 7: 167-174.

Da-Silva, E.L., Centofante, L. y Miyazawa, C.S. 2009. Análise morfométrica em *Thoracocharax stellatus* (Kner 1858) (Characiformes, Gasteropelecidae)

proveniente de diferentes bacías hidrográficas Sul-americanas. *Biota Neotropica* 9: 71-76.

De-Carvalho, D.C., Oliveira, D.A.A., Pompeu, P.S., Gontijo L.C., Oliveira, C. y Hanner, R. 2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA* 22: 80-86.

Desmond, S.T.N. 2008. *An Introduction to Genetic Engineering*, Cambridge University Press, Scotland, UK.

Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stone-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., y Wilson, A. 2010. Geneious. [en línea]. Versión 5.3.4. <<http://www.geneious.com/>> [Consultado: Agosto 2012]

Eguiarte, L. Souza, V. y Aguirre, X. 2007. *La Ecología Molecular de plantas y animales*, INE/Conabio, México.

Eschmeyer, W.N., y Fong, J.D. 2009. *Species of Fishes by family/subfamily*. <<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.html>>[Consulta: 15 Enero 2013].

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits in phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Ferreira-Neto, M., Ferreira, R.A., Vicari, M.R., Moreira-Filho, O., Martínez, C.J.P., Bakkali, M., Oliveira, C. y Foresti, F. 2012. Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *Cytogenetics* 6: 29-40.

Fowler, H.W. 1907. Further knowledge of some heterognathus fishes, Part II. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 58: 431-483.

Frehner, K.K., Brandao, K.O., Pazza, R. Y Almeida-Toledo, L.F. 2009. *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*?. *Genetics and Molecular Biology* 32: 477-483.

Galacatos, K., Barriga-Salazar, R. y Stewart, D.J. 2004. Seasonal and habitat influences on fish communities within the lower Yasuni River basin of the Ecuadorian Amazon. *Environmental Biology of Fishes* 71: 33-51.

Galacatos, K., Stewart, D.J. y Ibarra, M. 1996. Fish community patterns of lagoons and associated tributaries in the Ecuadorian Amazon. *Copeia* 1996: 875-894.

Gery, J. 1977. *Characoids of the world*. T.F.H. Publications Inc, Neptune City, USA.

Greenwood, P.H., Rosen, D.E., Weitzman, S.H. y Myers, G. 1966. Phyletic Studies of Teleostean Fishes, with a provisional Classification of Living Forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 131: 1-693.

Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. y Hickey, D.A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23: 167-172.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. y deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of The Royal Society of London, B* 270: 313-321.

Hubert, N., Bonillo, C. y Paugy, D. 2005. Does elisión account for molecular saturation> case study base don mitochondrial ribosomal DNA among Characiform fishes (Teleostei: Ostariophysii). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 300-308.

Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R., y Bollback, J.P. 2008. Bayesian inference of phylogeny ans its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.

Ibarra, M. y Stewart, D.J. 1989. Longitudinal Zonation of Sandy Beach Fishes in the Napo River Basin, Eastern Ecuador. *Copeia* 1989: 364-381.

Javonillo, R., Malabarba, L.R., Weitzman, S.H. y Burns, J.R. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 498-511.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, L. y Miyata., T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acid Research* 30: 3059-3066.

Kochzius, M., Seidel, C., Antoniou, A., Kumar, S.B., Campo, D., Cariani, A., Vazquez, E.G., Hauschild, J., Hervet, C., Hjorleifsdottir, S., Hreggvidsson, G., Kappel, K., Landi, M., Magoulas, A., Marteinson, V., Nolte, M., Planes, S., Tinti, F., Turan, C., Venugopal, H.W. y Blohm, D. 2011. 2010. Identifying Fishes through DNA Barcodes and Microarrays 5: 1-15.

Lakra, W.S., Goswami, M. y Gopalakrishnan, A. 2009. Molecular identification and phylogenetic relationships of seven Indian Sciaenids (Pisces: Perciformes, Sciaenidae) based on 16S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes. *Molecular Biology Reports* 36: 831-839.

Lucena, C.S.A. y Menezes, N.A. 1998. A phylogenetic analysis of *Roestes Günther* and *Gilbertolus Eigenmann*, with a hypothesis on the relationships of the Cynodontidae and Acestrorhynchidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). En: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (L.R. Malabarba, R.E.

Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena, y C.A.S. Lucena, eds) pp 261-278. Porto Alegre: Edipucrs; Brasil.

Maddison, W.P. y Maddison, D.R. 2010. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version .2.74 <http://mesquiteproject.org> [Consultado: Agosto 2012].

Malabarba, L. R. Y Weitsman, S.H. 2003. Description of new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia de PUCRS, Serie Zoológica.*, Porto Alegre 16: 67-151.

Malabarba, S.L.M.C. 2004. Revision of the Neotropical genus *Triportheus* Cope, 1872 (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 2: 167-204.

Marinho, M.M.F. y Langeani, F. 2010. *Moenkhausia celibela*: a new species from the Amazon basin, Brazil (Characiformes: Characidae). *Journal of Fish Biology* 77: 879-889.

Mattox, G. y Toledo-Piza, M. 2012. Phylogenetic study of the Characinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 165: 809-915.

Medrado, A.S., Amaral, F.A.V., Waldschmidt, A.M., Mellos-Affonso, P.R.A. y

Carneiro, L.S. 2008. Cytogenetic and morphological diversity in populations of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) from Brazilian northeastern river basins. *Genetics and Molecular Biology* 31: 208-214.

Menezes, N.A. 2007. A new species of *Cynopotamus* Valenciennes, 1849 (Characiformes, Characidae) with a key to the species of the genus. *Zootaxa* 1635: 55-61.

Menezes, A.N. y Weitzman, S.H. 2009. Systematics of the Neotropical fish subfamily Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 7: 295-370.

Mirande, J.M. 2009. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* 25: 574-613.

Mirande, J.M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* 8: 385-568.

Mueller, R.L. 2006. Evolutionary Rates, Divergence Dates, and the Performance of Mitochondrial Genes in Bayesian Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology* 55: 289-300.

Nakatani, M., Miya, M., Mabuchi, K., Saitoh, K. y Nishida, M. 2011. Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern

freshwater fishes: Pangean origin and Mesozoic radiation. *BMC Evolutionary Biology* 11: 1-25.

Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the World*, John Wiley & Sons Inc, New York, USA.

Oliveira, C., Avelino, G.S., Abe, K.T., Mariguela, T.C., Benine, R.C., Ortí, G., Vari, R.P. y Corrêa e Castro, R.M. 2011. Phylogenetic Relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *Evolutionary Biology* 11: 1-25.

Ornelas-García, C.P., Domínguez-Domínguez, O. y Doadrio, I. 2008. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology* 8: 1-17.

Ortí, G. y Meyer, A. 1997. The Radiation of the Characiforms fishes and the limits of resolution of Mitochondrial Ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 46: 75-100.

Ortí, G., Sivasundar, A., Dietz, K. y Jégu, M. 2008. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology* 31: 343-351.

Padial, J.M., Miralles, A., De-la-Riva, I. Y Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7: 1-14.

Pereira, L.H.G., Pazian, M.F., Hanner, R., Foresti, F. y Oliveira, C. 2011. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA* 22: 87-96.

Piggott, M.P., Chao, N.L. y Beheregaray, B. 2011. Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. *Biological Journal of the Linnean Society* 102: 391-403.

Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

Quendez, N. 2010. Estación Científica Yasuní. <  
<http://www.yasuni.ec/yasuni.php?c=1262>> [Consulta: 1 Diciembre 2011]

Rambaut, A. y Drummond, A.J. 2007. Tracer. Versión 1.4.  
<<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>> [Consultado: Septiembre 2012].

Reis, R.E. 1989. Systematic revision of the neotropical characid subfamily Stethaprioninae (Pisces, Characiformes). *Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Serie Zoologica Porto Alegre* 2 (6): 3-86.

Reis, R.E., Kullander, S.O. y C.J. Ferraris, Jr. 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America, Porto Alegre, Edipucrs, Brasil.

Rosen, D.E. 1972. Origin of the characid fish genus *Bramocharax* and a description of a second, more primitive, species in Guatemala. American Museum Novitates 2500: 1-21.

Santos, G.S.A., Britski, H.A., Foresti, F. y Oliveira, C. 2007. Comparative molecular analysis among species of *Leporinus* (Ostariophysi: Characiformes: Anostomidae) from Sao Francisco and La Plata Basins. Instituto de Biociencia-UNESP, Sao Paulo, Brasil.

Steindachner, F. 1907. Ichthyologische Beiträge (V), Über einige neue oder selten Fischarten aus dem atlantischen, indischen, und stillen Ocean. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften 74 (1): 49-240.

Stewart, D.J., Ibarra, M. y Barriga-Salazar, R. 2002. Comparison of Deep-River and Adjacent Sandy-Beach Fish Assemblages in the Napo River Basin, Eastern Ecuador. Copeia 2002: 333-343.

Tagliacollo, V.A., Souza-Lima, R., Benine, R.C. y Oliveira, C. 2012. Molecular phylogeny of Aphyocharacinae (Characiformes, Characidae) with morphological diagnoses for the subfamily and recognized genera. Molecular Phylogenetics and Evolution 64: 297-307.

Teletchea, F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev Fish Biol Fisheries* 19: 265-293.

Thomaz, A.T., Malabarba, L.R. y Bonatto, S.L. 2010. The phylogenetic placement of *Hollandichthys* Eigenmann 1909 (Teleostei: Characidae) and related genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 1347-1352.

Torres-Mejía, M., Hernández, E. y Senechal, V. 2012. A New Species of *Astyanacinus* (Characiformes: Characidae) from the Río Magdalena System, Colombia. *Copeia* 2012: 501-506.

Valdez-Moreno, M., Ivanova, N.V., Elías-Gutierrez, M., Contreras-Balderas, S. y Hebert, P.D.N. 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology* 74: 377-402.

Vari, R.P. 1979. Anatomy, relationships and classification of the families Citharinidae and Distichodontidae (Pisces, Characoidea). *British Museum of Natural History* 36: 261-342.

Vari, R.P. 1983. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, and Chilodontidae (Pisces: Characiformes). *Smithsonian Contributions to Zoology* 378: 1-48.

Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y. y Vieites, D. R. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in zoology* 2: 1-12.

Vera, M., Fernández, C., Guisande, C. y Pelayo, P. 2009. Trophic and body shape characters that promote diversification in Neotropical Characiforms:

Integration between phylogeny and community ecology. Universidad Santiago de Compostela, España.

Vieites, D. R., Wollenberg, K. C., Andreone, F., Köhler, J., Glaw, F. y Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 8267–8272.

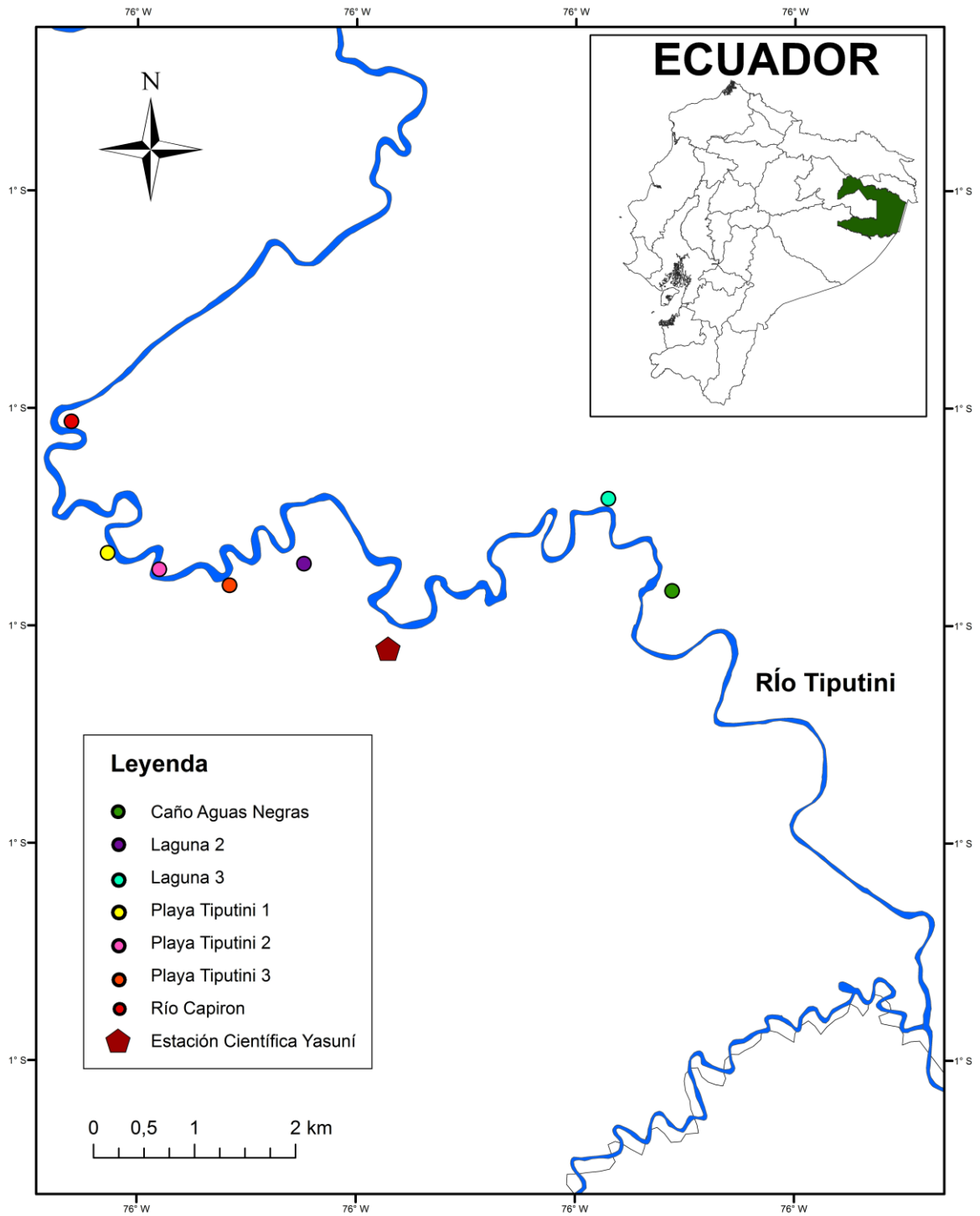
Weitzman, S.H. y Fink, W.L. 1983. Relationships of the neon tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of New World Characiformes. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*. 150(6) 339-395.

Weitzman, S.H. y Vari, R.P. 1988. Miniaturization in South America freshwater fishes; and overview and discussion. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 101: 444-465.

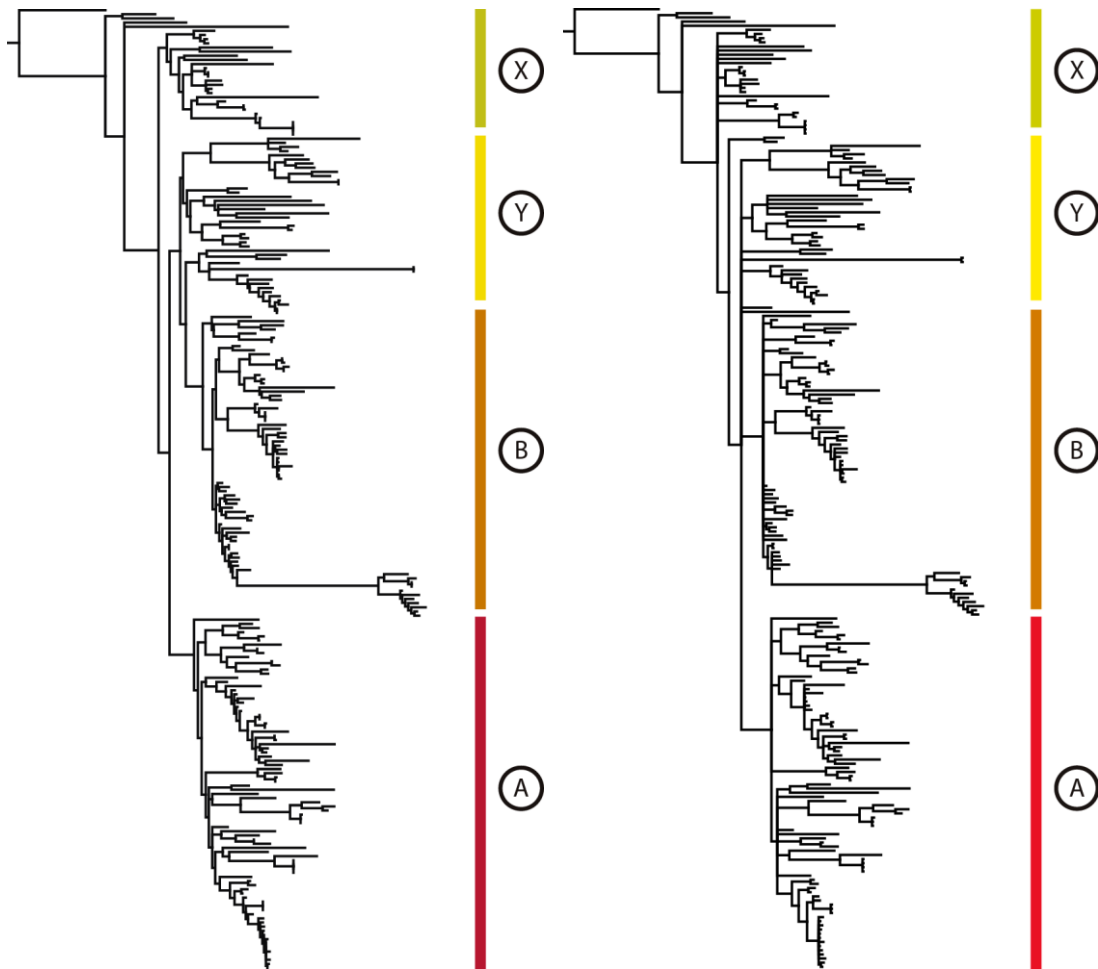
Zwickl, D. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion.

Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin, U.S.A.

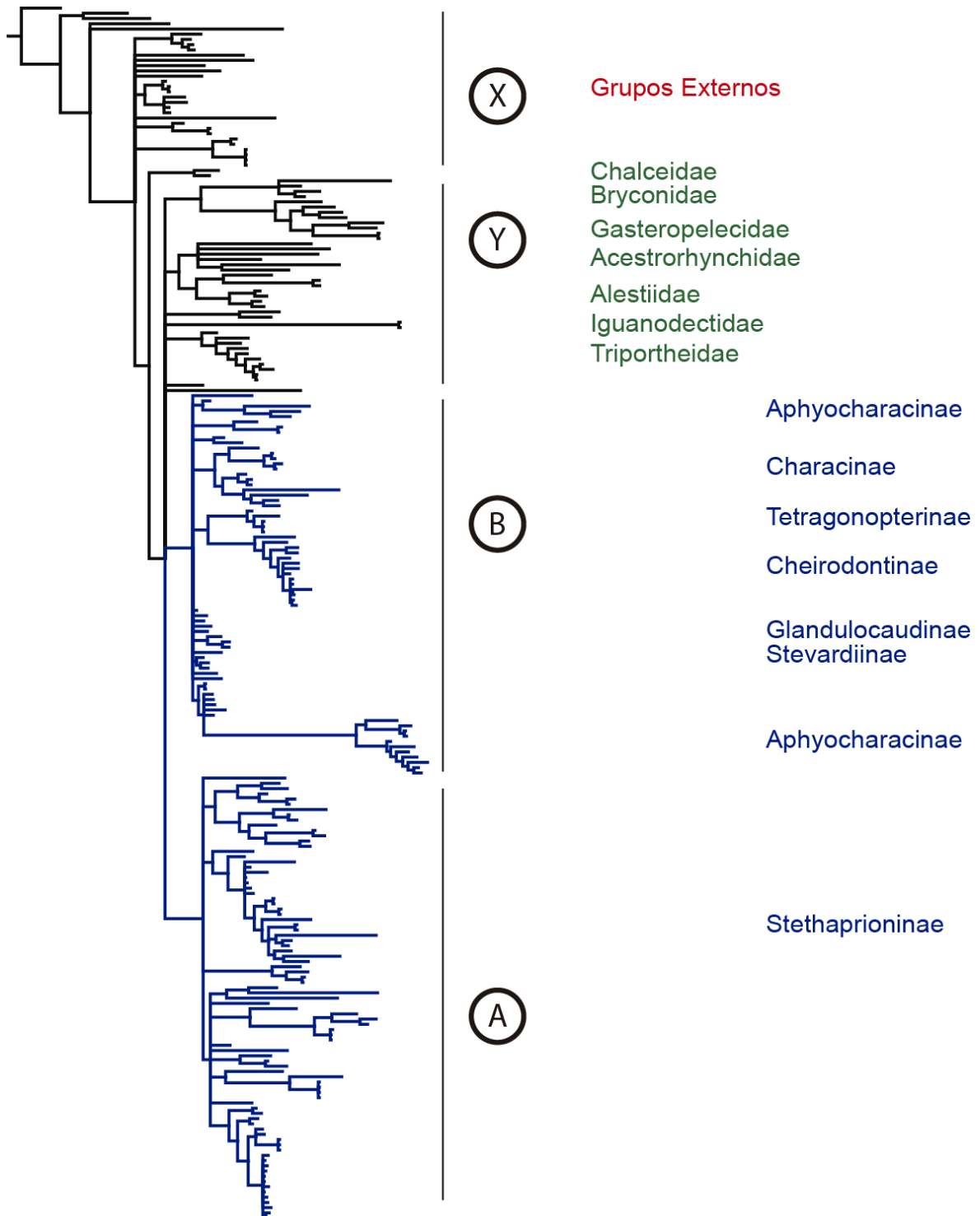
## 7. FIGURAS



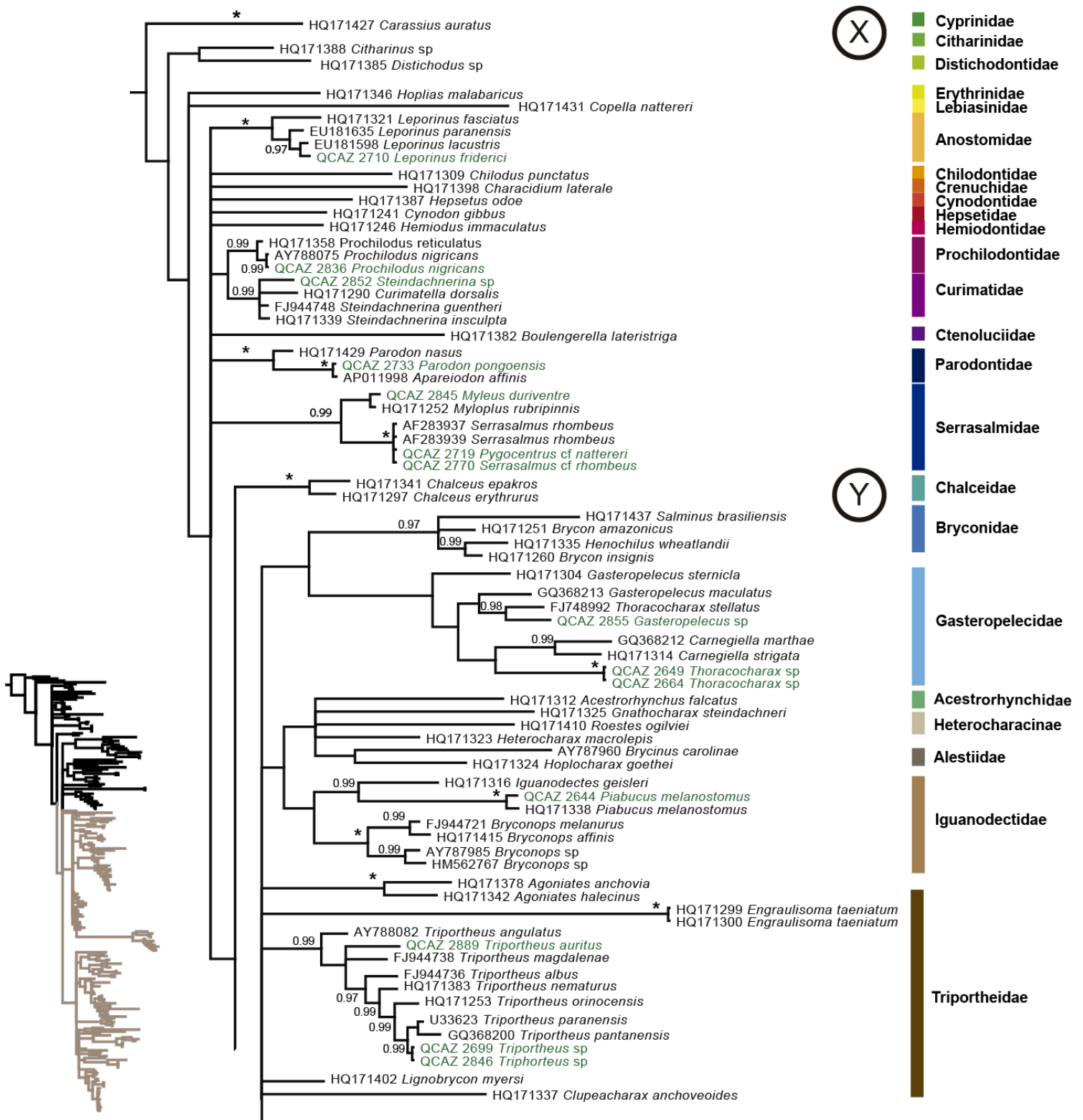
**Figura 1.** Mapa de localidades donde se colectó los diferentes Characiformes utilizados en el estudio.



**Figura 2:** Árboles producto de un fragmento del gen 16S bajo los diferentes criterios de optimalidad. A la izquierda se encuentra árbol de Máxima Verosimilitud y a la derecha el árbol consenso de Inferencia Bayesiana. Se indican los clados de Characidae como A y B, el grupo externo como X y al grupo de linajes como Y.



**Figura 3:** Árbol consenso resultante del fragmento del gen 16S bajo el criterio de Inferencia Bayesiana de Characidae. Se muestran las familias en verde y las subfamilias de Characidae en azul. Se indican los clados de Characidae como A y B, el grupo externo como X y al grupo de linajes Y.



**Figura 4:** Filograma resultante del análisis de Inferencia Bayesiana del fragmento del gen 16S. Los valores de 1 se indican con un asterisco (\*) mientras que valores no significativos no se muestran en la filogenia. Las muestras de este estudio se indican con letras verdes.



Figura 4, continuación

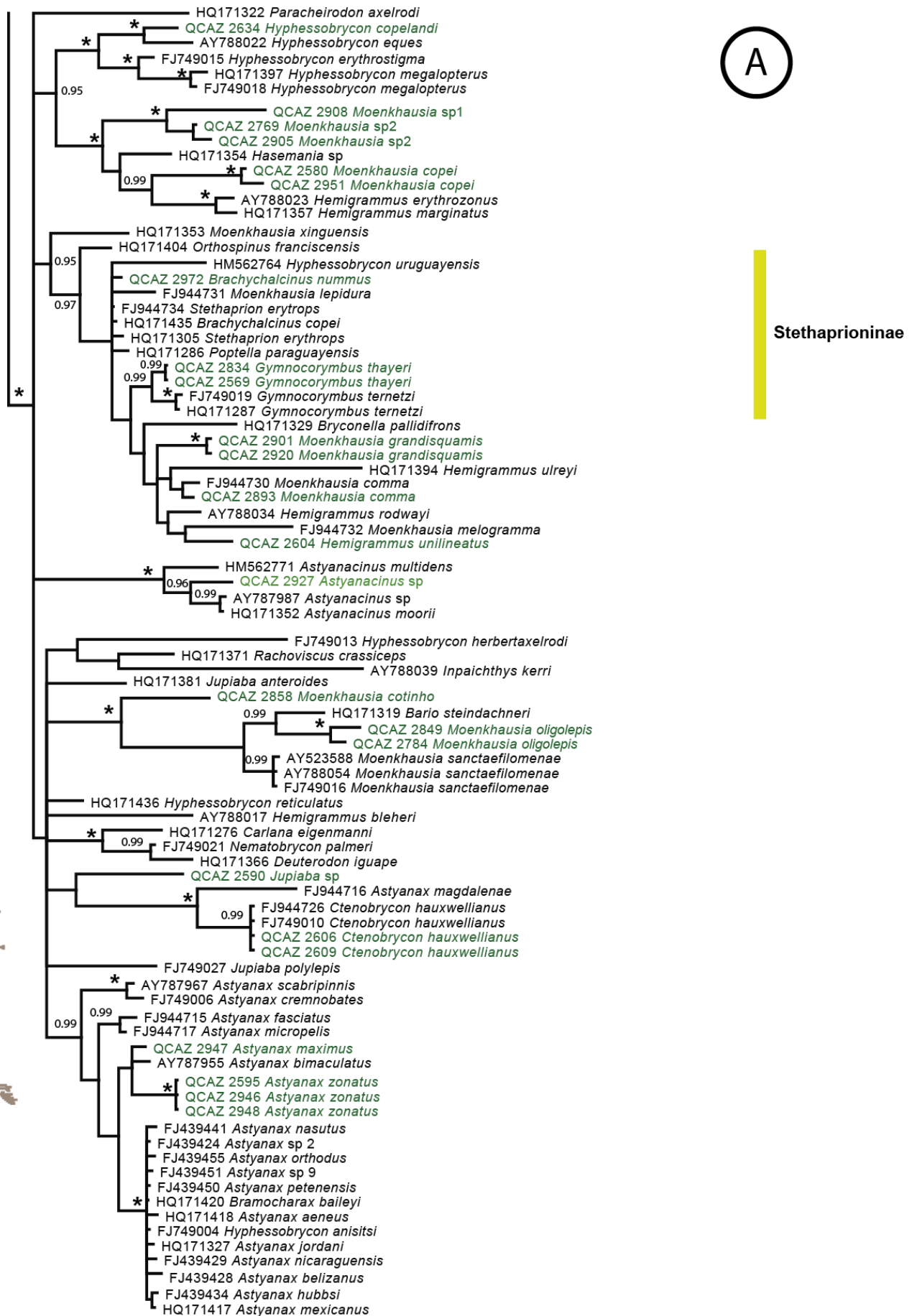
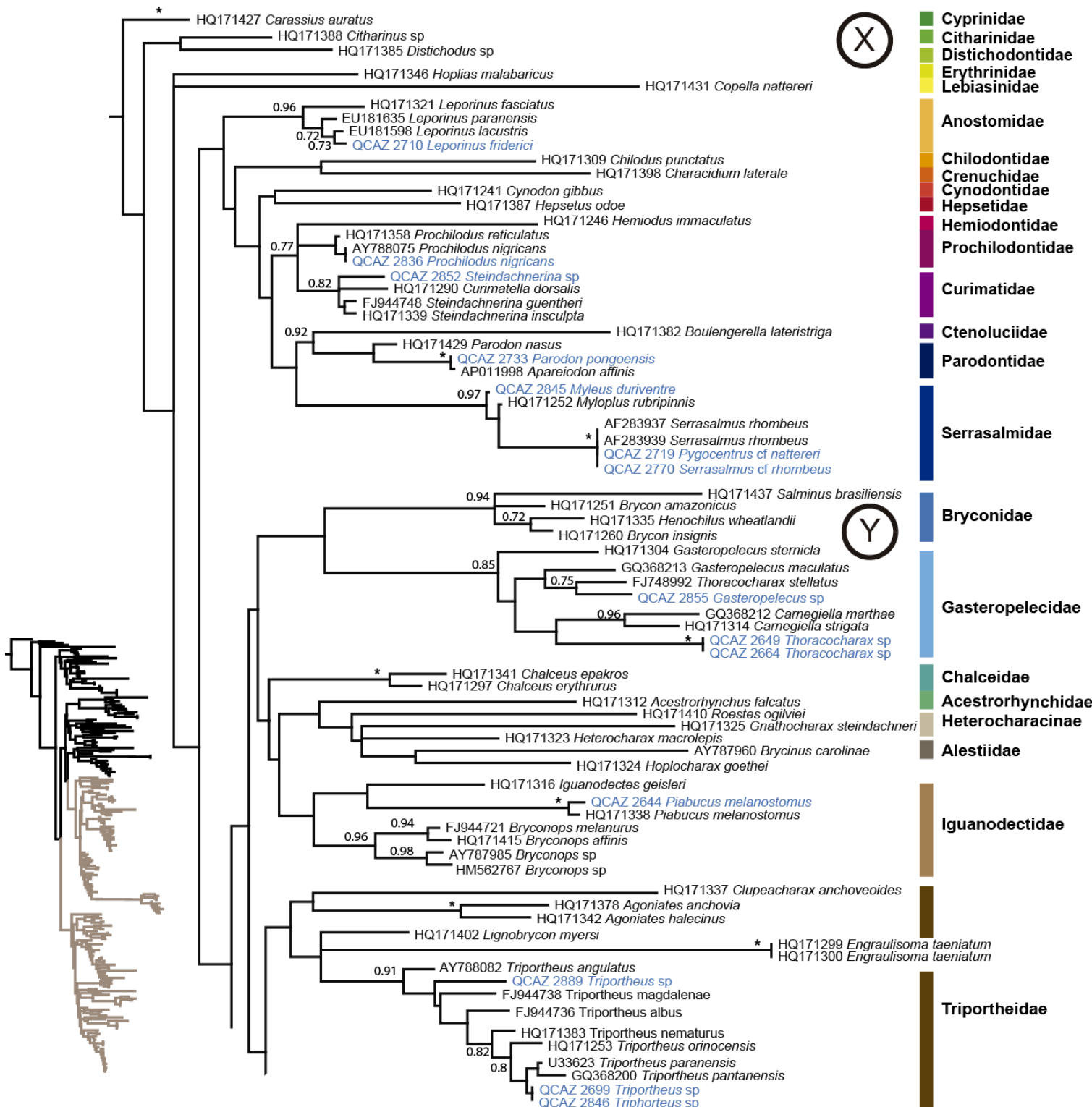


Figura 4, continuación



**Figura 5.** Filograma resultante del análisis de Máxima Verosimilitud del fragmento del gen 16S. Los valores de 1 se indican con un asterisco (\*) mientras que valores no significativos no se muestran en la filogenia. Las muestras de este estudio se indican con letras celestes.



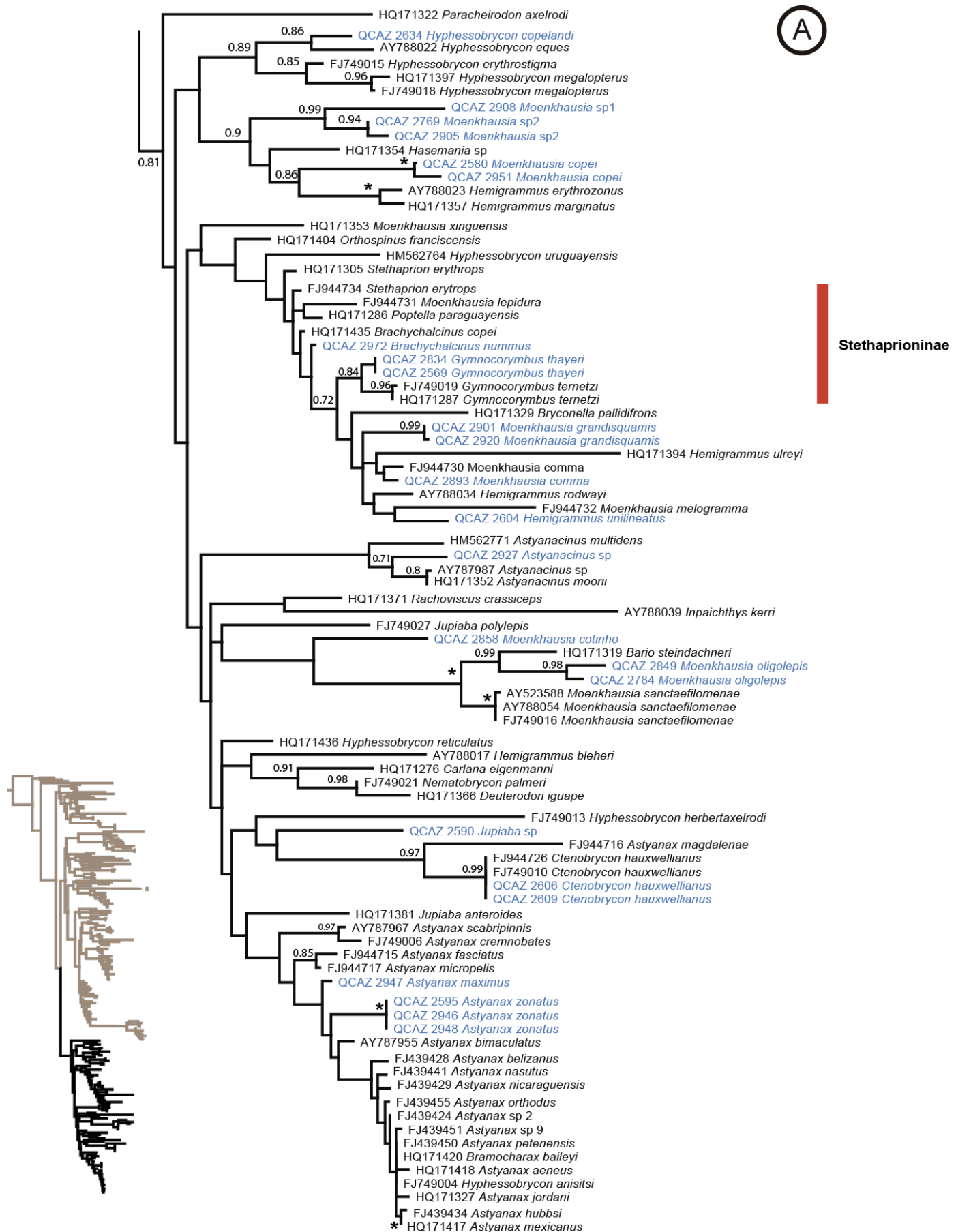
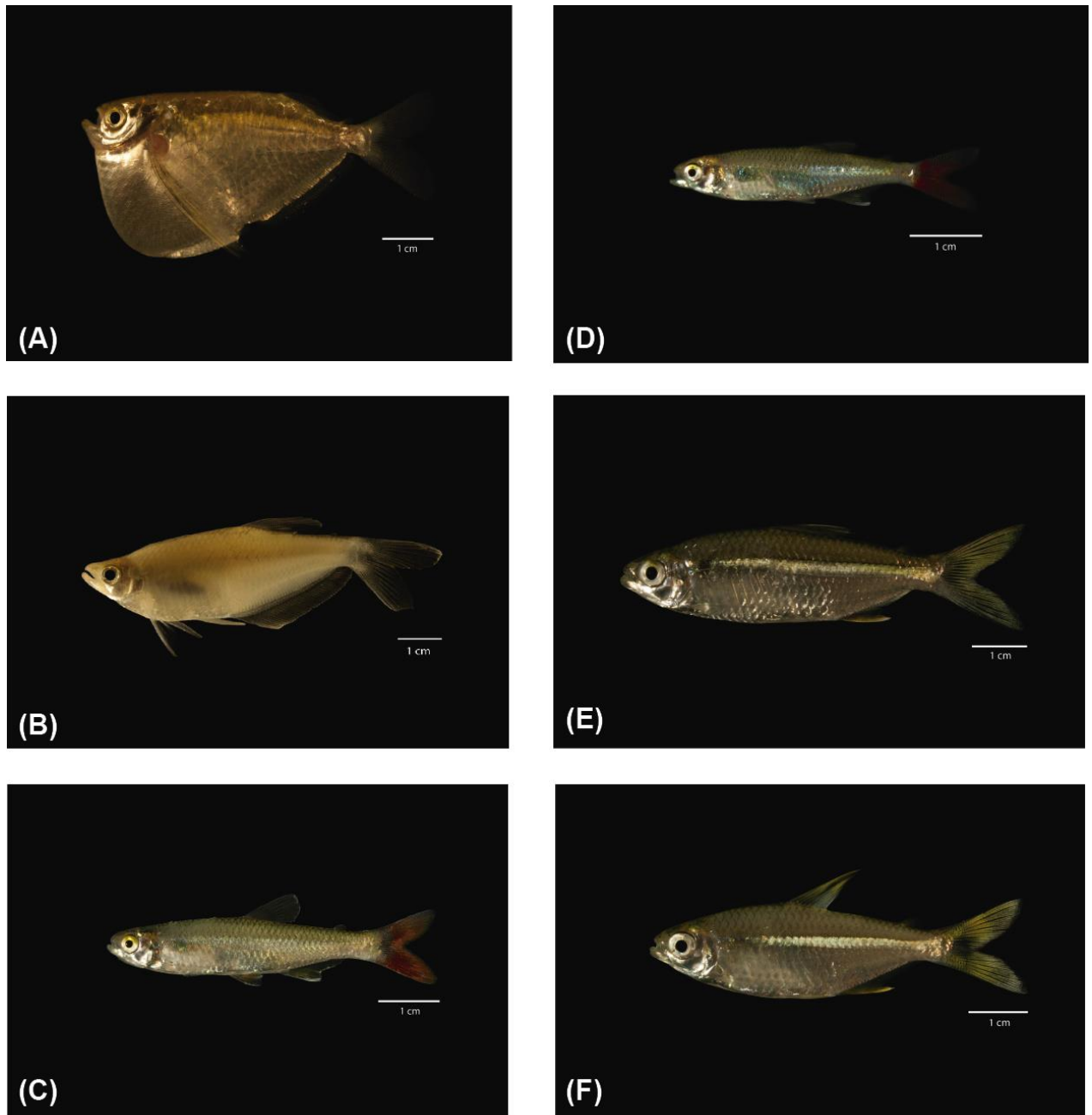


Figura 5, continuación



**Figura 6.** Fotografías de las ECC del Yasuni. (A) *Thoracocharax* sp. (QCAZ 2664), (B) *Paragoniates* sp. (QCAZ 2781), (C) *Aphyocharax* sp.1 (QCAZ 2870), (D) *Aphyocharax* sp.2, (E) *Moenkhausia* sp.1 (QCAZ 2908), y (F) *Moenkhausia* sp.2 (QCAZ 2905).

## 8. TABLAS

**Tabla 1.** Coordenadas de las localidades de colección

<b>Localidad</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
ECY	0° 40' 27.732''	-76° 23' 49,3794''
Laguna 2	0° 40' 7.1394"	-76° 24' 17.1"
Laguna 3	0° 40' 7.1394"	-76° 24' 40.8594".
Estero Aguas Negras	0° 40' 8.7954"	-76° 22' 19.524"
Río Capirón	0° 39' 14.3634"	-76° 25' 31.4034"
Playa Tiputini 1	0° 39' 56.7"	76° 25' 19.8114"
Playa Tiputini 2	0° 40' 2.0028"	-76° 25' 3.324"
Playa Tiputini 3	0° 40' 7.1394"	-76° 24' 40.85"

**Tabla 2.** Regiones de ADN y cebadores utilizados en este estudio.

<b>Gen</b>	<b>Cebadores</b>	<b>Secuencia 5´-3´</b>	<b>Fuente</b>	<b>Dirección</b>
16S Mitocondrial	16Sa-L	ACGCCTGTTTATCAAAAACAT	Palumbi, 1996.	Derecha
	16Sb-H	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Palumbi, 1996.	Reversa

**Tabla 3.** Lista de secuencias empleadas en el estudio. Se muestra el número de voucher, número de accesión y la fuente bibliográfica.

<b>Voucher</b>	<b>Especie</b>	<b># de Accesión</b>	<b>Referencia Bibliográfica</b>
LBP6876-33172	<i>Acestrocephalus sardina</i>	HQ171373	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP4191-23707	<i>Acestrorhynchus falcatus</i>	HQ171312	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP8104-37551	<i>Acinocheiroduon melanogramma</i>	HQ171403	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP550326594	<i>Agoniates halecinus</i>	HQ171342	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP6740-33471	<i>Agoniates anchovia</i>	HQ171378	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
--	<i>Apareiodon affinis</i>	AP011998	Nakatani <i>et al.</i> , 2011
LBP9055-42219	<i>Aphyocharacidium bolivianum</i>	HQ171424	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP830640025	<i>Aphyocheiroduon hemigrammus</i>	HQ171413	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP-15819	<i>Aphyocharax alburnus</i>	JQ820097	Tagliacollo <i>et al.</i> , 2012
LBP-25524	<i>Aphyocharax anisitsi</i>	JQ820095	Tagliacollo <i>et al.</i> , 2012
LBP-3604	<i>Aphyocharax dentatus</i>	JQ820092	Tagliacollo <i>et al.</i> , 2012
LBP-22132	<i>Aphyocharax nattereri</i>	JQ820089	Tagliacollo <i>et al.</i> , 2012

LBP4046-22920	<i>Aphyocharax pusillus</i>	HQ171301	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP-36496	<i>Aphyocharax rathbuni</i>	JQ820093	Tagliacollo <i>et al.</i> , 2012
QCAZ 2870	<i>Aphyocharax</i> sp.1	--	Presente Estudio
QCAZ 2581	<i>Aphyocharax</i> sp.2	--	Presente Estudio
LBP5783-28195	<i>Astyanacinus moorii</i>	HQ171352	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
MUSM-35742A	<i>Astyanacinus multidentis</i>	HM562771	Thomaz <i>et al.</i> , 2010
AMNH233243	<i>Astyanacinus</i> sp	AY787987	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
QCAZ 2927	<i>Astyanacinus</i> sp1	--	Presente Estudio
LBP8938-42019	<i>Astyanax aeneus</i>	HQ171418	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
Amot10211	<i>Astyanax belizanus</i>	FJ439428	Ornelas-García <i>et al.</i> , 2008
--	<i>Astyanax bimaculatus</i>	AY787955	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
MCP-41307	<i>Astyanax cremnobates</i>	FJ749006	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
--	<i>Astyanax fasciatus</i>	FJ944715	Vera <i>et al.</i> , 2009
A706	<i>Astyanax hubbsi</i>	FJ439434	Ornelas-García <i>et al.</i> , 2008
LBP451124599	<i>Astyanax jordani</i>	HQ171327	Oliveira <i>et al.</i> , 2011

--	<i>Astyanax magdalenae</i>	FJ944716	Vera <i>et al.</i> , 2009
QCAZ 2947	<i>Astyanax maximus</i>	--	Presente Estudio
LBP8937-42016	<i>Astyanax mexicanus</i>	HQ171417	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
--	<i>Astyanax micropelis</i>	FJ944717	Vera <i>et al.</i> , 2009
Aman175	<i>Astyanax nasutus</i>	FJ439441	Ornelas-García <i>et al.</i> , 2008
Aaman55vi	<i>Astyanax nicaraguensis</i>	FJ439429	Ornelas-García <i>et al.</i> , 2008
JJ28	<i>Astyanax orthodus</i>	FJ439455	Ornelas-García <i>et al.</i> , 2008
523GU	<i>Astyanax petenensis</i>	FJ439450	Ornelas-García <i>et al.</i> , 2008
--	<i>Astyanax scabripinnis</i>	AY787967	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
QCAZ 2595	<i>Astyanax zonatus</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2946	<i>Astyanax zonatus</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2948	<i>Astyanax zonatus</i>	--	Presente Estudio
CPOG-2009-Amaq2339	<i>Astyanax</i> sp 2	FJ439424	Ornelas-García <i>et al.</i> , 2008
911GU	<i>Astyanax</i> sp 9	FJ439451	Ornelas-García <i>et al.</i> , 2008
LBP4389-24187	<i>Bario steindachneri</i>	HQ171319	Oliveira <i>et al.</i> , 2011

LBP7094-34623	<i>Boulengerella lateristriga</i>	HQ171382	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP192-8853	<i>Brachychalcinus copei</i>	HQ171435	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2972	<i>Brachychalcinus nummus</i>	--	Presente Estudio
LBP8940-42025	<i>Bramocharax baileyi</i>	HQ171420	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
RUSI-065125	<i>Brycinus carolinae</i>	AY787960	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
LBP2187-15565	<i>Brycon amazonicus</i>	HQ171251	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP2369-16075	<i>Brycon insignis</i>	HQ171260	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP275418528	<i>Bryconamericus emperador</i>	HQ171266	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP4646-24696	<i>Bryconella pallidifrons</i>	HQ171329	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP262-4168	<i>Bryconops affinis</i>	HQ171415	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
--	<i>Bryconops melanurus</i>	FJ944721	Vera <i>et al.</i> , 2009
DC-2004	<i>Bryconops</i> sp	AY787985	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
ATT-2010-MCP-35087-595	<i>Bryconops</i> sp	HM562767	Thomaz <i>et al.</i> , 2010
LBP9215-43160	<i>Carassius auratus</i>	HQ171427	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP3300-19864	<i>Carlana eigenmanni</i>	HQ171276	Oliveira <i>et al.</i> , 2011

LBP 4199 23601	<i>Carnegiella marthae</i>	GQ368212	Abe <i>et al.</i> , 2009
LBP4200-23798	<i>Carnegiella strigata</i>	HQ171314	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP3257-20042	<i>Ceratobranchia cf delotaenia</i>	HQ171278	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP5443-26504	<i>Chalceus epakros</i>	HQ171341	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP4211-22727	<i>Chalceus erythrurus</i>	HQ171297	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP7614-36938	<i>Characidium laterale</i>	HQ171398	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2586	<i>Charax cf caudimaculatus</i>	--	Presente Estudio
LBP-1480-12700	<i>Charax leticiae</i>	GQ368220	Abe <i>et al.</i> , 2009
LBP1480-12700	<i>Charax leticiae</i>	HQ171244	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
--	<i>Charax michaeli</i>	FJ944724	Vera <i>et al.</i> , 2009
LBP3115-19803	<i>Cheirodon austral</i>	HQ171275	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
AMNH233214	<i>Cheirodon sp</i>	AY787995	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
QCAZ 2814	<i>Cheirodontinae sp 1</i>	--	Presente Estudio
LBP4090-23527	<i>Chilodus punctatus</i>	HQ171309	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP7528-35374	<i>Citharinus sp</i>	HQ289289	Oliveira <i>et al.</i> , 2011

LBP5046-26012	<i>Clupeacharax anchoveoides</i>	HQ171337	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP473324984	<i>Compsura heterura</i>	HQ171332	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP536-7140	<i>Copella nattereri</i>	HQ171431	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP3267-20057	<i>Creagrutus peruanus</i>	HQ171279	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
MCP-28945	<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	FJ749010	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
--	<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	FJ944726	Vera <i>et al.</i> , 2009
QCAZ 2606	<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2609	<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	--	Presente Estudio
LBP3759-22034	<i>Curimatella dorsalis</i>	HQ171290	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP1619-11672	<i>Cynodon gibbus</i>	HQ171241	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2585	<i>Cynopotamus amazonus</i>	--	Presente Estudio
LBP3225-19449	<i>Cynopotamus kincaidi</i>	HQ171271	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP6132-29515	<i>Cynopotamus venezuelae</i>	HQ171359	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP6827-33065	<i>Deuterodon iguape</i>	HQ171366	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP7526-35371	<i>Distichodus sp</i>	HQ171385	Oliveira <i>et al.</i> , 2011

LBP4038-22896	<i>Engraulisoma taeniatum</i>	HQ171299	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP4038-22897	<i>Engraulisoma taeniatum</i>	HQ171300	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
MCP-28907	<i>Galeocharax knerii</i>	FJ749024	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
LBP4070-22975	<i>Gasteropelecus sternicla</i>	HQ171304	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
STRI AM208 19868	<i>Gasteropelecus maculatus</i>	GQ368213	Abe <i>et al.</i> , 2009
QCAZ 2855	<i>Gasteropelecus</i> sp1	--	Presente Estudio
LBP2753-18519	<i>Gephyrocharax atracaudatus</i>	HQ171265	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
AMNH233275	<i>Gephyrocharax</i> sp	AY788014	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
U34007	<i>Gephyrocharax</i> sp	GO1995	Ortí y Meyer, 1997
QCAZ 2913	<i>Gephyrocharax</i> sp	--	Presente Estudio
LBP4507-24358	<i>Glandulocauda melanogenys</i>	HQ171320	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP4495-24494	<i>Gnathocharax steindachneri</i>	HQ171325	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
RJ-DNA-17	<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	FJ749019	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
LBP3737-21989	<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	HQ171287	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2834	<i>Gymnocorymbus thayeri</i>	--	Presente Estudio

QCAZ 2569	<i>Gymnocorymbus thayeri</i>	--	Presente Estudio
LBP5967-28455	<i>Hasemania</i> sp	HQ171354	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP6847-33168	<i>Hemibrycon taeniurus</i>	HQ171369	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
AMNH233395	<i>Hemigrammus bleheri</i>	AY788017	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
AMNH233396	<i>Hemigrammus erythrozonus</i>	AY788023	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
LBP6292-29419	<i>Hemigrammus marginatus</i>	HQ171357	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
AMNH233397	<i>Hemigrammus rodwayi</i>	AY788034	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
LBP7604-36267	<i>Hemigrammus ulreyi</i>	HQ171394	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2604	<i>Hemigrammus unlineatus</i>	--	Presente Estudio
LBP1725-12849	<i>Hemiodus immaculatus</i>	HQ171246	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP1221-25846	<i>Henochilus wheatlandii</i>	HQ171335	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP7527-35373	<i>Hepsetus odoe</i>	HQ171387	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP4494-24485	<i>Heterocharax macrolepis</i>	HQ171323	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP487224954	<i>Heterocheiroduon yatai</i>	HQ171330	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP5539-27219	<i>Hoplias malabaricus</i>	HQ171346	Oliveira <i>et al.</i> , 2011

LBP4495-24489	<i>Hoplocharax goethei</i>	HQ171324	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
RJ-DNA6	<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>	FJ749004	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
QCAZ 2634	<i>Hyphessobrycon copelandi</i>	--	Presente Estudio
AMNH233428	<i>Hyphessobrycon eques</i>	AY788022	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
RJ-DNA-10	<i>Hyphessobrycon erythrostigma</i>	FJ749015	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
RJ-DNA-4	<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>	FJ749013	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
RJ-DNA16	<i>Hyphessobrycon megalopterus</i>	FJ749018	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
LBP7613-36932	<i>Hyphessobrycon megalopterus</i>	HQ171397	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP1049-8939	<i>Hyphessobrycon reticulatus</i>	HQ171436	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
UFRGS-11129-EC325B	<i>Hyphessobrycon uruguayensis</i>	HM562764	Thomaz <i>et al.</i> , 2010
LBP4266-23840	<i>Iguanodectes geisleri</i>	HQ171316	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
AMNH233400	<i>Inpaichthys kerri</i>	AY788039	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
LBP7067-34380	<i>Jupiaba anteroides</i>	HQ171381	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
MCP-32548	<i>Jupiaba polylepis</i>	FJ749027	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
QCAZ 2590	<i>Jupiaba</i> sp	--	Presente Estudio

QCAZ 2942	<i>Knodus beta</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2868	<i>Knodus breviceps</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2962	<i>Knodus breviceps</i>	--	Presente Estudio
LBP756915818	<i>Knodus meridae</i>	HQ171257	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
RJ2009-MCP-40394	<i>Knodus sp a</i>	FJ749028	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
RJ2009-MCP-33083	<i>Knodus sp t</i>	FJ749029	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
AMNH233223	<i>Knodus sp</i>	AY788041	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
LBP5033-25982	<i>Kolpotocheiroduon theloura</i>	HQ171336	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP4459-24381	<i>Leporinus fasciatus</i>	HQ171321	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2710	<i>Leporinus friderici</i>	--	Presente Estudio
LBP2340-15941	<i>Leporinus lacustris</i>	EU181598	Santos <i>et al.</i> , 2007
LBP3808-21936	<i>Leporinus paranensis</i>	EU181635	Santos <i>et al.</i> , 2007
LBP4137-23661	<i>Leptagoniates steindachneri</i>	HQ171311	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP8094-37519	<i>Lignobrycon myersi</i>	HQ171402	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP1225-38090	<i>Lophiobrycon weitzmani</i>	HQ171411	Oliveira <i>et al.</i> , 2011

LBP603929061	<i>Macropsobrycon uruguayanae</i>	HQ171355	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP3383-21274	<i>Mimagoniates inequalis</i>	HQ171282	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
--	<i>Moenkhausia comma</i>	FJ944730	Vera <i>et al.</i> , 2009
QCAZ 2893	<i>Moenkhausia comma</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2580	<i>Moenkhausia copei</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2951	<i>Moenkhausia copei</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2858	<i>Moenkhausia cotinho</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2901	<i>Moenkhausia grandisquamis</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2920	<i>Moenkhausia grandisquamis</i>	--	Presente Estudio
--	<i>Moenkhausia lepidura</i>	FJ944731	Vera <i>et al.</i> , 2009
--	<i>Moenkhausia melogramma</i>	FJ944732	Vera <i>et al.</i> , 2009
QCAZ 2849	<i>Moenkhausia oligolepis</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2784	<i>Moenkhausia oligolepis</i>	--	Presente Estudio
--	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	AY523588	Hubert <i>et al.</i> , 2005
AMNH233419	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	AY788054	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005

RJ-DNA-12	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	FJ749016	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
LBP6101-28443	<i>Moenkhausia xinguensis</i>	HQ171353	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2908	<i>Moenkhausia</i> sp.1	--	Presente Estudio
QCAZ 2769	<i>Moenkhausia</i> sp.2	--	Presente Estudio
QCAZ 2905	<i>Moenkhausia</i> sp.2	--	Presente Estudio
QCAZ 2845	<i>Myleus duriventre</i>	--	Presente Estudio
LBP2184-15570	<i>Myloplus rubripinnis</i>	HQ171252	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP6104-27476	<i>Nanocheiroduon insignis</i>	HQ171349	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
RJ-DNA-22	<i>Nematobrycon palmeri</i>	FJ749021	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
LBP4052-22932	<i>Odontostilbe fugitive</i>	HQ171302	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP8105-37555	<i>Orthospinus franciscensis</i>	HQ171404	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP4472-24425	<i>Paracheiroduon axelrodi</i>	HQ171322	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP9208-43156	<i>Paragoniates alburnus</i>	HQ171426	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2564	<i>Paragoniates</i> sp	--	Presente Estudio
QCAZ 2781	<i>Paragoniates</i> sp	--	Presente Estudio

LBP1135-5635	<i>Parodon nasus</i>	HQ171429	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2733	<i>Parodon pongoensis</i>	--	Presente Estudio
LBP6105-35623	<i>Phenagoniates macrolepis</i>	HQ171391	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP558227299	<i>Phenacogaster calverti</i>	HQ171347	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2903	<i>Phenacogaster pectinatus</i>	--	Presente Estudio
LBP8514-38382	<i>Piabarchus analis</i>	HQ171412	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP5109-26150	<i>Piabucus melanostomus</i>	HQ171338	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2644	<i>Piabucus melanostomus</i>	--	Presente Estudio
LBP2598-17243	<i>Planaltina britskii</i>	HQ171262	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP3732-21986	<i>Poptella paraguayensis</i>	HQ171286	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP3230-19465	<i>Prionobrama paraguayensis</i>	HQ171272	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP-23663	<i>Prionobrama filigera</i>	JQ820086	Tagliacollo <i>et al.</i> , 2012
QCAZ 2924	<i>Prionobrama filigera</i>	--	Presente Estudio
AMNH233305	<i>Prochilodus nigricans</i>	AY788075	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
QCAZ 2836	<i>Prochilodus nigricans</i>	--	Presente Estudio

LBP612729514	<i>Prochilodus reticulatus</i>	HQ171358	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP2862-18570	<i>Pseudocorynopoma heterandria</i>	HQ171268	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2719	<i>Pygocentrus nattereri</i>	--	Presente Estudio
LBP7146-33170	<i>Rachoviscus crassiceps</i>	HQ171371	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP2755-18529	<i>Roeboides guatemalensis</i>	HQ171267	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
--	<i>Roeboides salvadoris</i>	FJ439411	Ornelas-García <i>et al.</i> , 2008
LBP8157-38066	<i>Roestes ogilviei</i>	HQ171410	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP850-9025	<i>Salminus brasiliensis</i>	HQ171437	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP373122121	<i>Serrapinnus calliurus</i>	HQ171291	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP897241813	<i>Serrapinnus piaba</i>	HQ171416	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2906	<i>Serrapinnus sp</i>	--	Presente Estudio
--	<i>Serrasalmus rhombeus</i>	AF283939	Orti <i>et al.</i> , 2007
--	<i>Serrasalmus rhombeus</i>	AF283937	Orti <i>et al.</i> , 2007
QCAZ 2770	<i>Serrasalmus rhombeus</i>	--	Presente Estudio
--	<i>Steindachnerina guentheri</i>	FJ944748	Vera <i>et al.</i> , 2009

LBP5185-26336	<i>Steindachnerina insculpta</i>	HQ171339	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
QCAZ 2852	<i>Steindachnerina</i> sp	--	Presente Estudio
LBP4078-22994	<i>Stethaprion erythrops</i>	HQ171305	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
--	<i>Stethaprion erythrops</i>	FJ944734	Vera <i>et al.</i> , 2009
LBP3758-22029	<i>Tetragonopterus argenteus</i>	HQ171289	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
--	<i>Tetragonopterus argenteus</i>	FJ944735	Vera <i>et al.</i> , 2009
QCAZ 2618	<i>Tetragonopterus argenteus</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2713	<i>Tetragonopterus argenteus</i>	--	Presente Estudio
LBP8268-37556	<i>Tetragonopterus chalceus</i>	HQ171405	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
RJ DNA-34	<i>Thoracocharax stellatus</i>	FJ748992	Javonillo <i>et al.</i> , 2010
QCAZ 2649	<i>Thoracocharax</i> sp	--	Presente Estudio
QCAZ 2664	<i>Thoracocharax</i> sp	--	Presente Estudio
--	<i>Triportheus albus</i>	FJ944736	Vera <i>et al.</i> , 2009
QCAZ 2699	<i>Triportheus cf albus</i>	--	Presente Estudio
QCAZ 2846	<i>Triportheus cf albus</i>	--	Presente Estudio

AMNH233403	<i>Triportheus angulatus</i>	AY788082	Calcagnotto <i>et al.</i> , 2005
QCAZ 2889	<i>Triportheus auritus</i>	--	Presente Estudio
--	<i>Triportheus magdalenae</i>	FJ944738	Vera <i>et al.</i> , 2009
LBP39-3503	<i>Triportheus nematurus</i>	HQ171383	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP2663-15580	<i>Triportheus orinocensis</i>	HQ171253	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP-39-3501	<i>Triportheus pantanensis</i>	GQ368200	Abe <i>et al.</i> , 2009
--	<i>Triportheus paranensis</i>	U33623	Ortí y Meyer, 1997
LBP5145-33166	<i>Tyttocharax madeirae</i>	HQ171368	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP3074-19694	<i>Xenagoniates bondi</i>	HQ171274	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
LBP9054-42218	<i>Xenobrycon pteropus</i>	HQ171423	Oliveira <i>et al.</i> , 2011

---

**Tabla 4.** Modelos de evolución seleccionados para las particiones en los análisis filogenéticos con el programa JModelTest (Posada, 2008).

Gen	Partición	Modelos	Gamma	p-inv	Tasas de Sustitución						Frecuencias			
					AC	AG	AT	CG	CT	GT	A	T	G	C
16S	Loop	GTR+I+ G	0,837	0,029	2,4585	8,152	3,8602	0,715	19,3915	1	0,4717	0,1793	0,0989	0,258
	Stem	GTR+I+ G	0,599	0,470	3,1071	8,4903	2,8635	0,3513	21,1706	1	0,3158	0,2059	0,208	0,2703

**Tabla 5.** Distancias genéticas  $p$  no corregidas del gen 16S entre los peces hacha (Gasteropelecidae). Se muestra el promedio, la desviación estándar ( $\pm$ ) y el rango para cada variable entre paréntesis de *Gasteropelecus* QCAZ 2855 (1), *G. maculatus* (2), *G. sternicla* (3), *Thoracocharax stellatus* (4), *T.* QCAZ 2649—2664 (5).

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
(1)	-				
(2)	0.06445672	-			
(3)	0.07304348	0.07050093	-		
(4)	0.04545455	0.06642066	0.06690141	-	
(5)	0.095 $\pm$ 0.000 (0.094-0.095)	0.098 $\pm$ 0 (0.092-0.092)	0.090 $\pm$ 0.001 (0.089-0.091)	0.088 $\pm$ 0.000 (0.088-0.088)	-

**Tabla 6.** Distancias genéticas  $p$  no corregidas del gen 16S entre los peces del género *Triportheus* (Pechón). Se muestra el promedio, la desviación estándar ( $\pm$ ) y el rango para cada variable entre paréntesis de *T. orinocensis* (1), *T. paranensis* (2), *T. pantanensis* (3), *T. nematurus* (4), *T. auritus* QCAZ 2889 (5), *T. albus* (6), *T. magdalenae* (7), *T. QCAZ 2699—2846* (8), *T. angulatus* (9).

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
(1)	-								
(2)	0.0254	-							
(3)	0.0242	0.0156	-						
(4)	0.0341	0.0371	0.0391	-					
(5)	0.0667	0.0763	0.0710	0.0521	-				
(6)	0.0439	0.0436	0.0421	0.0396	0.0625	-			
(7)	0.0480	0.0653	0.0609	0.06041	0.0583	0.0542	-		
(8)	0.021 $\pm$ 0 (0.021-0.021)	0.009 $\pm$ 0 (0.009-0.009)	0.020 $\pm$ 0 (0.020-0.020)	0.027 $\pm$ 0 (0.027-0.027)	0.064 $\pm$ 0.000 (0.063-0.064)	0.039 $\pm$ 0 (0.039-0.039)	0.058 $\pm$ 0 (0.058-0.058)	-	
(9)	0.0592	0.0644	0.0541	0.0449	0.0551	0.0584	0.0582	0.0518 $\pm$ 0.000 (0.051-0.051)	-

**Tabla 7.** Distancias genéticas  $p$  no corregidas del gen 16S entre los tetras de *Paragoniates alburnus* y los especímenes de Yasuní. Se muestra el promedio, la desviación estándar ( $\pm$ ) y el rango para cada variable entre paréntesis de *P. alburnus* (1) y *P. QCAZ 2564—2781* (2)

	(1)	(2)
(1)	-	
(2)	0.058 $\pm$ 0.000 (0.058-0.058)	0.003 $\pm$ 0.000 (0.003-0.003)

**Tabla 8.** Distancias genéticas  $p$  no corregidas del gen 16S entre los tetras *Aphyocharax*. Se muestra el promedio, la desviación estándar ( $\pm$ ) y el rango para cada variable entre paréntesis de *A. QCAZ 2870* (1), *A. dentatus* (2), *A. QCAZ 2581* (3), *A. rathbuni* (4), *A. alburnus* (5), *A. nattereri* (6), *A. pussilus* (7), *A. anisitsi* (8).

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
(1)	-							
(2)	0.0368	-						
(3)	0.04948	0.03875	-					
(4)	0.02524	0.02131	0.03682	-				
(5)	0.04077	0.02906	0.03100	0.02713	-			
(6)	0.07378	0.06976	0.08139	0.06007	0.06782	-		
(7)	0.04607	0.02906	0.02721	0.02713	0.013560	0.07170	-	
(8)	0.04077	0.02906	0.03682	0.02713	0.02519	0.06782	0.03100	-

**Tabla 9.** Distancias genéticas  $p$  no corregidas del gen 16S entre las sardinitas *Moenkhausia*. Se muestra el promedio, la desviación estándar ( $\pm$ ) y el rango para cada variable entre paréntesis de *M. comma* (1), *M. comma* QCAZ 2893 (2). *M. grandisquamis* QCAZ 2901—2920 (3), *M. lepidura* (4), *M. oligolepis* QCAZ 2784—2849 (5), *M. sanctaefilomenae* (6), *M. sp.2* QCAZ 2769—2905 (7), *M. sp.1* QCAZ 2908 (8), *M. cotinho* (9).

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
(1)	-								
(2)	0.0145	-							
(3)	0.035 $\pm$ 0.001 0.035-0.037	0.040 $\pm$ 0.001 0.039-0.041	0.001 $\pm$ 0 0.001-0.001						
(4)	0.0373	0.0414	0.053 $\pm$ 0.001 0.051-0.054	-					
(5)	0.114 $\pm$ 0.005 0.110-0.118	0.108 $\pm$ 0.005 0.104-0.112	0.112 $\pm$ 0.005 0.106-0.117	0.115 $\pm$ 0.001 0.114-0.116	0.024 $\pm$ 0 0.024				
(6)	0.109 $\pm$ 0.001 0.108-0.111	0.111 $\pm$ 0.002 0.109-0.147	0.117 $\pm$ 0.001 0.115-0.118	0.111 $\pm$ 0.001 0.110-0.113	0.062 $\pm$ 0.003 0.058-0.067	0.001 $\pm$ 0 0.001-0.001			
(7)	0.096 $\pm$ 0 0.096-0.096	0.093 $\pm$ 0.002 0.091-0.093	0.105 $\pm$ 0.003 0.103-0.110	0.089 $\pm$ 0 0.098-0.098	0.140 $\pm$ 0.007 0.130-0.145	0.122 $\pm$ 0.005 0.114-0.128	-		
(8)	0.1043	0.1024	0.110 $\pm$ 0.0005 0.110-0.111	0.1106	0.147 $\pm$ 0.010 0.139-0.154	0.127 $\pm$ 0.006 0.122-0.134	0.059 $\pm$ 0.003 0.056-0.062	-	
(9)	0.1062	0.0984	0.107 $\pm$ 0.001 0.106-0.108	0.1104	0.107 $\pm$ 0.009 0.100-0.114	0.092 $\pm$ 0.002 0.090-0.095	0.109 $\pm$ 0.003 0.106-0.112	0.1120	-

**Tabla 10.** Distancias genéticas  $p$  no corregidas del gen 16S entre los tetras americanos *Astyanacinus*. Se muestra el promedio, la desviación estándar ( $\pm$ ) y el rango para cada variable entre paréntesis de *Astyanacinus* sp. (1), *A. moorii* (2), *A. multidentis* (3), *A. sp.* QCAZ 2927 (4).

	(1)	(2)	(3)	(4)
(1)	-			
(2)	0.00173611	-		
(3)	0.04779412	0.04595588	-	
(4)	0.02787456	0.03125	0.04788214	-

## 9. ANEXOS

## **Anexo 1.** Protocolo de extracción de ADN usando Tiocinato de Guanidina

### LISIS CELULAR

1. Calentar el Buffer de lisis a 55°C para que el SDS vuelva a estar en solución
2. Macerar lo mejor posible ~ 10 mg de tejido (músculo, hígado o dedo) en un portaobjeto con una Gillette estéril o bisturí, y transferirlo a un tubo de 1.5ml.
3. Añadir 400µl de Buffer de Lisis y 4µl de Proteinasa K (20mg/µl), al tejido y dar un breve vórtex .
4. Incubar la muestra a 55°C de 3-6 horas o hasta que el tejido este completamente macerado, agitando las muestras cada 30-60 minutos. Si el tejido no se ha macerado luego de las 6 horas, dejarlo durante la noche de incubación añadiendo previamente 2µl más de Proteínas K.
5. Luego de la incubación, homogenizar la muestra con un breve córtex.
6. Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente

### PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

1. Añadir 200µl de Solución de Precipitación de proteínas a la muestra de tejido macerado , y dar vórtex por 10-20 segundos.
2. Centrifugar a 13.000 rpm durante 13 minutos. Repetir si es que no se ha formado un pelet firme.
3. Decantar o pipetear el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5ml (contiene ADN), descartar el tubo con el pellet que contiene proteínas y demás desechos.

## PRECIPITACIÓN DE ADN

1. Añadir 300µl de Isopropanol frío (-20°C) a la solución con AND, mezclar cuidadosamente el contenido invirtiendo el tubo varias veces.
2. Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 8 minutos
3. Descartar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el pellet de ADN.
4. Añadir 300µl de etanol al 70% e invertir varias veces el tubo para lavar el pellet.
5. Centrifugar a 13.000 rpm durante 8 minutos.
6. Dejar evaporar el remanente de etanol a temperatura ambiente dejando el tubo abierto (~20-30min). Si el pellet se deshidrata demasiado será más difícil re-hidratarlo.

## TRATAMIENTO CON NaOAc, REHIDRATACIÓN, Y ALMACENAMIENTO

1. Añadir de 100µl de 10mM Tri-HCl, pH 8.0 al pellet y mezclar, debe resuspenderse completamente (24 horas), guardar a 4°C.
2. Al siguiente día añadir 10µl de 3M NaOAc y 100µl de isopropanol frío, invertir el tubo varias veces.
3. Centrifugar a 13000 rpm por 13 minutos y descartar el sobrenadante
4. Añadir 300µl de 70% etanol e invertir el tubo varias veces para lavar el pellet.
5. Centrifugar a 13000rpm por 8 minutos y descartar el etanol.
6. Dejar evaporar el remanente de etanol a temperatura ambiente dejando el tubo abierto (~20-30min). Si el pellet se deshidrata demasiado será más difícil re-hidratarlo.

7. Resuspender el pellet añadiendo 50 $\mu$ l de 0.1 TE ph8.0.
8. Guardar este stock a -20°C. Alícuotas de mayor dilución en dH<sub>2</sub>O se pueden guardar a 4°C.

**Anexo 2.** Protocolo de electroforesis en gel de agarosa y tinción de ADN

1. Pesar 1 gr de Agarosa (en polvo)
2. Colocar la agarosa en un Erlenmeyer y añadir 100 ml de Buffer TBE 0.5X y mezclar.
3. Calentar la solución en el microondas por 1 minuto hasta que se disuelva completamente.
4. Dejar enfriar la solución por algunos minutos
5. Armar el recipiente de tinción y colocar la peinilla adecuada en uno de los extremos.
6. Añadir el gel en el recipiente desde un extreme, teniendo cuidado de no formar burbujas. Dejar enfriar y solidificar el gel por 20 minutos, luego se puede colocar en la refrigeradora a 4°C por 10 minutos.
7. Una vez sólido el gel retirar la peinilla cuidadosamente.
8. Recortar un trozo de Parafilm y colocar 1.5 µl del Buffer de carga (refrigerado a 4°C) por cada muestra.
9. Mezclar cuidadosamente el tubo que contiene el AND y extraer 2.0 de AND con una pipeta, añadir al tinte y mezclar con la misma pipeta. Recoger con la pipeta la gota formada y colocar cuidadosamente en el pocillo del gel.
10. Repetir el paso anterior con el resto de muestras y en el pocillo posterior colocar 2.5 µl de ADN ladder.
11. Colocar el recipiente con el gel (previamente quitar los cauchos) en la cámara de electroforesis que contiene Buffer TBE 0.5X y correr por 40 minutos a 90 V.

12. Al terminar la corrida recortar la parte del gel que contiene las muestras con la espátula y colocar en el recipiente que contiene Sybr Safe (10  $\mu$ l) y Buffer TBE 0.5X. El recipiente debe estar cubierto con papel aluminio y dentro de una caja que impida el contacto con la luz y la desnaturalización del Sybr Safe.
13. El resto del gel guardar en un Erlenmeyer y tapar con papel aluminio para evitar la deshidratación.
14. Colocar la caja en el Mezclador por 25 min a 15 rpm.
15. Finalmente observar y tomar la fotografía en el Capturador de Imágenes
16. Se puede reutilizar el gel hasta 5 veces.

**Anexo 3.** Factor Bayes donde se muestran los valores de los modelos CON (con particiones) y SIN (sin particiones). Se muestra Ln P (model / data), E.S. (error estandar). Los valores del factor bayesiano son >10 lo que indica un buen soporte y el valor más alto fue para la estrategia con particiones.

	<b>ln P</b>	<b>S.E.</b>	<b>CON1</b>	<b>CON2</b>	<b>CON3</b>	<b>CON4</b>	<b>SIN1</b>	<b>SIN2</b>	<b>SIN3</b>	<b>SIN4</b>
<b>CON1</b>	-18858.046	+/-0.927	-	3.119	16.364	-2.851	247.623	114.421	123.029	115.72
<b>CON2</b>	-18861.164	+/-0.978	-3.119	-	13.246	-5.969	244.504	111.303	119.91	112.602
<b>CON3</b>	-18874.41	+/-1.333	-16.364	-13.246	-	-19.215	231.258	98.057	106.665	99.356
<b>CON4</b>	-18855.195	+/-0.79	2.851	5.969	19.215	-	<b>250.473</b>	117.272	125.88	118.571
<b>SIN1</b>	-19105.668	+/- 3.972	-247.623	-244.504	-231.258	-250.473	-	-133.201	-124.594	-131.902
<b>SIN2</b>	-18972.467	+/- 0.661	-114.421	-111.303	-98.057	-117.272	133.201	-	8.608	1.299
<b>SIN3</b>	-18981.075	+/- 0.763	-123.029	-119.91	-106.665	-125.88	124.594	-8.608	-	-7.309
<b>SIN4</b>	-18973.766	+/- 0.704	-115.72	-112.602	-99.356	-118.571	131.902	-1.299	7.309	-