



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,
Oceánicas y Recursos Naturales**

**“FILOGEOGRAFÍA MOLECULAR DEL GUANCHICHE
HOPLIAS SPP. (CHARACIFORMES: ERYTHRINIDAE)
DE LA COSTA ECUATORIANA”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del título de:

BIÓLOGO

Presentado por:

ROBERTO VALENTINO CUCALÓN TAMAYO

LEANDRO STALIN BAJAÑA ZAMBRANO

Guayaquil-Ecuador

2015

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la ESPOL y a nuestros profesores quienes aportaron con sus conocimientos y paciencia para nuestra formación académica. A nuestro director Windsor Aguirre, quien estuvo siempre pendiente en cada paso del desarrollo de esta tesis. A Ronald Navarrete y la Dra. Paola Calle quienes proporcionaron mucha ayuda para la colección de especímenes y colecta de las muestras de tejido, al igual que nuestros compañeros Juan Carlos Granda, Cristhian Montero y Marina Chávez. A nuestros evaluadores, Dr. Marcelo Muñoz y al Msc. Ecuador Marcillo por sus conocimientos y ayuda brindada durante el transcurso del presente proyecto. Queremos hacer un agradecimiento especial a la Dra. Alba Calles, quien estuvo presente desde el inicio hasta la culminación de nuestro camino universitario.

DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo incondicional
en todas las etapas de mi vida.

A la mujer que amo, Pierina García.

Roberto Cucalón

A todas esas personas curiosas que
buscan una explicación de las cosas.

Leandro Bajaña

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ana Tirapé Bajaña Ph.D
PRESIDENTE TRIBUNAL

Windsor E. Aguirre Ph.D.
DIRECTOR DE TESIS

Paola Calle Delgado Ph.D.
CO-DIRECTOR DE TESIS

M.Sc. Ecuador Marcillo G.
MIEMBRO PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL".

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Leandro Stalin Bajaña Zambrano

Roberto Valentino Cucalón Tamayo

RESUMEN

El “guanchiche” (*Hoplias spp.*), es uno de los depredadores más importantes en ecosistemas dulceacuícolas en Latinoamérica y tiene una distribución muy amplia encontrándose desde Costa Rica hasta Argentina. En el Ecuador se aprovecha principalmente como fuente de proteína en las áreas rurales y se registran dos especies: *Hoplias microlepis* en el suroccidente y *Hoplias malabaricus* en el noroccidente y en el Oriente. Estas especies suelen ser confundidas debido a su parecido morfológico lo cual ha causado problemas de identificación en diversas zonas de América del Sur. Existen pocos estudios de diversidad de especies a nivel molecular en el país pese a los problemas ambientales promovidos por las actividades antropogénicas, que alteran de forma considerable los diversos ecosistemas. En el presente estudio se realizó un análisis a nivel molecular usando secuencias de los genes ATPasa y Región de Control del ADN mitocondrial para determinar las relaciones evolutivas de las poblaciones de *Hoplias spp.* en la región occidental del Ecuador. Los resultados muestran que las poblaciones de *H. microlepis* se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo de la

costa, desde la provincia de El Oro hasta la provincia de Esmeraldas, confirmando además la presencia de *Hoplias malabaricus* en el Oriente. Se encontró una tercera especie del género *Hoplias* no identificada, ubicada en la cuenca Santiago-Cayapas, provincia de Esmeraldas siendo morfológicamente similar a *H. malabaricus* pero genéticamente diferente de *H. microlepis* y *H. malabaricus* del Oriente. *H. microlepis*, presenta poblaciones genéticamente estructuradas en relación al sistema hidrográfico al que pertenece y la distancia de separación geográfica entre las poblaciones. Las poblaciones de *H. microlepis* que habitan en los ríos tienden a presentar alta diversidad genética ($\geq 0,76$) debido a la mayor cantidad de flujo genético que existe en comparación con aquellas que habitan en represas ($\approx 0,50$), donde el flujo genético es más restringido. La información obtenida de esta tesis servirá como base para estudios sobre la estructura poblacional de otras especies en la región Costa, aportando además con importantes datos relacionados a los recursos genéticos del Ecuador.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	VI
ABREVIATURA.....	XII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	5
1 GENERALIDADES.....	5
1.1 Región Costa.....	6
1.1.1 Clima.....	6
1.1.2 Hidrografía.....	7
1.1.3 Historia de los Ríos de la Costa	12
1.2 Biodiversidad o Diversidad Biológica.....	13
1.2.1 Diversidad Genética	14
1.2.2 Diversidad Taxonómica	15
1.3 Peces de Agua Dulce.....	16
1.3.1 Pesca de Agua Dulce en la Costa Ecuatoriana.....	17

1.4	Generalidades del Guanchiche (<i>Hoplias spp.</i>) en el Ecuador.....	18
1.4.1	Clasificación Taxonómica.....	18
1.4.2	Distribución.....	20
1.4.3	<i>Hoplias microlepis</i>	20
1.4.4	<i>Hoplias malabaricus</i>	22
1.5	Biología Molecular	23
1.6	Marcadores genéticos	26
1.6.1	ADN: Nuclear y Mitocondrial	28
1.7	Filogeografía.....	32
CAPITULO II.....		35
2	MATERIALES Y METODOS	35
2.1	Muestreo.....	35
2.2	Metodología molecular	37
2.2.1	Extracción de ADN	38
2.2.2	Concentración de ADN.....	39
2.2.3	PCR.....	39
2.2.4	Electroforesis.....	40
2.2.5	Purificación y Secuenciación de los Productos de PCR	41
2.2.6	Alineamiento de las Secuencias de ADN	41

2.3	Análisis Estadístico	42
2.3.1	Análisis Filogenético	42
2.3.2	Red de haplotipos.....	44
2.3.3	Diversidad genética.....	45
2.3.4	Diferencias Pareadas F_{ST}	46
2.3.5	AMOVA	47
CAPITULO III.....		48
3	RESULTADOS.....	48
3.1	Análisis Filogenético.....	48
3.2	Diversidad y Estructura Genética de las Poblaciones de Guanchiche en la Costa Ecuatoriana.....	53
3.3	Red de Haplotipos.....	61
3.4	Diferencias Pareadas F_{ST}	64
3.5	AMOVA, <i>Hoplías spp.</i> ATPasa y Región de Control.....	71
3.6	AMOVA, <i>Hoplías microlepis</i> ATPasa y Región de control.....	72
CAPITULO IV.....		74
4	DISCUSIÓN.....	74
4.1	Distribución y problemas en la taxonomía del genero <i>Hoplías</i>	74
4.2	Uso de marcadores genéticos en estudios de evolución y biodiversidad.....	78

4.3 Filogeografía y estructura poblacional de <i>H. microlepis</i> en la costa ecuatoriana.....	79
4.4 Conservación y pesquería.....	84
CAPITULO V.....	85
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	85
GLOSARIO.....	88
ANEXOS.....	93
A. Anexo: Figura y tabla informativa.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	106

ABREVIATURA

ADN Ácido desoxirribonucleico.

ADNmt Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

AFLP Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, más conocidos por su acrónimo inglés AFLP.

ARN Ácido ribonucleico.

ARNt Ácido ribonucleico de transferencia.

BSA Albúmina de Suero Bovino.

CR Región de control.

dNTP deoxinucleósido trifosfato. Se distinguen el dATP, dCTP, dTTP y dGTP.

H Haplotipo.

IGM Instituto Geográfico militar.

INP Instituto Nacional de Pesca.

mA Mili amperio.

MAGAP Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.

MI Mililitro.

mM Milimolar.

N Número de muestra.

nADN Ácido desoxirribonucleico nuclear.

NCBI National Center for Biotechnology Information.

ng Nanogramo.

ORF Open Reading Frame.

pb Pares de bases.

PCR Reacción en Cadena Polimerasa (siglas en inglés).

Taq polimerasa tipo de ADN polimerasa termoestable, nombrada de esta forma debido a que es producida por la bacteria *Thermus aquaticus* (T-aq).

μl Microlitro

μM Micromolar

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Sitios muestreados dentro de cada cuenca hidrográfica con sus respectiva áreas.....	37
Tabla II Especies para grupo externo usado en el análisis filogenético para el gen ATPasa.....	43
Tabla III. Frecuencia de haplotipos por localidad de <i>Hoplias</i> spp. del gen ATPasa.....	54
Tabla IV. Frecuencia de haplotipos por localidad de <i>Hoplias</i> spp. de la Región de Control.....	55
Tabla V. Diversidad genética de <i>Hoplias</i> spp. en el Ecuador por sitio (Gen ATPasa).	58
Tabla VI. Diversidad genética de <i>Hoplias</i> spp. por cuencas hidrográficas (Gen ATPasa).	58
Tabla VII. Diversidad genética de <i>Hoplias</i> spp. por sitio (Región de Control)	60
Tabla VIII. Diversidad genética de <i>Hoplias</i> spp. por cuenca hidrográfica (Región de Control)	60
Tabla IX. Matriz de diferencias pareadas F_{ST} y valor P para el gen ATPasa del género <i>Hoplias</i> en el Ecuador	67

Tabla X. Matriz de diferencias pareadas F_{ST} y valor P para la CR del género Hoplías en el Ecuador	68
Tabla XI. Matriz de significancia de los valores p, poblaciones de <i>Hoplías</i> (ATPasa y CR) en el Ecuador,	69
Tabla XII. Matriz de diferencias pareadas F_{ST} y valor P para el gen ATPasa por Cuencas hidrográficas.....	69
Tabla XIII. Matriz de diferencias pareadas F_{ST} y valor P para la CR por cuenca hidrográfica	70
Tabla XIV. Matriz de significancia de los valores p, poblaciones de Hoplias (ATPasa y CR) por cuencas hidrográficas.	70
Tabla XV. AMOVA de las poblaciones de Hoplias spp. muestreadas en el Ecuador agrupadas por cuencas hidrográficas.	72
Tabla XVI. AMOVA de la región de control de poblaciones de Hoplias micolepis agrupadas por cuencas hidrográficas en la costa ecuatoriana.	73
Tabla XVII Tabla informativa de las especies muestreadas.	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. División por cuencas hidrográficas del Ecuador;	11
Figura 2. Representación del ADN mitocondrial.	30
Figura 3. Puntos muestreados por cuencas hidrográfica en el Ecuador.	36
Figura 4. Árbol Filogenético de <i>Hoplias spp</i> en el Ecuador a partir del gen ATPasa.....	50
Figura 5. Árbol filogenético de <i>Hoplias spp.</i> en el Ecuador a partir de la Región de Control.	52
Figura 6. Red de Haplotipos de <i>Hoplias spp.</i> para el gen ATPase del ADNmt	62
Figura 7. Red de Haplotipos de <i>Hoplias spp.</i> para la CR del ADNmt.	63

INTRODUCCIÓN

Cada organismo es producto de interacciones complejas entre los genes y el ambiente. La forma en que han cambiado o evolucionado los organismos a través del tiempo ha sido un punto básico en la investigación y debate en la Biología. Muchos estudios han tratado de entender el origen de las similitudes y diferencias tanto funcionales como estructurales entre organismos. Estos tipos de estudios nos permiten entender mejor la diversidad biológica que existe en el planeta y también pueden informar cómo se relacionan los organismos entre sí y cómo han llegado a ser lo que son en la actualidad (1).

Gracias a la evolución es que se pueden observar diferentes características o alelos en las distintas especies y la variación de especies, es decir, la biodiversidad. Los cambios que se producen se originan en los individuos dentro una población, en el material genético de los individuos y se pueden manifestar en el cariotipo, cromosomas o a nivel molecular (2) (3).

La evolución por la selección natural es la teoría que mejor explica la variedad de poblaciones y especies que existen. De acuerdo con esta teoría, un rasgo o alelo cambia, aumentando la supervivencia de la especie en diferentes sitios y momentos (1) (3) (2).

Un organismo que ha logrado el éxito está adaptado a su medio. Como ejemplo tenemos a las jirafas que poseen un cuello largo, adaptado para alcanzar las hojas en las partes altas de los árboles; los ancestros de las jirafas poseían cuellos más cortos. Las jirafas presentaron variación genética en la longitud de sus cuellos, así los que poseían cuellos más cortos estaban en desventaja y no sobrevivieron. Como consecuencia, a través del tiempo la especie evolucionó a cuellos más largos (1).

Es importante saber sobre nuestra diversidad, que es un proceso continuo de formación y extinción y por tanto, es un proceso activo en la actualidad aunque no sea evidente por nuestra perspectiva espacial y temporal (2). La biodiversidad constituye un patrimonio importante del país y muchas especies de plantas y animales son endémicos en el Ecuador, es decir, no se encuentran en ninguna otra parte del planeta. Por ejemplo, tenemos cuarenta y un especies de mamíferos: veintinueve roedores (*Reithrodontomys soderstromi*, *Aegialomys galapagoensis*, *Akodon latebricola*, *Anotomys leander*, *Chibchanomys orcesi*, *Hylaeamys tatei*, *Megaoryzomys curioi*, *Mindomys hammondi*, *Necromys punctulatu* y otros), ocho murciélagos (*Lonchophylla orcesi*, *Lophostoma aequatorialis*, *Lophostoma yasuni*, *Micronycteris giovanniae*, *Sturnira perla*, *Sturnira* sp., *Cabreramops aequatorianus*, *Myotis diminutus*), dos lobos marinos (*Arctocephalus galapagoensis*, *Zalophus wollebaeki*), una musaraña (*Cryptotis montivaga*) y una especie de ratón marsupial (*Caenolestes condorensis*) (4). Para el caso

de plantas tenemos aproximadamente más de ochenta ejemplares. Ejemplo: *Codonanthe erubescens*, *Besleria miniata*, *Besleria quadrangulata*, *Alloplectus penduliflorus*, *Columnnea mastersonii*, entre otros (5).

Existe una obligación moral de preservar este patrimonio de la humanidad, así las nuevas generaciones puedan admirar la megadiversidad que ofrece nuestro país, para su uso sustentable o de bioprospección y todo esto dependerá de que los ecosistemas se mantengan saludables. En Ecuador existe la “Ley de Gestión Ambiental” (julio de 1999) que establece los principios y directrices de política ambiental, donde determina obligaciones, responsabilidades y niveles de participación de los sectores públicos y privados en la gestión ambiental (6). Todo esto se basa en los principios establecidos en la Carta de la Tierra, que no eran obligatorios en un comienzo y que ahora forman parte del ordenamiento jurídico ecuatoriano (6).

Las especies juegan papeles importantes para el funcionamiento de los ecosistemas. Más aún, la diversidad del ecosistema puede impactar su estabilidad (6). Todos los seres humanos, en especial personas en áreas rurales, dependen de las funciones que cumple el ecosistema para la producción de agua limpia, aire y alimento. La salud humana puede verse afectada si no existe un ambiente sano debido a la degradación del

ecosistema y una vez más, suelen ser las personas de menos recursos en áreas rurales que sufren más (7) (6).

Lamentablemente, aún se conoce muy poco acerca de la biología básica e historia evolutiva de la mayoría de las especies de animales y plantas sobre la Tierra. Este es el caso para los organismos del Ecuador.

Por lo tanto, el objetivo de esta tesis es usar marcadores moleculares basados en ADNmt para contribuir al conocimiento de las relaciones evolutivas entre poblaciones y especies de peces de agua dulce del género *Hoplias*, con énfasis en la región occidental del Ecuador. Para determinar estas relaciones se elaborarán árboles filogenéticos basados en dos genes mitocondriales (ATPasa y Región de Control). Se determinarán los niveles de magnitud de diferenciación y variación genética para estas regiones. Esto nos ayudará a reconocer si existe una relación entre la distribución geográfica del guanchiche y la diversidad de linajes genéticos existentes en la costa ecuatoriana.

CAPITULO I

1 GENERALIDADES

La República del Ecuador se encuentra ubicada entre los paralelos 01°30´ N y 03°23.5´ S y los meridianos 75°12´ W y 81°00´W en la costa noroccidental de América del Sur (Figura 1 a). Sus Cuatro regiones naturales; región Costa o Litoral, región Sierra o Interandina, región Oriental o Amazónica y la región Insular o Galápagos, denotan la diversidad de climas que posee el País. La presencia del Ecuador en el territorio Antártico permite considerar a esta zona como una quinta región natural (8).

La topografía montañosa como la cordillera de los Andes que atraviesa al País continental de norte a sur, la influencia del mar, con la presencia de la corriente fría de Humboldt y la corriente cálida de Panamá, dan como resultado un clima muy variado (8). Las cuatro estaciones climáticas no presentan significancia en esta latitud. En la costa, se presenta una estación

lluviosa llamada “invierno” para los meses de diciembre a mayo, y una estación seca llamada “verano” de junio a noviembre.

1.1 Región Costa

Limita al norte con Colombia, al sur con Perú, al este con el lado occidental de la cordillera de los Andes y al oeste con el océano Pacífico. La región Costa se encuentra dividida políticamente de norte a sur por seis provincias, Esmeraldas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí, Los Ríos, Guayas, Santa Elena y El Oro. Está formado por colinas, cuencas sedimentarias, elevaciones de poca altitud, terrenos anegadizos, salitrales, manglares y llanuras fértiles que favorecen a la agricultura (8).

1.1.1 Clima

El clima en esta región es de tipo tropical, y se subdivide en clima tropical húmedo, clima tropical monzón, clima tropical de sabana y clima tropical seco (8). De forma general se caracteriza por la abundante precipitación pluviométrica en los meses de “invierno” acompañado de exuberante vegetación. El clima tropical húmedo se lo encuentra principalmente al noroeste de la costa de Esmeraldas. Presenta un paisaje selvático, con lluvias durante todo el año, siendo más predominantes en “invierno” y menos abundantes en “verano”. La humedad relativa es superior al 85%, nubosidad considerable y una temperatura anual promedio superior a

los 25°C. El clima tropical monzón se localiza en las regiones que comienzan la franja costera al noroeste hasta Bahía de Caráquez y luego se alarga hacia el sur cerca del límite con Perú, posee una temperatura media anual ligeramente inferior a los 25°C. Tiene precipitaciones marcadas en “invierno” y un “verano” relativamente seco. En las provincias de Manabí, Guayas, El Oro y Loja encontramos el clima tropical de sabana, el cual se caracteriza por los veranos secos y un invierno con lluvias de enero a mayo, con precipitaciones inferiores a 1000mm. La humedad relativa oscila entre 70% y 80% con una temperatura máxima entre 32°C hasta 36°C y mínimas de 13°C a 18°C. El clima tropical seco se manifiesta especialmente sobre la península de Santa Elena, la parte sur de la isla Puná y las partes bajas de las islas Galápagos donde la corriente de Humboldt tiene influencia directa. Las condiciones secas se las atribuye a los vientos fríos suroccidentales acompañados de la corriente fría de Humboldt (8).

1.1.2 Hidrografía

La República del Ecuador está dividida hidrográficamente por dos vertientes regionales principales que se originan de la cordillera de los Andes, de donde se desarrollan la mayor parte de los ríos ecuatorianos. Los ríos del lado oriental van a desembocar al río Amazonas y los ríos que viajan hacia la región Litoral terminan en el océano Pacífico. Pero también van al callejón interandino las descargas de la vertiente oriental de la cordillera

occidental y vertiente occidental de la cordillera Real de donde se distingue una serie de cauces que desembocan en la cuenca amazónica y la cuenca del Pacífico sumándose a las descargas antes mencionadas (9).

1.1.2.1 Cuencas Hidrográficas

Una cuenca hidrográfica se define como una unidad territorial en la cual el agua que cae por precipitación se reúne y escurre a un punto común o que fluye todo al mismo río, lago o mar. La parte subterránea también es considerada parte de la cuenca, cuya profundidad comprende desde el extremo superior de la misma hasta los estratos geológicos limitantes bajo la tierra (10).

La Secretaría Nacional de Agua ex Consejo Nacional de Recursos Hídricos (2009) divide a la vertiente del Pacífico en 72 cuencas hidrográficas, mientras que la vertiente del Amazonas en 7 cuencas hidrográficas. Es decir, el Ecuador posee un total de 79 cuencas hidrográficas (Figura 1), 137 subcuencas definidas y aproximadamente 890 microcuencas no definidas completamente.

Dentro de las cuencas más importantes de la costa ecuatoriana tenemos:

Cuenca del Río Guayas

Es el más importante río navegable de la costa. Comprende una superficie de 32 600 km² hasta la ciudad de Guayaquil. El relieve de la cuenca del río Guayas es variado. Está conformada por seis subcuencas correspondientes a los ríos Daule, Babahoyo, Vinces, Chimbo, Taura y Churute, que se alimentan con los afluentes provenientes de la vertiente oriental de la cordillera costera Chongón – Colonche y de la vertiente occidental de la cordillera occidental de los Andes (11).

Cuenca del Río Esmeraldas

Corresponde a uno de los más importantes de la costa ecuatoriana. Es originario de los vertientes del Cayambe, Antizana, Sincholagua, Cotopaxi, Illinaza, Atacazo y Pichincha. Se forma de la Unión de los ríos Blanco y Quinindé, regando zonas agrícolas importantes dentro de la provincia del mismo nombre. Toda la cuenca hidrográfica abarca un total de 21.060 km² y posee un contenido alto en humos y materias nitrogenadas (12).

Cuenca del Río Santiago-Cayapas

Está ubicado al noreste en la provincia de Esmeraldas, nace en la cordillera de Toisan. Es la cuenca que se encuentra en la parte más húmeda de la costa ecuatoriana. Entre sus afluentes están el río Chimbogal y el río San Miguel. Tiene un área total de 6080,32 km² (13).

Cuenca del Río Chone

El río Chone nace de la cordillera de Balzar siendo uno de los ríos más grandes e importantes de la Costa ecuatoriana que no nace de la cordillera de los Andes. Se forma de la unión del río Grande y el río Garrapata. Fluye por tierras manabitas incluyendo la ciudad de Chone hasta desembocar en el océano Pacífico en Bahía de Caraquez (provincia de Manabí). Posee un área de 2483 km². Este río es altamente propenso a desbordar su cauce debido a la dinámica de la cuenca, lo que ha provocado problemas de inundaciones importantes en las poblaciones cercanas (14).

Cuenca del Río Santa Rosa

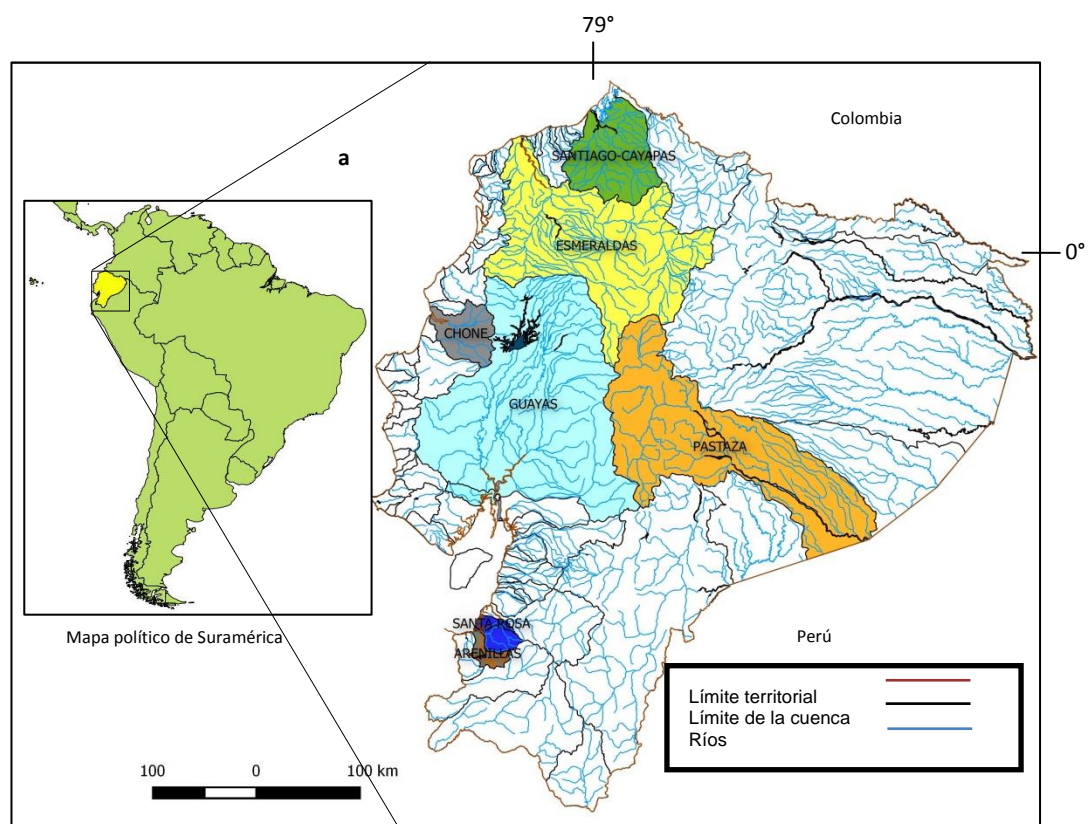
Ubicado en la provincia de El Oro, está conformado principalmente por los ríos Santa Rosa, Buenavista y río Chico, nace de la falda de las cordilleras de Dumari, Chilca y Sambotambo. Forma un estero con el mismo nombre que desemboca en el estero de Jambelí. El área total de la cuenca es de 1061 km² (15).

Cuenca del Río Arenillas

Nace en las cordilleras occidentales de Santa Rosa y Tahuin con el nombre de Panupali. Tiene una longitud de 42,8 km y Pasa por las cabeceras parroquiales de Saracay y Piedras y la cabecera cantonal Arenillas para

desembocar finalmente en el estero Grande a la altura del puerto Pitahaya. Posee una superficie total de 716.6 km², de los cuales se tienen 397.6 km² hasta el sitio donde está construida la presa de Tahuin, quedando los remanentes con 319.6 km² distribuidos entre la cuenca media y baja (16).

Figura 1. División por cuencas hidrográficas del Ecuador.



En color se muestra las cuencas donde se tomaron las muestras de los especímenes. a) Ubicación del Ecuador en Suramérica. El mapa fue realizado en Qgis y la información geográfica utilizada fue tomada de la base de datos del IGM y MAGAP.

1.1.3 Historia de los Ríos de la Costa

El sistema hidrográfico del Ecuador, corresponde a una amplia gama de cuencas que en su mayoría son originadas a partir de la gran cadena montañosa conocida como los Andes. El levantamiento de La cordillera de los Andes protagoniza un papel crucial en la formación y modelamiento de la topografía y por lo tanto los diversos drenajes existentes en el Ecuador (17).

A finales del oligoceno y a inicios del Mioceno medio, se produjeron cambios tectónicos importantes para la formación de sistemas fluviales en la región nórdica de Suramérica (18). Ejemplo de esto tenemos la formación del Amazonas, el río más largo y caudaloso del mundo, que no siempre tuvo conexión directa con el Océano Atlántico, sino más bien mantenía comunicación con ríos ubicados al noroeste de América del sur, conectándose con sistemas fluviales que en la actualidad formarían ríos como el Orinoco (18).

Según Lynch y Duellman (19) el levantamiento del sistema montañoso al Oeste del Ecuador tiene sus inicios a finales del Cretácico, por acción de la tectónica de placas, el cual produjo el desplazamiento hacia el Este de un conjunto de islas volcánicas en arco ubicadas al Oeste de Colombia. Debido a esto, ese conjunto de islas actualmente conformen lo que hoy se denomina serranía de Baudó y la serranía Gallinazo en Colombia. Mientras que para el caso de Ecuador intervino en la formación de elevaciones como el cerro de Pata de Pájaro en Manabí. La erosión de estas islas elevadas probablemente

contribuyó con sedimento para llenar las tierras bajas entre la cordillera de la Costa y la cordillera occidental de los Andes. Este proceso geológico continuó en el Cuaternario, acompañado de cambios climáticos severos como glaciaciones (19). Es de esperarse que producto de estos cambios se produjeran efectos vicariantes en los organismos que habitaban la zona lo cual puede explicar claramente la gran diversidad biológica que posee nuestro país actualmente.

1.2 Biodiversidad o Diversidad Biológica

La diversidad se define como el rango de variación que existe en un conjunto de atributos. La diversidad biológica sería, la variedad de vida que existe en el mundo y se puede considerar desde tres puntos de vista principales: composición, estructura y función (2).

Según la Reunión sobre la Diversidad Biológica, (Artículo 2) la diversidad biológica se define como la variación de organismos vivos, que existen en los diferentes ecosistemas terrestres, marinos o de otros medios acuáticos, y los complejos ecológicos de los cuales forman parte; incluyendo la diversidad intraespecífica e interespecífica (2).

Los centros de diversidad, son áreas con gran número de especies y pueden contemplarse desde una escala general, regional o inferior y local. La diversidad biológica en un sitio depende de muchos factores incluyendo la extensión del hábitat en donde los organismos se desarrollan. Existen

lugares que son extremadamente ricos, en diversidad y otros que son muy pobres (2).

1.2.1 Diversidad Genética

La diversidad genética, representa la variación hereditaria dentro de las poblaciones y entre ellas, como expresión de la variación de las secuencias de los cuatro nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina), que forman el código genético expresado en el ADN.

En su forma más evidente las variaciones se manifiestan en el cariotipo, en el número, tamaño y forma de los cromosomas, o en niveles moleculares: variación de alelos a través del polimorfismo proteico, variación en regiones no codificantes para proteínas, variación en regiones relacionadas con la expresión de genes y diversidad del ADN mitocondrial (2).

Entre los aspectos más interesantes que han aportado los estudios genéticos a la biodiversidad y su conservación están relacionados con la rotura de las vías de dispersión y de migración, también como eventos históricos y demográficos, que pueden influir en su diversidad; ejerciendo cierto tipo de presión de selección así como con la fragmentación de las poblaciones y la reducción de su tamaño (2).

La fragmentación afecta a la biodiversidad por la interrupción en el flujo genético entre las sub-poblaciones fragmentadas, con el consiguiente empobrecimiento genético debido a la endogamia, reducción del tamaño poblacional, etc. Esas condiciones llevan a situaciones de deriva genética y depresión endogámica, que pueden conducir a lo que se ha llamado vórtice de extinción o círculo vicioso de extinción, del que es prácticamente imposible salir (2).

1.2.2 Diversidad Taxonómica

La Taxonomía de los organismos, tal como la conocemos hoy, inició su desarrollo a partir de los trabajos de Linneo. Los rangos taxonómicos ayudan a comparar el grado de caracteres compartidos y no compartidos de los organismos, y estos caracteres son expresados por sus genes. Las diferencias a nivel genético son las causantes del rango taxonómico que produce una mayor o menor semejanza, lo que consecuentemente se traduce como una mayor o menor proximidad taxonómica (2).

Así, una especie comparte una proporción importante de su información genética con otras especies del mismo género, mientras que una especie única en un género es muy distinta genéticamente a otras especies. La jerarquía taxonómica es, por tanto, una posible vía inversa para determinar la diversidad genética de los grupos (2).

1.3 Peces de Agua Dulce

Habitan los vastos sistemas hidrográficos que proporciona la topografía de cada región (Costa, Sierra, Oriente y Galápagos). Ambientes lénticos (Aguas calmadas) como los lagos que se forman a 3500 msnm y ambientes lóticos (Aguas corrientosas) como los ríos que bajan hacia el Este y Oeste de la cordillera de los Andes. Según Barriga (2012), en el Ecuador existen 1.716 especies de peces registradas, de las cuales 765 son marinos y 951 son de agua dulce. Esta última cifra es muy alta en relación a la superficie total del País (255.970 km²), representando el 21% de las especies de agua dulce en Suramérica. Sin embargo han sido menos estudiados que los de agua marina, muy posiblemente por la importancia comercial que estos últimos representan para el Ecuador.

El Ecuador posee uno de los niveles más altos de endemismo dentro de los países suramericanos en cuanto a su riqueza ictiofaunística (20), lo cual es atribuible al aislamiento geográfico producido en edades geológicas más tempranas.

Un estudio reciente hecho por Laaz y Torres (2014), generó una lista de 125 especies que se alojan en la cuenca del río Guayas, uno de los drenajes más importantes y de mayor área en la Costa ecuatoriana. Hasta ahora estos

estudios orientados a la realización de base de datos de peces de agua continentales en el Ecuador, coinciden en que los órdenes con mayor cantidad de familias, géneros y especies son Characiformes, Siluriformes, y Perciformes (20) (21).

1.3.1 Pesca de Agua Dulce en la Costa Ecuatoriana

La actividad pesquera se centra principalmente en el mar desde tiempos ancestrales, siendo esta una de las fuentes primarias de alimentación para las zonas rurales. La pesca de agua dulce es muy poco desarrollada en la Costa y tiene escasa relevancia económica para el país. Más en áreas rurales con ríos grandes como la provincia de Los Ríos, los peces de agua dulce constituyen una fuente importante de proteína para los habitantes.

En la Costa se realiza esta actividad en provincias como: Manabí, Esmeraldas, Los Ríos y Guayas. El Instituto Nacional de Pesca, en su informe anual sobre los aspectos pesqueros de las principales especies capturadas en el embalse “parque lago Chongon”, reporta desembarques del año 2008 al 2013 de especies como; dica (*Pseudocurimata boulengeri*), dama (*Brycon alburnus*), vieja azul (*Andinoacara rivulatus*), tilapia (*Oreochromis spp.*) y guanchiche (*Hoplias microlepis*). Tan solo del

guanchiche, hay extracciones de 38 a 58 toneladas anuales dependiendo de la disponibilidad del recurso en determinados años (22).

1.4 Generalidades del Guanchiche (*Hoplias spp.*) en el Ecuador

El guanchiche (*Hoplias spp.*) es un pez carnívoro, considerado depredador, alimentándose de otros peces. Debido a su dieta presentan mandíbulas fuertes provistas de filosos dientes cónicos, su cuerpo es cilíndrico, no poseen aleta adiposa y su aleta caudal es redondeada. (23) (24) (25).

Estos peces prefieren el fondo en los cuerpos de agua donde habitan para poder acechar a sus presas. Otra de las características del guanchinche, es que tienen la capacidad de permanecer por largo tiempo fuera del agua. Este grupo de peces son capturados por miembros de comunas cercanas como pesca artesanal (24) (25).

1.4.1 Clasificación Taxonómica

El Genero *Hoplias* antiguamente identificado como *Macrodon* en *Günther (1864)*, posee 9 especies diferenciados en tres grupos por *Mattox et al. (26)*, el grupo *H. macrophthalmus* con su única especie *H. aimara*, el grupo *H. lacerdae* posee cinco especies, *H. australis*, *H. brasiliensis*, *H. curupira*, *H. intermedius* y *H. lacerdae* y el grupo *H. malabaricus* que todavía

carece de un enfoque taxonómico definido e incluye a *H. malabaricus*, *H. microlepis* y *H. teres* (26). Esta clasificación, basada principalmente por datos merísticos y morfométricos ha sido muy útil en la diferenciación de estos grupos de especies pertenecientes al mismo género.

En el Ecuador se han registrado dos especies: *H. microlepis* y *H. malabaricus*.

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Characiformes

Familia: Erythrinidae

Género: Hoplias

Especie: *H. microlepis*

(Fuente: Elaborado por los autores y (27) (28))

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Characiformes

Familia: Erythrinidae

Género: Hoplias

Especie: *H. malabaricus*

(29)

1.4.2 Distribución

El género *Hoplias* habita en un gran número de hábitats; lénticos como lagos, embalses y loticos como ríos, encontrándose distribuidos a lo largo de los muchos sistemas hidrográficos del centro y Sur de América (24) (25).

1.4.3 *Hoplias microlepis*

Esta es una especie depredadora que pasa en el fondo del río a la espera de un pez desprevenido para alimentarse. Ataca a su presa dándole mordiscos con sus dientes y casi siempre se encuentra parasitado por nematodos, los cuales no afectan su salud (27).

1.4.3.1 Distribución y Hábitat

Viven en ambientes lóticos como pequeños o grandes ríos y cascadas, también aguas estrictamente lénticos como lagos y embalses (24) (25). Se han encontrado ejemplares en bioclimas diversos como: Región sub desértica tropical, región muy seco tropical, región monte espinoso tropical, región húmeda tropical y región muy húmeda tropical (7).

1.4.3.2 Anatomía y Morfología

Cuerpo cilíndrico; ligeramente comprimido. Cabeza fuertemente osificada; boca terminal; dientes cónicos mandibulares insertos en el cráneo. Intestino corto. Escamas duras y lisas al tacto. Aleta dorsal pequeña, aleta adiposa ausente, presencia de mioespinas. Coloración del cuerpo marrón oscuro con manchas oscuras y claras diseminadas en el cuerpo, el vientre es blanco. Las aletas caudal y dorsal con manchas oscuras (26) (27).

Hoplias microlepis difiere de las demás especies de *Hoplias*, a excepción de las especies del grupo *H. malabaricus*, en la forma de los dentarios que bruscamente convergen hacia la sínfisis mandibular (Oyakawa y Mattox, 2009: 118, fig. 1d) y por la presencia de placas dentales en la lengua. *H. microlepis* también se distingue de *H. brasiliensis* y *H. curupira* en el número de escamas a lo largo de la línea lateral (43-47 vs 38-43 y 34-39, respectivamente), y de *H. australis* y *H. lacerdae* en la número de poros del sistema de lateral sensorial a lo largo de la ventral superficie del dentario (4 vs 5 siempre y 6-8, respectivamente). *H. microlepis* se distingue del grupo de especies de *H. malabaricus* por el mayor número de escamas alrededor del pedúnculo caudal (22-24, por lo general 24 vs. 18-20, por lo general 20) y línea lateral (26).

1.4.4 *Hoplias malabaricus*

1.4.4.1 Distribución y Hábitat

Se han registrado especies de este grupo (e.g., *Hoplias malabaricus*) por todo el Oriente del Ecuador, como en el río de Pastaza y en el río Bobonaza. Viven en ambientes lóticos como pequeños o grandes ríos y cascadas, también aguas estrictamente lénticos como lagos y embalses (24) (25). Esta especie probablemente esté restringida a la cuenca del Amazonas perteneciente al Oriente (al este de los Andes) y el sistema de drenaje de la costa norte (provincia de Esmeraldas) (30). Tiene una de las distribuciones más amplias de las especies de agua dulce de América Latina y se encuentra los principales sistemas hidrográficos de Latino América desde Panamá hasta Argentina (30).

1.4.4.2 Anatomía y Morfología

H. malabaricus, es reconocido por la presencia de placas de soporte, dientes adjuntos a una superficie carnosa y por tener márgenes mediales contralateral de dentarios; que abruptamente converge hacia la sínfisis mandibular formando de este modo un margen en forma de V en vista ventral (23).

Hoplias malabaricus difiere de la mayoría de los peces de agua dulce de Ecuador, siendo muy similar a su congénere, *H. microlepis*, encontradas en

la cuenca del Guayas, al oeste de Ecuador. Estas especies se distinguen por el número de escamas, *H. microlepis* tiene entre 43-47 escamas a lo largo de la línea lateral y 11 filas de escamas alrededor del pedúnculo caudal; mientras que *H. malabaricus* posee entre 39-44 escamas a lo largo de la línea lateral y 9 filas de escamas alrededor del pedúnculo caudal (30).

La Taxonomía y relaciones evolutivas de especies del genero *Hoplias* no están resueltas. Los marcadores genéticos son una de las herramientas más importantes que se ha desarrollado para este tipo de estudio en las últimas décadas. A continuación describimos el uso de los marcadores genéticos, filogenia molecular y damos una introducción a la importancia del ADN y la biología molecular.

1.5 Biología Molecular

La base de la Biología Molecular es el ADN que forma los genes, que contienen las instrucciones químicamente codificadas para producir casi todas las proteínas que la célula necesita (1). La síntesis de proteínas se da en los ribosomas, el ARN mensajero es el encargado de llevar la información genética para la formación de proteínas y los ribonucleótidos son leídos a manera de tripletes llamados codones. Cada uno de estos tripletes codifica un aminoácido y el código es traducido por los ribosomas para producir proteínas (31).

Entre los orgánulos más destacados que poseen ADN y han sido utilizados en estudios de genética poblacional está el núcleo, donde se encuentra la mayor parte del ADN celular. Antiguos investigadores suponían que era el centro de control de la célula; incluso mucho antes de que existieran datos experimentales al respecto (1). Otro orgánulo importante es la mitocondria. Este orgánulo participa en la transformación de nutrientes a energía a manera de ATP. Muchas de las proteínas utilizadas en la respiración celular están codificadas en el ADN mitocondrial (ADNmt) (1) (3).

El ADN en su conformación posee cuatro bases nitrogenadas que pertenecen a dos grupos químicos diferentes: la citosina y la timina son pirimidinas, mientras que la adenina y la guanina son purinas. Los cuatro desoxirribonucleótidos se abrevian habitualmente como C, T, A y G (3) (2) (31). La utilidad de este conocimiento sobre la conformación del ADN, son las secuencias de estas bases nitrogenadas y variaciones que existen en ellas que eventualmente formarán una irregularidad o mutación.

Una mutación puntual o mutación de sustitución de base, es aquella en donde varía solo un punto en la secuencia de bases de un gen, la enzima encargada de sintetizar la secuencia con nucleótidos es el ADN polimerasa. Si la polimerasa sustituye erróneamente a una purina (A o G) por otra, o a una pirimidina (T o C) por otra durante la síntesis normal, o durante la

reparación, la mutación puntual se denomina transición y si se sustituye una purina por una pirimidina, o a la inversa, la mutación se denomina transversión. De los dos tipos de mutación, la transición es más frecuente que la transversión; en una proporción de aproximadamente 2:1 respectivamente. Dependiendo de la distancia genética, el número de transiciones aumentará si las especies son cercanas, por ejemplo 7:1 o 5:1 y en especies más distantes, disminuirá mientras más lejanas sean las especies. (1) (3) (32).

Las mutaciones puntuales que dan lugar al cambio de un aminoácido, se llaman sustituciones no sinónimas o de reemplazo; las que no dan un cambio se llaman sustituciones sinónimas o silenciosas. Ambos tipos de mutaciones dan lugar a nuevos alelos. Otros tipos de mutaciones a nivel del cromosoma son las inversiones, deleciones o duplicaciones y translocaciones (3). También existen las mutaciones por corrimiento de la pauta de lectura cromosómica, estas mutaciones se dan cuando los pares de nucleótidos se insertan o eliminan en la secuencia de ADN; esto cambia el marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés), lo cual puede llegar a formar una secuencia de aminoácido completamente nueva (1).

Si cualquiera de estos tipos de sustitución de bases se da en las regiones codificadoras de un gen, la mutación cambia el codón que está formado por tres nucleótidos y esto podría llegar a formar otro aminoácido e incluso una

proteína diferente. Cambios en la primera o segunda posición de un codón suelen cambiar el aminoácido; mientras que cambios en la tercera posición frecuentemente no resultan en cambios de aminoácidos (3).

Estas mutaciones son más significativas cuando se han generado más transformaciones en la secuencia de ADN y el conjunto de estas transformaciones que se generan a través del tiempo, se considera como evolución (1) (3).

Algunas mutaciones formadas serán beneficiosas para los organismos y estos que logran sobrevivir transmiten su receta genética para la supervivencia. Estas características se distribuyen ampliamente en la población produciendo así un cambio evolutivo (1).

Los métodos actuales que ayudan a la identificación y caracterización de especies a nivel molecular se logran realizar gracias a diferencias en el código genético en el ADN nuclear y mitocondrial (1) (3).

1.6 Marcadores genéticos

En la última década, se han producido avances en la Genética Molecular y la Genética de Poblaciones. Como ejemplo tenemos el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifica tramos

específicos de ADN, la aplicación de cebadores, microsatélites y secuenciación de genomas enteros de organismos (33).

Los marcadores genéticos son segmentos de ADN hereditarios. En un organismo diploide cada organismo puede tener uno o dos por gen (locus). Los marcadores genéticos reflejan diferencias en las secuencias de ADN. Las ventajas de los marcadores genéticos, es que se pueden analizar por PCR, requieren cantidades bajas de ADN, son capaces de dar información sobre regiones específicas de ADN y generan datos directamente comparables entre diversas especies, facilitando así el análisis (33).

Los marcadores genéticos del ADN mitocondrial (ADNmt) son utilizados para estudiar los procesos evolutivos a largo plazo como la filogeografía, especiación y la reconstrucción de árboles filogenéticos. También permiten examinar hipótesis de la influencia que ejercen factores históricos y espaciales sobre la distribución y frecuencia de alelos individuales de las poblaciones dentro de las especies (33).

Para estudiar una porción de ADN se necesita de especificidad, para lo cual sirven los primers (o cebadores) en las reacciones de PCR. Los primers son secuencias cortas de ADN que son complementarias a regiones conservadas del ADN en el organismo que se está estudiando. Idealmente, los primers flanquean regiones variables que ayudan a la estimación de diversidad

genética, la frecuencia de alelos y haplotipos así como la genealogía del organismo (33).

También se pueden usar diferentes tipos de marcadores según la técnica, como los que sirven para analizar muchos locus en el método de RAPDs por sus siglas en inglés (randomly amplified polymorphic DNA) y AFLP (amplified fragment length polymorphic DNA) o para un solo locus utilizando microsatélites (33).

Estas innovaciones y el análisis relativamente fácil con el uso de programas computacionales, ayudan a obtener información valiosa para entender mejor el origen y la evolución de los diversos organismos (33).

1.6.1 ADN: Nuclear y Mitocondrial

Una de las características importantes del ADN, es que suele estar compuesto de dos cadenas de polinucleótidos que se encuentran enroscadas una alrededor de la otra en la forma de una hélice doble (32). Esto no quiere decir que todas las estructuras de ADN van a ser iguales; cuando se trata de topología del ADN, este varía incluso entre organismos. Como ejemplo tenemos el ADNmt que se encuentra de manera circular (32).

Además las bacterias poseen elementos genéticos pequeños con capacidad autónoma de duplicación, que se conocen como plásmidos, que suelen ser moléculas de ADN circulares; asimismo la célula posee más de un tipo de

ADN que difiere entre sí, como el ADN nuclear y el ADN de ciertos orgánulos como es el caso de los cloroplastos y las mitocondrias. La organización de estos genomas difiere mucho del ADN nuclear (ADNn), debido a que estos orgánulos se originaron de bacterias que comenzaron a residir en células eucariotas en los comienzos de la historia de la vida (3) (32).

Como hemos mencionado, el ADN más utilizado para estudios moleculares es el ADN mitocondrial. Se hereda con un patrón vertical, no mendeliano, transmitido exclusivamente por vía materna, es decir la madre trasmite el genoma mitocondrial a todos sus hijos, por tanto solamente las hijas lo transmitirán a todos los miembros de la siguiente generación y así sucesivamente. Todas las células de un individuo normal tienen el mismo ADN mitocondrial, es decir son homoplásmicas. Sin embargo, en la célula pueden aparecer moléculas de ADN mitocondrial mutadas que pueden afectar a todas las moléculas (homoplasmia para la mutación) o que pueden coexistir con el ADN normal (heteroplasmia) (34).

Otra de las características particulares de la genética mitocondrial es que tiene una gran tendencia a mutar siendo la tasa sustitución de nucleótidos unas 10 veces superior a la del ADN nuclear (35) . Existen factores que pueden explicar esta elevada tasa de mutación, como la falta de protección por proteínas llamadas histonas que si se encuentran presentes en el ADN

nuclear. El ADNmt también se encuentra expuesto continuamente a radicales libres que se generan por metabolismo oxidativo y los sistemas de reparación son menos eficientes que el ADNn (36).

El ADNmt, tiene 13 genes estructurales que codificarán diferentes subunidades para complejos enzimáticos de fosforilación oxidativa. Tenemos a las subunidades del citocromo c-oxidasa (COI, II y III), citocromo b (cyt b) óxido reductasa, siete subunidades para el complejo NADH deshidrogenasa y dos subunidades (6-8) del complejo ATP sintetasa (36).

Figura 2. Representación del ADN mitocondrial.

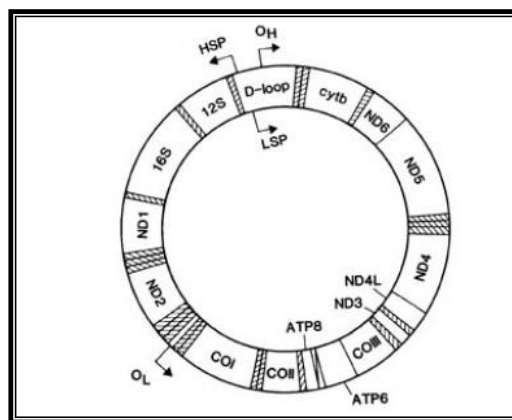


Imagen tomada de Dominguez, 2005 (36).

También posee una región no codificante, conocida como región de control o D-Loop ocupando 1122 pares de bases, en esta región se localiza el origen de replicación de la cadena pesada, dos promotores de transcripción, dos lugares de unión de factores de transcripción, tres bloques de secuencias

conservadas asociadas al inicio de replicación y las secuencias asociadas a la terminación. La región de control se destaca debido a que su tasa de mutación es diez veces mayor que las regiones codificantes y por su alta variabilidad intrapoblacional (36).

Los análisis de las regiones codificantes revelan un alto número de sustituciones no sinónimas en los genes: ATP6, citocromo b y COI, y que los niveles de variabilidad tienen cierta relación con el origen geográfica individual. Los investigadores tienden a especificar los haplotipos mitocondriales mediante el estudio de las regiones más variables. Es así como estas regiones ayudan no sólo a la determinación de haplotipos sino también a inferir índices de diversidad que aportan una medida de la cantidad de variación en una población y son útiles para realizar comparaciones entre poblaciones (36). Los datos más empleados en el estudio de la variabilidad del ADNmt en poblaciones son: el número de posiciones variables, el número de haplotipos diferentes, la diversidad genética (o haplotípica), la diversidad nucleotídica y el número medio de diferencias pareadas (36). Estos datos son necesarios en estudios filogenéticos para darnos una explicación actual sobre la estructura de una población que ha ido cambiando con el tiempo por eventos históricos en su hábitat. A este tipo de estudio también se lo denomina como filogeografía (33).

1.7 Filogeografía

La Filogeografía, se define como la disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos (37). Se enmarca en un área más amplia denominada Ecología Molecular, que se define de manera general como el conocimiento y aplicación de marcadores genéticos moleculares para explorar preguntas y problemas en Ecología y Evolución. La Filogeografía se basa en la observación de que la gran mayoría de las especies en la naturaleza exhiben cierto grado de estructura genética asociada con la Geografía. Esta asociación se debe al hecho de que poblaciones geográficamente cercanas son influenciadas por procesos ecológicos geológicos similares e intercambian alelos mediante el flujo genético con mayor frecuencia que poblaciones geográficamente distantes o aisladas. Es decir, la estructura filogeográfica refleja la interacción entre los procesos demográficos y genealógicos a través del tiempo. Esto ha tenido repercusiones importantes en las áreas de Biología Evolutiva, Ecología y Conservación (37) (38). Actualmente los estudios filogeográficos, se basan principalmente en secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt), debido a su alta tasa de mutación, no se recombina y su herencia es casi exclusivamente materna. Las variantes o haplotipos del ADNmt, registran la historia matrilineal de eventos mutacionales. Para la interpretación de estas variantes, se han logrado

desarrollar múltiples formas de análisis gráficos, los cuales incorporan los filogramas a los cuales a su vez se sobrepone la distribución geográfica del grupo de estudio, para interpretar los procesos evolutivos responsables de la distribución genética observada (37).

En términos analíticos, la Filogeografía se basa fundamentalmente en una idea gráfico–descriptiva, donde las ramificaciones de un árbol se analizan bajo una o varias hipótesis de la historia biogeográfica de los organismos, sustentada en métodos de reconstrucción de árboles filogenéticos; o bien, en la construcción de redes de haplotipos (38). En el nivel más básico, la lógica de estimar relaciones filogenéticas es simple: los taxones más íntimamente relacionados deberán compartir el mayor número posible de caracteres. Estos caracteres pueden ser cosas tales como secuencias de ADN, la presencia o ausencia de ciertos elementos esqueléticos o anatómicos, e incluso el proceso de desarrollo embrionario o larvario. El único requerimiento es que diferentes caracteres sean independientes entre sí y que cada uno pueda medirse como un carácter homólogo en todas las especies bajo estudio (3). Cada vez más trabajos emplean otros genes mitocondriales, como el 12S y 16S, COI, NDH y ATPase (37).

CAPITULO II

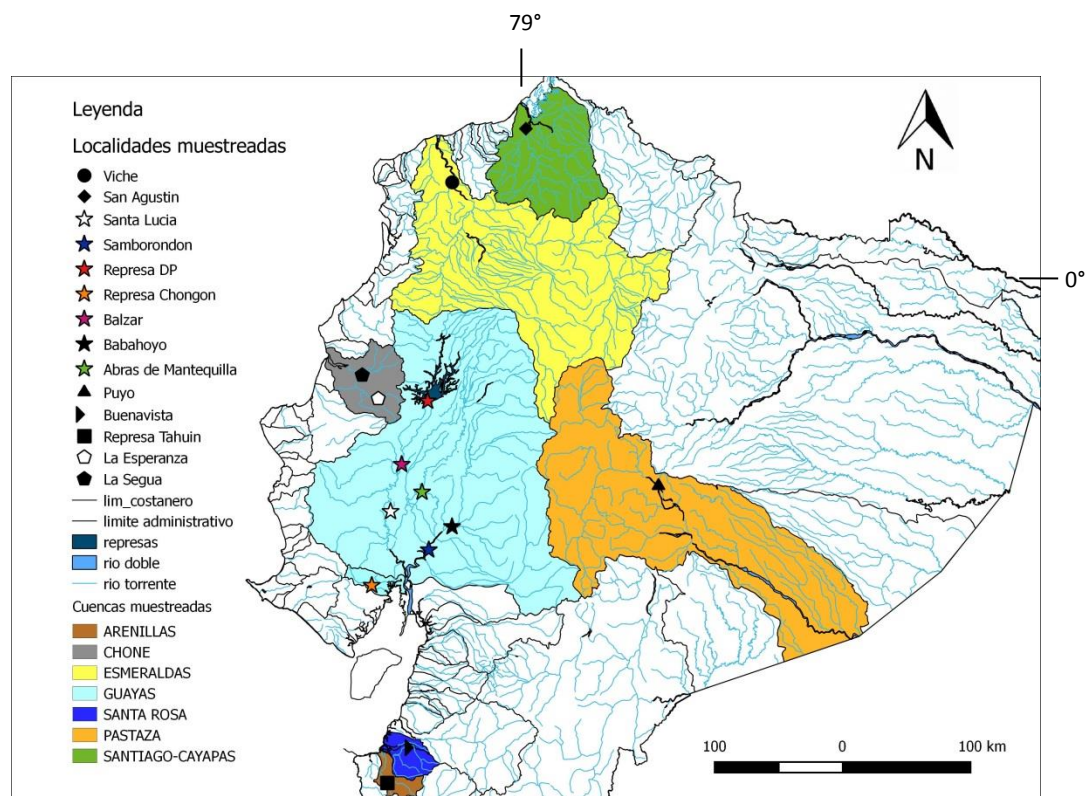
2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Muestreo

Los especímenes (*Hoplias spp.*) fueron colectados con la ayuda de pescadores y comerciantes de cada sitio, asegurándose de que el lugar de procedencia de la especie sea propia de la localidad. Las localidades de: Viche, San Agustín, La Segua, La Esperanza, Abras de Mantequillas, Santa Lucía, Samborondón, Balzar, Buenavista y represa Tahuin, fueron muestreados en los meses de agosto a diciembre del 2012, mientras que la represa Daule-Peripa, Chongon y Babahoyo, se tomaron muestras de ADN extraído, almacenadas en el año 2008, de la Universidad de DePaul,

Chicago-EEUU, usadas previamente por Aguirre *et al.*, (39) en un estudio de morfología y diversidad genética de *Hoplias microlepis* en ríos y embalses artificiales en las costas ecuatorianas (Tabla1). Los sitios muestreados en la región Litoral están ampliamente distanciados y distribuidos de norte a sur, ocupando diversos sistemas hidrográficos (Figura 3). Adicionalmente se colectaron 12 especímenes de *Hoplias malabaricus* provenientes del río Puyo, Oriente del Ecuador, para el análisis comparativo. Las muestras fueron preservadas en etanol al 95 % en el campo.

Figura 3. Puntos muestreados por cuencas hidrográficas en el Ecuador.



El mapa fue realizado en Qgis y la información geográfica utilizada fue tomada de la base de datos del IGM y MAGAP.

Tabla I. Sitios muestreados dentro de cada cuenca hidrográfica con sus respectivas áreas.

Sitio	Cod.	Muestras ATPasa	muestras CR	Cuenca Hidrográfica	Área (km ²)
Viche	Vc	2	2	Esmeraldas	21060
San Agustín	SA	6	5	Santiago-Cayapas	6080.32
La Segua	Sg	8	7	Chone	2483
La Esperanza	Es	8	8	Chone	
Abras de Mantequilla	Vi	8	8	Guayas	32891.38
Santa Lucía	SL	8	8	Guayas	
Babahoyo*	Bh	8	25	Guayas	
Represa DP*	DP	8	25	Guayas	
Represa Chongón*	Ch	8	25	Guayas	
Samborondón	Sa	8	8	Guayas	
Balzar	Ba	7	6	Guayas	
Buenavista	Bv	12	10	Santa Rosa	1061
Represa Tahuín	Ta	8	7	Arenillas	716.6
Puyo**	Pu	12	12	Pastaza	23469

*Muestras tomadas de Aguirre et al., 2013

**Sitio muestreado para análisis comparativo entre especies.

2.2 Metodología molecular

Para el análisis molecular se seleccionaron dos genes; la Región de Control (CR por sus siglas en inglés) o D-Loop y la ATPasa, ambos pertenecientes al ADN mitocondrial (ADNmt). La CR es comúnmente

utilizada en estudios de divergencia entre poblaciones debido a que posee una alta tasa de mutación, por ser una secuencia no codificante. Se amplificó una región de aproximadamente 590 pares de bases con los primers: **PRO5-ST-F**: 5`-TCA CCC TTA ACT CCC AAA GC-3` Y **WCR3-R**: 5`-GAA CGC CTT GGC ATG GTG-3`. Obtenidos de Aguirre *et al.*, (39). El segundo gen, la ATPasa, se amplificó 841 pares de bases con los siguientes primers: **ATP-L8331** 5`-AAGCRTYRGCCTTTTAAGC-3` y **ATP-COIII 2H9236** 5`-GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC-3` obtenidos de un investigador del Smithsonian Tropical Research Institute en Panama.

2.2.1 Extracción de ADN

Se cortó una porción de la aleta pectoral del espécimen de aproximadamente 5 cm de largo y 2 de ancho, se la preservó en etanol al 95 %. La extracción se la realizó con kits de Qiagen siguiendo el protocolo de extracción de ADN para tejidos.

El volumen final de ADN fue de 400 µl en buffer AE y fue almacenado a -20°C para su uso posterior en la PCR.

2.2.2 Concentración de ADN

La concentración obtenida de la extracción de ADN fue medida utilizando un Nanodrop 2000 spectrophotometer. Las concentraciones de ADN variaron generalmente entre 100 y 300 ng/ μ l con un promedio de 200 ng/ μ l.

2.2.3 PCR

Protocolo de PCR para la Región de Control

La reacción de PCR se la realizó en un volumen de 30 μ l usando 6 μ l de ADN de muestra a una concentración de 100 a 200 ng/ μ l. La concentración de los componentes de la reacción fueron los siguientes: 1X Buffer de PCR, 0.1 μ g/ μ l BSA, 0.25 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.35 μ M de cada primer y 1.05 U de Taq ADN Polimerasa. Las condiciones de PCR para la CR consistieron en 1 ciclo a 95°C por 1 min 45 seg para la desnaturalización del material genético, 55°C por 45 seg para la unión del primer a la cadena de ADN, 72°C por 45 seg para la extensión, seguido de 34 ciclos de 92°C por 45 seg, 55°C por 45 seg, 72°C por 45 seg y una extensión final a 72°C por 7 min.

Protocolo de PCR para la ATPasa

La reacción de PCR se la realizó en un volumen de 30 μl usando 6 μl de ADN de muestra a una concentración de 10 a 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$. La concentración de los componentes de la reacción fueron los mismos utilizados en la Región de Control. Las condiciones de PCR para la ATPasa consistieron en 1 ciclo a 94°C por 1 min para la desnaturalización inicial del material genético, seguido de 5 ciclos a 94°C por 45 seg para la desnaturalización, 56°C por 45 seg para la unión del primer a la cadena de ADN, 72°C por 1 min para la extensión, luego 30 ciclos a 94°C por 45 seg, 56°C por 45 seg, 72°C por 1 min 30 seg y una extensión final de 72°C por 4 min.

2.2.4 Electroforesis

Se empleó electroforesis para verificar los resultados de la reacción de PCR. El gel para electroforesis fue de 2% usando 0.8g de agarosa, 40ml de TAE 1X (Tris-Acetic Acid-EDTA), y 8 μl de SYBR Safe, este último siendo un reactivo para visualizar el ADN bajo luz ultravioleta. Una escalera, 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs) fue utilizada para verificar el tamaño de los productos de PCR. Se corrió el gel por 30 minutos a 90 voltios y 400 mA.

2.2.5 Purificación y Secuenciación de los Productos de PCR

Los productos de PCR fueron secados y enviados a Arizona Research Labs en Tucson, Arizona, EEUU (<http://uagc.arl.arizona.edu/>), para su purificación y secuenciación. La purificación se llevó a cabo mediante una reacción enzimática con ExoSAP-IT (Affymetrix). Una vez purificado los productos de PCR, se secuenciaron ambas tiras de ADN de cada gen en reacciones separadas mediante Sanger sequencing en un Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer.

2.2.6 Alineamiento de las Secuencias de ADN

Para la edición de las secuencias de ADN, se utilizaron los programas informáticos CHROMAS Lite (40) para la visualización de los cromatogramas de las dos tiras de ADN y conjuntamente se realizó la edición con Bioedit 7.2.5 (41) utilizando la función CLUSTALW para alinear las dos tiras de ADN de cada gen para cada individuo y corregir errores en las secuencias manualmente. Una vez corregidos los errores, se creó un contig por espécimen y se unió todos los especímenes en un solo archivo en formato FASTA para cada gen para la alineación final en Bioedit. También se usó el programa Geneious 5.6.7 (42) para la edición de la alineación final de secuencias.

2.3 Análisis Estadístico

2.3.1 Análisis Filogenético

Para el análisis filogenético se utilizó MEGA versión 6.0 (43), con un total de 111 secuencias del gen ATPasa y 156 secuencias de la Región de Control del ADNmt, editadas y alineadas como se describió previamente. Una secuencia de ADNmt parcialmente completo de *Hoplias malabaricus* (44) tomada del banco de genes de NCBI fue incluido dentro del árbol filogenético (genes CR y ATPasa) para confirmar la especie colectada en el Oriente (Puyo). Además se incluyeron cuatro especies diferentes del orden Characiformes como grupo externo para establecer la polaridad de evolución en la región ATPasa; *Cyphocharax magdalenae* (Characiformes: Curimatidae), *Bryconamericus ricao* (Characiformes: Tetragonopterinae) (45), *Prochilodus magdalenae* y *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) (46) (Tabla II). Estos fueron seleccionados del banco de genes de NCBI, por medio de un BLAST usando una de las secuencias de ATPasa tomados del presente estudio, para encontrar especies cercanas, con el objetivo de darle una buena base a la raíz del árbol filogenético.

Tabla II Especies para grupo externo usado en el análisis filogenético para el gen ATPasa.

Especie	Gen	Accession Number	Referencia
<i>Hoplias malabaricus</i> *	CR / ATPasa	AP011992	Nakatani et al., 2011
<i>Prochilodus magdalenae</i>	ATPasa	HQ129829	Borden et al., 2010
<i>Prochilodus lineatus</i>	ATPasa	HQ129633	Borden et al., 2010
<i>Cyphocharax magdalenae</i>	ATPasa	AF412937	Reeves y Bermingham, 2006
<i>Bryconamericus ricae</i>	ATPasa	AF412580	Reeves y Bermingham, 2006

*Se adicionó una secuencia de esta especie para confirmar los especímenes colectados en el Puyo.

No se aplicó un grupo externo interespecífico para CR debido a que posee polimorfismo muy elevado.

En la CR se descartó las regiones repetitivas, debido a que dificultaba la alineación entre especies. Se eliminó la mayor cantidad de vacíos (gaps), ya que no son tomados en cuenta en el análisis filogenético. No se añadió un grupo externo como se lo hizo con la ATPasa porque esta región es altamente polimórfica, situación que dificultaba la alineación con otras especies. Para la construcción del árbol se escogió el método Neighbor-Joining, el cual es muy utilizado en este tipo de estudios, además de su rapidez al mostrar los resultados.

Dentro de MEGA se seleccionó la opción para buscar el mejor modelo de sustitución nucleotídica aplicable para nuestras secuencias, en base al método estadístico de Máxima probabilidad (Maximum Likelihood, ML) siendo Tamura-Nei el modelo seleccionado. Se realizó un bootstrap de 1000 repeticiones y se presentó un cocenso de valor de bootstrap ≥ 50 en el árbol.

Estos parámetros fueron aplicados en ambos genes mitocondriales (ATPasa y CR).

2.3.2 Red de haplotipos

Un haplotipo es la combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. La red de haplotipos es una gráfica que muestra los diferentes haplotipos existentes en las poblaciones y están representados por varios círculos que se conectan entre sí, en función de la distancia nucleotídica, formando una red. Cada círculo tiene un tamaño proporcional a la cantidad de individuos de las diferentes poblaciones que posean ese determinado haplotipo. La gráfica permite visualizar de manera sencilla la frecuencia y las relaciones haplotípicas de las diferentes poblaciones de la especie (*Hoplías spp*) además de mostrar que tan separados se encuentran a nivel genético.

Se realizó una red de haplotipos para cada región de ADNmt (ATPasa y CR) en Network 4.6.1.3 (47). La base de datos de haplotipos fue desarrollada en los programa DnaSP Versión 5 (48) y se confirmó utilizando Bioedit (41) para las poblaciones de *Hoplías spp*. de ambos genes (ATPasa y CR). Se le dio peso a las transiciones y transversiones, con una relación de 1:3 respectivamente.

2.3.3 Diversidad genética

La diversidad genética de las poblaciones de guanchiche se midió en base a la cantidad de haplotipos que poseía cada localidad, siguiendo la fórmula de diversidad haplotípica como se muestra:

$$\frac{N}{N-1} \left(1 - \sum X_i^2 \right)$$

Dónde: N es el número total de individuos en la población y X_i es la frecuencia del alelo i.

La diversidad haplotípica permite estimar la distribución de los haplotipos en base a su frecuencia. Este valor tiene un rango de 0 a 1, donde una diversidad haplotípica de 0 indica que existe un solo haplotipo dominante frente a todos los demás. Por el contrario una diversidad haplotípica de 1 refleja que la frecuencia de los alelos se encuentra repartido uniformemente en la población. El número de haplotipos indica la cantidad de haplotipos dentro de cada población, mientras que el número de haplotipos privados, indica cuantos haplotipos exclusivos posee determinada población que no se encuentren en ninguna otra. Esta última nos brinda una perspectiva del nivel de divergencia que posee la población.

2.3.4 Diferencias Pareadas F_{ST}

El estadístico F_{ST} es una medida de diferenciación poblacional en base a la estructura genética, forma parte de la familia de estadísticos F propuestos por Sewall Wright. F_{ST} está directamente relacionado a la varianza en la frecuencia de alelos entre poblaciones, y por el contrario, al grado de semejanza entre los individuos dentro de las poblaciones. Es decir, que si el valor F_{ST} es pequeño, esto indica que la frecuencia de alelos entre las poblaciones es similar. Pero si el valor F_{ST} es grande esto significa que la frecuencia de alelos es diferente y por lo tanto se evidencia una estructuración genética entre las poblaciones (49). Esta medida es complementada con el valor de confianza p , el cual si es menor a 0.05, indica que la diferencia es altamente significativa.

Las pautas cualitativas para la interpretación de F_{ST} (basado en loci de aloenzimas) varía entre los rangos de:

- 0.05 se puede considerar como una indicación de poca diferenciación genética.
- 0.05 a 0.15 indica diferenciación genética moderada
- 0.15 a 0.25 indica gran diferenciación genética. Valores de F_{ST} mayores a 0.25 indican una mayor diferenciación genética (50)

2.3.5 AMOVA

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) es una prueba estadística que ayuda a soportar la hipótesis sobre una estructura poblacional. Genera estimaciones de los componentes de varianza, reflejando la correlación de la diversidad haplotípica en los diferentes niveles de la subdivisión jerárquica (51). Se utilizó el programa Arlequin Version 3.0 (52) para el AMOVA. Las poblaciones fueron agrupadas por cuencas hidrográficas para la determinación del porcentaje de varianza entre las cuencas, divergencia entre las poblaciones dentro de las cuencas y la divergencia entre los individuos dentro de las poblaciones con un valor p de significancia estadística igual a 0.05. Se realizaron dos AMOVA por cada gen (ATPasa y CR), uno considerando solo las poblaciones de *Hoplias microlepis* y otro incluyendo las poblaciones de Puyo (*Hoplias malabaricus*) y San Agustín (*Hoplias sp.*), con el objetivo de determinar la varianza molecular de *Hoplias microlepis* en la Costa y *Hoplias spp.* en el Ecuador respectivamente.

CAPITULO III

3 RESULTADOS

3.1 Análisis Filogenético

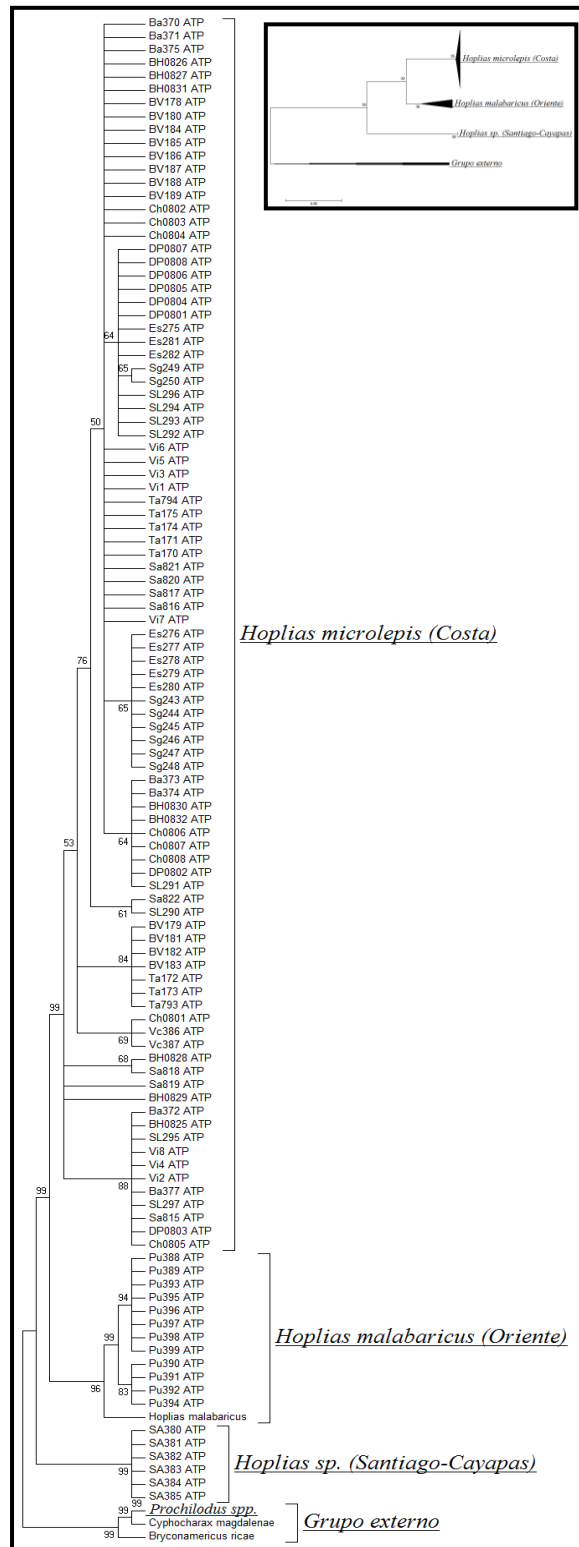
Para la determinación de las relaciones evolutivas entre las poblaciones de guanchiche (*Hoplias spp.*) en la costa ecuatoriana se construyó un árbol filogenético para cada gen mitocondrial (ATPasa y CR). En el árbol filogenético del ATPasa (Figura 4) se agrupan tres clados principales, pertenecientes a *Hoplias microlepis* (Costa), *Hoplias malabaricus* (Oriente) y *Hoplias sp.* (Santiago-Cayapas), claramente separados del grupo externo. Dentro de este árbol, *Hoplias microlepis* de la Costa se encuentra más relacionada genéticamente con *Hoplias malabaricus* del Oriente que de *Hoplias sp.* ubicado en la costa norte (Cuenca del río Santiago-Cayapas). La secuencia parcialmente completa de ADNmt de *Hoplias malabaricus* obtenida del banco de genes de NCBI, se agrupó dentro del clado

perteneciente a las muestras colectadas en el Oriente (Puyo), corroborando la validez de la especie (Figura 4).

Dentro del clado que pertenece a *Hoplias microlepis* se diferencian dos grupos, uno solo incluye a las localidades de la cuenca del río Guayas y el otro agrupa a todas las localidades de las diferentes cuencas (Figura 4).

Dentro de este último grupo aparecen tres clados: Un clado agrupa las localidades de Arenillas con Santa Rosa, que pertenecen a la provincia de El Oro (sur del Ecuador), el segundo clado pertenece a la cuenca de Esmeraldas, relacionado con una localidad de Guayas y el tercer clado relaciona las cuencas de Arenillas (Tahuin), Santa Rosa (Buenavista) y Chone (La Segua, La Esperanza).

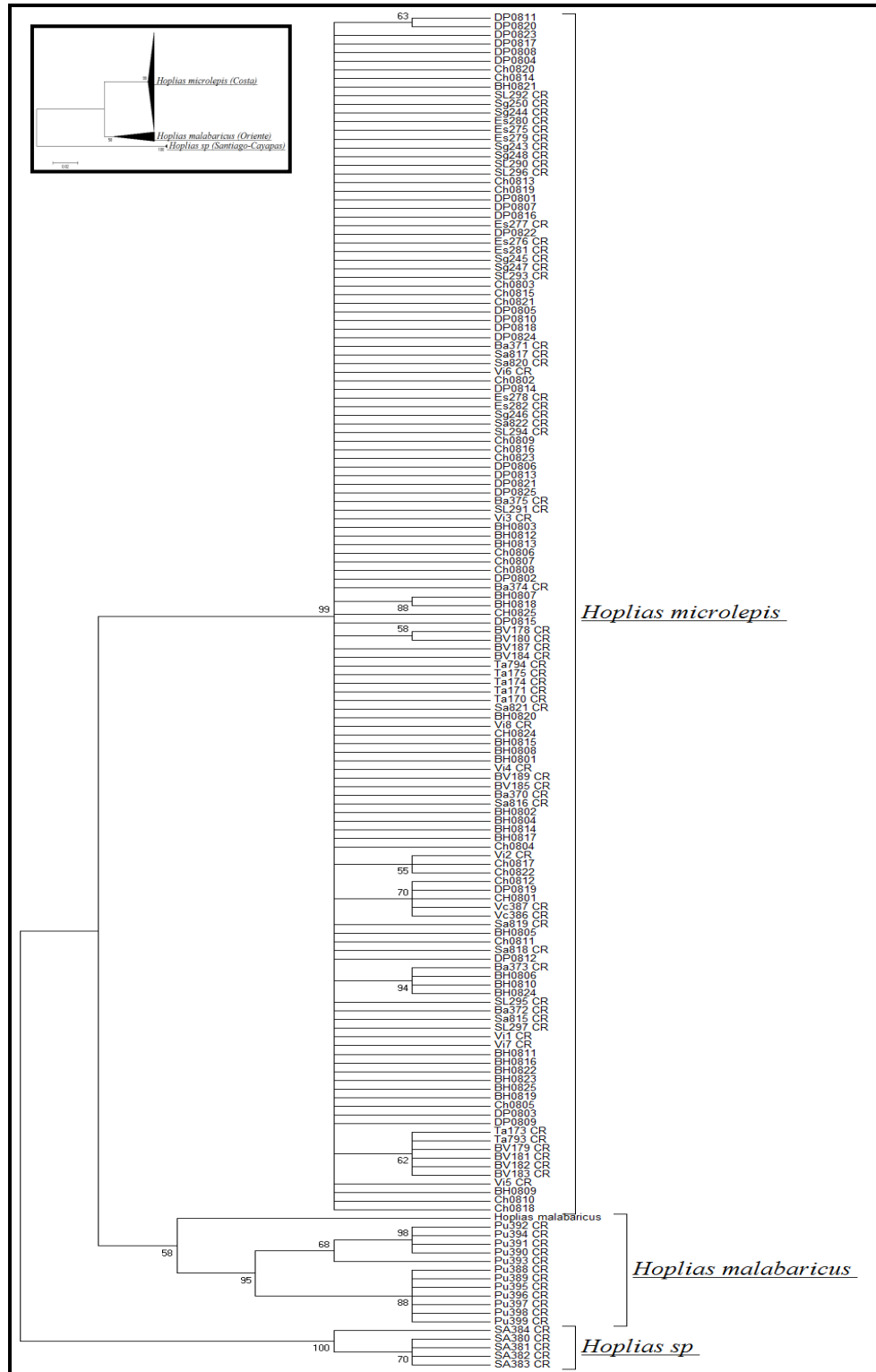
Figura 4. Árbol Filogenético de *Hoplias spp* en el Ecuador a partir del gen ATPasa



En el árbol filogenético de la CR (Figura 5) se presentan tres clados principales *Hoplias microlepis* (Costa), *Hoplias malabaricus* (Oriente) y *Hoplias sp.* (Santiago-Cayapas), análogo al árbol de la región ATPase donde, *Hoplias microlepis* de la Costa se encuentra más relacionada genéticamente con *Hoplias malabaricus* del Oriente que de *Hoplias sp.* ubicado en la costa norte (Cuenca del río Santiago-Cayapas). De igual manera se confirmó *Hoplias malabaricus* con la secuencia de esta especie obtenidas del banco de genes de NCBI (Figura 5).

Dentro del clado que pertenece a *Hoplias microlepis* se forma un sólo grupo extenso, a diferencia del árbol anterior en donde se organizan dos grupos separados. Se denotan dos clados de El Oro (Santa Rosa y Arenillas), mientras que dos muestras de El Oro están agrupados con la cuenca del Guayas. También se presentan seis clados sólo para las localidades de Guayas. Esmeraldas forma un clado relacionado con las localidades de Guayas, y Chone no está agrupada por región geográfica.

Figura 5. Árbol filogenético de *Hoplias* spp. en el Ecuador a partir de la Región de Control.



Las poblaciones de *Hoplias microlepis* en la costa ecuatoriana tanto para la Región de Control como en el gen ATPasa muestran agrupamiento de acuerdo a su ubicación geográfica. Santa Rosa, Arenillas, Chone y Esmeraldas, poseen secuencias que se agrupan con la cuenca del Guayas, pero no se agrupan entre ellos, con excepción de Santa Rosa y Arenillas que están muy cercanos geográficamente (provincia de El Oro).

3.2 Diversidad y Estructura Genética de las Poblaciones de Guanchiche en la Costa Ecuatoriana.

La diversidad y estructura genética del guanchiche fue analizada por sitio y por sistema hidrográfico (sitios agrupados por cuencas) a partir de 839 pb para la región ATPasa y de 460 a 560 pb para la CR en *Hoplias spp.* y 706 pb en la especie ubicada en la localidad de San Agustín (Santiago-Cayapas). La variación en el número de pares de bases es debido a las inserciones de las regiones repetitivas.

Secuenciando el fragmento del gen de ATPasa se encontraron dieciocho haplotipos (Tabla III) con una mayor dominancia en: H1 (frec = 31), H9 (frec = 13) y H11 (frec = 11) y los de menor frecuencia: H10, H4, H17 y H18 (frec= 1). Los haplotipos H2, H3, H4, H5, H6, H10, H15, H17 y H18 pertenecen específicamente a la cuenca del río Guayas. La cuenca Santiago-Cayapas posee sólo el haplotipo H14. Santa Rosa y Arenillas tienen dos haplotipos, el

H7 sólo les corresponde a ellos y el otro haplotipo (H1) lo comparten con la cuenca del Guayas. Chone tiene tres haplotipos en donde sus localidades comparten el haplotipo H11, La Segua posee el H16 como haplotipo único y La Esperanza con su haplotipo H9 que comparte con las localidades de Santa Lucía y Daule Peripa pertenecientes a la cuenca del Guayas.

Tabla III. Frecuencia de haplotipos por localidad de *Hoplias spp.* del gen ATPasa

	Esmeral	S-C	Chone		Guayas							Santa Rosa	Arenillas	Pastaza	Frec. Total
	Vc	SA	Sg	Es	Vi	SL	BH	DP	SA	Ba	Ch	BV	Ta	Pu	
H 1					5		3		4	3	3	8	5		31
H 2					3	1		1	1	2	1				9
H 3							2			2	3				7
H 4							1								1
H 5							1		1						2
H 6							1		1						2
H 7												4	3		7
H 8	2										1				3
H 9				3	4			6							13
H 10								1							1
H 11			6	5											11
H 12														8	8
H 13														4	4
H 14		6													6
H 15					1				1						2
H 16			2												2
H 17					1										1
H 18					1										1
N	2	6	8	8	8	8	8	8	8	7	8	12	8	12	111

En la Región de Control se generaron 45 haplotipos (Tabla IV). Se observa la mayor frecuencia haplotípica en H 20 con una frecuencia total de 47,

alelos con un N=8 (Abras de mantequilla, Daule Peripa, Represa Chongon, La Segua, La Esperanza y Represa Tahuin), N=7 (Balzar), N=12 (Puyo y Buenavista). Viche (N=2) y San Agustín (N=6) poseen un solo haplotipo (Tabla V). La mayor diversidad haplotípica se atribuye a Babahoyo con 0,857, seguidos de Santa Lucía, Samborondón, Balzar, y represa Chongon con un rango de 0,761 a 0,786. San Agustín posee baja diversidad haplotípica debido a que sólo tiene un alelo al igual que Viche. Puyo (*Hoplias malabaricus*) y San Agustín poseen alelos que no comparten con ninguna otra localidad (100% de alelos privados). Así mismo, Guayas presenta un 75% de alelos privados (N=55) mientras que Chone posee un 66% (N=16) (Tabla VI).

Tabla V. Diversidad genética de *Hoplias spp.* en el Ecuador por sitio (Gen ATPasa).

Sitio	N	Número de Haplotipos	Alelos privados	% Alelos privados	Diversidad Haplotípica
Abras de Mantequilla	8	2	0	0,00	0,536
Santa Lucía	8	5	2	40,00	0,786
Babahoyo	8	5	1	20,00	0,857
Represa Daule-Peripa	8	3	1	33,33	0,464
Samborondón	8	5	0	0,00	0,786
Balzar	7	3	0	0,00	0,761
Represa Chongón	8	4	0	0,00	0,786
Viche	2	1	0	0,00	0,000
La Segua	8	2	1	50,00	0,429
La Esperanza	8	2	0	0,00	0,536
Buнавista	12	2	0	0,00	0,485
Represa Tahuin	8	2	0	0,00	0,536
San Agustín	6	1	1	100,00	0,000
Puyo	12	2	2	100,00	0,485
	111				

El nivel de Diversidad haplotípica de las poblaciones está representada por una barra color azul, tomando como referencia el valor más alto de la columna.

Tabla VI. Diversidad genética de *Hoplias spp.* por cuencas hidrográficas (Gen ATPasa).

Sitio	N	Número de Haplotipos	Alelos privados	% Alelos privados	Diversidad Haplotípica
Guayas	55	12	9	75,00	0,826
Esmeraldas	2	1	0	0,00	0,000
Chone	16	3	2	66,67	0,507
Santa Rosa	12	2	0	0,00	0,485
Arenillas	8	2	0	0,00	0,536
Santiago-Cayapas	6	1	1	100,00	0,000
Pastaza	12	2	2	100,00	0,485
	111				

El nivel de Diversidad haplotípica de las cuencas está representada por una barra color azul, tomando como referencia el valor más alto de la columna.

En el caso de CR los que poseen mayor número de haplotipos pertenecen a las localidades de Babahoyo (N=25), represa Chongón (N=25), Abras de Mantequilla (N=8), Samborondón (N=8) y Buenavista (N=10) con 16, 11, 8, 8 y 7 haplotipos respectivamente. Todas estas localidades poseen una diversidad haplotípica elevada (de 0,830 a 1). La localidad de menor número de haplotipos le corresponde a la Segua(N=7), la cual posee un solo alelo no privado en su población. La represa Tahuin (N=7) tampoco posee alelos privados teniendo dos haplotipos. (Tabla VII).

La cuenca de Chone (N=15) posee una diversidad haplotípica baja (0,134) de sus dos alelos, de los cuales uno es privado, mientras que a Santa Rosa (N=10) le corresponde una diversidad haplotípica de 0,900 de sus siete alelos y tres de estos privados para esta Cuenca. Guayas con una población N=105 tiene 32 alelos, 29 de esto son privados y con una diversidad haplotípica de 0,884 (Tabla VIII).

Tabla VII. Diversidad genética de *Hoplias spp.* por sitio (Región de Control)

Sitio	N	Número de Haplotipos	Alelos privados	% Alelos privados	Diversidad Haplotípica
Abras de Mantequilla	8	8	1	12,50	1,000
Santa Lucía	8	4	1	25,00	0,642
Babahoyo	25	16	7	43,75	0,946
Represa Daule-Peripa	25	7	3	42,86	0,590
Samborondón	8	8	1	12,50	1,000
Balzar	6	6	2	33,33	1,000
Represa Chongón	25	11	2	18,18	0,830
Viche	2	2	2	100,00	1,000
La Segua	7	1	0	0,00	0,000
La Esperanza	8	2	1	50,00	0,250
Buнавista	10	7	3	42,86	0,900
Represa Tahuin	7	2	0	0,00	0,476
San Agustín	5	2	2	100,00	0,400
Puyo	12	3	3	100,00	0,592
	156				

El nivel de Diversidad Haplotípica de las poblaciones está representada por una barra color azul, tomando como referencia el valor más alto de la columna.

Tabla VIII. Diversidad genética de *Hoplias spp.* por cuenca hidrográfica (Región de Control)

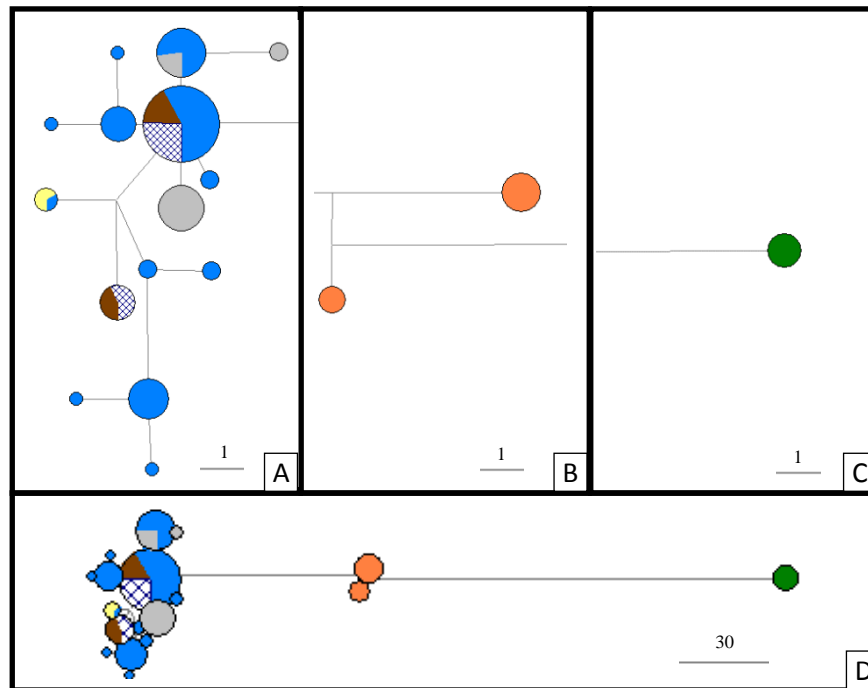
Cuencas	N	Número de Haplotipos	Alelos privados	% Alelos privados	Diversidad Haplotípica
Guayas	105	32	29	90,63	0,884
Esmeraldas	2	2	2	100,00	1,000
Chone	15	2	1	50,00	0,134
Santa Rosa	10	7	3	42,86	0,900
Arenillas	7	2	2	100,00	0,476
Santiago-Cayapas	5	2	2	100,00	0,400
Pastaza	12	3	3	100,00	0,592
	156				

El nivel de Diversidad Haplotípica de las cuencas está representada por una barra color azul, tomando como referencia el valor más alto de la columna.

3.3 Red de Haplotipos

La red de haplotipos muestra de forma esquematizada los haplotipos antes mencionados para el gen ATPasa y Región de Control. En la (Figura 6 D) los dieciocho haplotipos para el gen ATPasa forman tres grupos estructurados. Se muestra un solo haplotipo para la cuenca Santiago-Cayapas siendo esta la más alejada (Figura 6 C), dos haplotipos para Pastaza (Figura 6 B) y el último grupo que relaciona las cuencas de Guayas, Chone, Santa Rosa, Arenillas y Esmeraldas (Figura 6 A). Se evidencia una relación haplotípica entre las cuenca del Guayas con Santa Rosa y Arenillas. Esmeraldas comparte un haplotipo con Guayas. Chone también comparte un haplotipo con Guayas.

Figura 6. Red de Haplotipos de *Hoplias spp.* para el gen ATPase del ADNmt

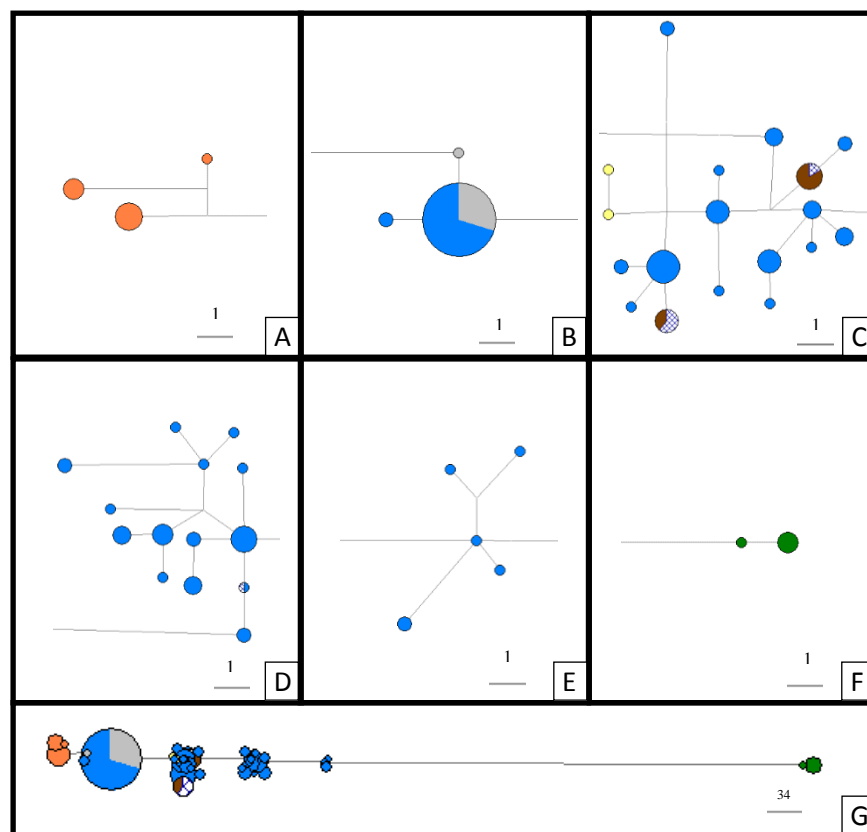


Se utilizó el programa Network 4.6.1.3. Los círculos muestran los distintos haplotipos y el tamaño de los mismos es proporcional a las frecuencias. Los colores representan las distintas cuencas del Ecuador donde se recolectaron las muestras. La barra inferior indica el número de pasos mutacionales entre los haplotipos.

En la red de Haplotipos de la Región de Control Se observan seis grupos (Figura 7 G). La cuenca de Pastaza, formado por tres haplotipos (Figura 7 A). En la Figura 7 B se agrupan tres haplotipos, uno de ellos dominante, que relaciona a Guayas y Chone, los otros dos con menor frecuencia, corresponden a dos haplotipos independientes para Guayas y Chone. La Figura 7 C relaciona a las cuencas Guayas, Santa Rosa, Arenillas y Esmeraldas, sin embargo ninguno comparte haplotipos excepto Arenilla con

Santa Rosa. La Figura 7 D contiene en su mayoría haplotipos pertenecientes a la cuenca del Guayas y uno de ellos es compartido con la cuenca de Santa Rosa. La Figura 7 E posee cinco haplotipos correspondientes a la cuenca del Guayas. La Figura 7 F pertenece a la cuenca Santiago-Cayapas con dos haplotipos, se encuentra bastante alejado de los demás grupos.

Figura 7. Red de Haplotipos de *Hoplias spp.* para la CR del ADNmt.



Guayas ■ Santa Rosa Santiago-Cayapas ■ Pastaza ■
 Chone Esmeraldas Arenillas

Se utilizó el programa Network 4.6.1.3. Los círculos muestran los distintos haplotipos y el tamaño de los mismos es proporcional a las frecuencias. Los colores representan las distintas cuencas del Ecuador donde se recolectaron las muestras. La barra inferior indica el número de pasos mutacionales entre los haplotipos.

3.4 Diferencias Pareadas F_{ST}

Se calculó la estructura genética poblacional de *Hoplias spp.* en el Ecuador por medio del método de comparaciones pareadas con el estadístico F_{ST} con su respectivo valor de significancia ($p=0.05$). Esta medida de diferenciación genética compara poblaciones de la misma especie de diferentes regiones geográficas, permitiéndonos estimar el comportamiento de las poblaciones en cuanto a la importancia en conjunto del flujo génico y la deriva genética (53) (49). Valores más altos de F_{ST} indican mayor divergencia genética.

En la Tabla IX se muestran los valores F_{ST} para el gen ATPasa. Resaltado en negrita se encuentran los valores de significancia $p<0.05$, evidenciando aquellas localidades que poseen una diferenciación genética altamente significativa. Dentro de la cuenca del Guayas no se observan diferencias genéticas significativas (F_{ST} de 0 a 0,172) excepto entre las represas Daule Peripa y Chongón (0,141) y Daule Peripa con Abras de Mantequilla (0,191) (Tabla IX). Viche (Esmeraldas) presenta diferencias genéticas con el resto de poblaciones de *Hoplias* ($F_{ST}>0,305$) con un alto valor de significancia ($p<0,05$) para las localidades de Santa Lucia, represa Daule Peripa, cuenca Chone y represa Tahuin, mientras que para las demás localidades restantes se muestra diferencias pero con bajo valor de significancia ($p>0,05$).

No hay diferencias significativas entre La Segua y La Esperanza pertenecientes a la cuenca Chone ($F_{ST}=0$, $p=0,576$). Las localidades de Buenavista y represa Tahuin (provincia de El Oro) tampoco difieren genéticamente entre sí ($F_{ST}=0$; $p=0,99$), no obstante se diferencian en conjunto de Abras de Mantequilla, Santa Lucia, Daule Peripa, Viche y las dos localidades de la cuenca Chone (La Segua y La Esperanza). Mientras que presentan poca diferencia genética con Babahoyo, Samborondón, Balzar, y Chongón (Tabla IX). Tanto Puyo y San Agustín se diferencian genéticamente entre sí ($F_{ST}=0,981$; $p<0,001$) al igual que con las demás localidades.

Los resultados de las mismas localidades agrupadas en sus respectivas cuencas muestra que la cuenca del Guayas es moderadamente diferente genéticamente de Chone ($F_{ST}=0,162$; $P<0,001$), Santa Rosa ($F_{ST}=0,109$; $p=0,036$) y fuertemente diferente de Esmeraldas ($F_{ST}=0,343$; $p=0,027$) (Tabla XII). La cuenca Chone se diferencia fuertemente con Santa Rosa, Arenillas y Esmeraldas (F_{ST} de 0,335 a 0,826). Santa Rosa es muy similar genéticamente a Arenillas ($F_{ST}=0$; $p=0,99$), moderadamente diferente a Guayas ($F_{ST}=0,109$; $p=0,036$), mientras que es significativamente diferente a Chone y Esmeraldas. Arenillas es moderadamente similar a Guayas ($F_{ST}=0,108$; $p=0,063$) y muy diferente a Chone y Esmeraldas. Esmeraldas difiere fuertemente de las demás cuencas (F_{ST} de 0,343 a 0,826). La cuenca

Santiago-Cayapas es altamente diferente de las demás cuencas al igual que Pastaza ($F_{ST} > 0,957$).

En la matriz de la Región de Control por localidad, se presenta una mayor estructuración poblacional dentro de la cuenca del río Guayas, a diferencia del gen ATPasa, como se muestra en la Tabla X. Abras de Mantequilla y Babahoyo difieren con Daule Peripa y Santa Lucia. Daule Peripa además muestra diferenciación genética con Samborondón y Balzar. Así mismo La represa Chongón con Babahoyo al igual que Santa Lucia y Balzar. Por otra parte, La Segua y La Esperanza (cuenca Chone) además de ser muy similares genéticamente, muestran patrones de diferenciación genética parecidos, con respecto a las demás localidades. En donde se observa una similitud es con las poblaciones de Santa Lucia y Daule Peripa.

La represa Tahuin guarda semejanzas con Samborondón y Buenavista. Además este último mantiene similitudes con Abras de Mantequilla, Babahoyo, Samborondón, Balzar y Viche.

Al igual que con la matriz de ATPasa, las localidades de San Agustín y Puyo difieren de las demás así como entre ellas.

La cuenca del Guayas (Tabla XII) muestra poca diferenciación con Santa Rosa ($F_{ST} = 0,080$), gran diferencia de Chone ($F_{ST} = 0,343$) y moderada diferencia genética de Arenillas ($F_{ST} = 0,160$) y Esmeraldas ($F_{ST} = 0,19$). Chone presenta una importante diferenciación con las demás cuencas,

principalmente con Arenillas ($F_{ST}=0,943$), Santa Rosa ($F_{ST}=0,762$) y Esmeraldas ($F_{ST}=0,943$) que se ubican en los extremos sur y norte del Ecuador. La población de Santa Rosa es muy similar a Arenillas ($F_{ST}=0,066$) y difiere levemente de Esmeraldas ($F_{ST}=0,129$). Arenillas difiere de la cuenca de Esmeraldas ($F_{ST}=0,597$). Las cuencas Santiago-Cayapas y Pastaza se diferencian entre si y de las demás (F_{ST} de 0,672 a 0,998).

Vale destacar que se encuentra una afinidad general entre las tablas de matrices pareadas, manifestando similitud en el patrón de diferenciación genética entre localidades medidas con los dos genes diferentes (ATPasa y CR).

Tabla IX. Matriz de diferencias pareadas F_{ST} y valor P para el gen ATPasa del género *Hoplias* en el Ecuador

	Vi	SL	Bh	DP	Sa	Ba	Ch	Vc	Sg	Es	Bv	Ta	SA	Pu
Vi	-	0,306	0,603	0,036	0,792	0,639	0,252	0,108	< 0,001	< 0,001	0,018	0,162	< 0,001	< 0,001
SL	0	-	0,342	0,783	0,342	0,45	0,243	0,045	0,036	0,162	0,045	0,036	< 0,001	< 0,001
Bh	0	0,009	-	0,081	0,927	0,927	0,729	0,072	0,009	< 0,001	0,171	0,216	< 0,001	< 0,001
DP	0,191	0	0,15	-	0,072	0,144	0,027	0,018	0,009	0,054	< 0,001	0,027	< 0,001	< 0,001
Sa	0	0	0	0,172	-	0,738	0,414	0,081	< 0,001	< 0,001	0,072	0,153	< 0,001	< 0,001
Ba	0	0	0	0,13	0	-	0,837	0,081	< 0,001	< 0,001	0,09	0,144	< 0,001	< 0,001
Ch	0,022	0,022	0	0,141	0	0	-	0,216	< 0,001	< 0,001	0,108	0,189	< 0,001	< 0,001
Vc	0,37	0,342	0,305	0,563	0,362	0,373	0,393	-	0,027	0,009	0,063	0,036	0,045	0,009
Sg	0,308	0,169	0,233	0,206	0,259	0,236	0,202	0,831	-	0,576	< 0,001	0,009	< 0,001	< 0,001
Es	0,308	0,128	0,233	0,118	0,259	0,236	0,202	0,83	0	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Bv	0,165	0,171	0,093	0,263	0,096	0,12	0,093	0,472	0,277	0,277	-	0,99	< 0,001	< 0,001
Ta	0,148	0,153	0,078	0,261	0,085	0,108	0,091	0,44	0,314	0,314	0	-	< 0,001	< 0,001
SA	0,983	0,978	0,981	0,986	0,984	0,983	0,985	1	0,995	0,995	0,986	0,987	-	< 0,001
Pu	0,959	0,954	0,958	0,963	0,961	0,959	0,962	0,966	0,972	0,972	0,966	0,964	0,981	-

Matriz de diferencias pareadas F_{ST} (valores esquina inferior) y valor P indicando la significancia estadística de los valores F_{ST} (valores esquina superior) con 110 permutaciones y nivel de significancia = 0.05.

Tabla X. Matriz de diferencias pareadas F_{ST} y valor P para la CR del género *Hoplias* en el Ecuador

	Vi	SL	Bh	DP	Sa	Ba	Ch	Vc	Sg	Es	Bv	Ta	SA	Pu
Vi	-	<0,001	0,864	<0,001	0,477	0,351	0,090	0,162	<0,001	<0,001	0,423	0,036	<0,001	<0,001
SL	0,355	-	<0,001	0,576	0,063	0,036	0,387	0,081	0,162	0,180	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Bh	0	0,302	-	<0,001	0,711	0,378	0,009	0,018	<0,001	<0,001	0,387	0,009	<0,001	<0,001
DP	0,392	0	0,362	-	0,027	0,009	0,090	<0,001	0,252	0,099	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Sa	0	0,203	0	0,270	-	0,450	0,279	0,162	<0,001	<0,001	0,432	0,054	<0,001	<0,001
Ba	0,004	0,279	0	0,370	0	-	0,090	0,081	<0,001	<0,001	0,567	0,009	<0,001	<0,001
Ch	0,104	0	0,104	0,069	0,014	0,078	-	0,261	0,027	0,027	0,045	0,009	<0,001	<0,001
Vc	0,282	0,369	0,162	0,417	0,153	0,048	0,107	-	0,027	0,054	0,189	0,027	0,045	0,009
Sg	0,746	0,187	0,604	0,095	0,626	0,653	0,275	0,990	-	0,990	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Es	0,755	0,207	0,611	0,108	0,641	0,669	0,286	0,978	0	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Bv	0	0,309	0	0,383	0	0	0,103	0,129	0,673	0,685	-	0,126	<0,001	<0,001
Ta	0,330	0,444	0,189	0,456	0,179	0,199	0,188	0,597	0,918	0,915	0,066	-	<0,001	<0,001
SA	0,951	0,950	0,928	0,933	0,941	0,927	0,905	0,995	0,998	0,997	0,939	0,987	-	<0,001
Pu	0,851	0,780	0,791	0,728	0,819	0,812	0,687	0,897	0,900	0,901	0,823	0,908	0,979	-

Matriz de diferencias pareadas F_{ST} (valores esquina inferior) y valor P indicando la significancia estadística de los valores F_{ST} (valores esquina superior) Se realizaron 110 permutaciones y nivel de significancia = 0.05

Tabla XI. Matriz de significancia de los valores p, poblaciones de *Hoplias* (ATPasa y CR) en el Ecuador,

ATPase	CR	Guayas						Esme.	Chone		S. Rosa	Arenillas	S-C	Past.	
		Vi	SL	Bh	DP	Sa	Ba	Ch	Vc	Sg	Es	Bv	Ta	SA	Pu
Guayas	Vi		+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
	SL	-		+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	Bh	-	-		+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
	DP	+	-	-		+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
	Sa	-	-	-	-		-	-	-	+	+	-	-	+	+
	Ba	-	-	-	-	-		-	-	+	+	-	+	+	+
	Ch	-	-	-	+	-	-		-	+	+	+	+	+	+
Esme.	Vc	+	+	-	-	-	+	-		+	-	-	+	+	+
Chone	Sg	+	+	+	+	+	+	+	-		-	+	+	+	+
	Es	+	-	+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+
S. Rosa	Bv	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+		-	+	+
Arenillas	Ta	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-		+	+
S-C	SA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+
Past.	Pu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Los sitios están agrupados en sus respectivas cuencas hidrográficas. De color azul representa al gen ATPasa y el rojo a la CR. El símbolo "+" indica diferencia significativa entre las poblaciones y el símbolo "-" indica que no hay diferencia significativa.

Tabla XII. Matriz de diferencias pareadas F_{ST} y valor P para el gen ATPasa por Cuencas hidrográficas.

	Guayas	Chone	Santa Rosa	Arenillas	Esmeraldas	Santiago-Cayapas	Pastaza
Guayas	-	<0,001	0,036	0,063	0,027	<0,001	<0,001
Chone	0,162	-	<0,001	<0,001	0,009	<0,001	<0,001
Santa Rosa	0,109	0,335	-	0,990	0,027	0,009	<0,001
Arenillas	0,108	0,383	0	-	0,045	<0,001	<0,001
Esmeraldas	0,343	0,826	0,472	0,440	-	0,045	0,009
Santiago-Cayapas	0,973	0,994	0,986	0,987	1	-	<0,001
Pastaza	0,957	0,978	0,966	0,964	0,967	0,98162	-

Matriz de diferencias pareadas F_{ST} (valores esquina inferior) y valor P indicando la significancia estadística de los valores F_{ST} (valores esquina superior). Se realizaron 110 permutaciones y nivel de significancia = 0.05

Tabla XIII. Matriz de diferencias pareadas F_{ST} y valor P para la CR por cuenca hidrográfica

	Guayas	Chone	Santa Rosa	Arenillas	Esmeraldas	Santiago-Cayapas	Pastaza
Guayas	-	<0,001	0,036	0,027	0,090	<0,001	<0,001
Chone	0,343	-	<0,001	<0,001	0,027	<0,001	<0,001
Santa Rosa	0,080	0,762	-	0,180	0,180	<0,001	<0,001
Arenillas	0,160	0,943	0,066	-	0,054	<0,001	<0,001
Esmeraldas	0,119	0,987	0,129	0,597	-	0,054	0,009
Santiago-Cayapas	0,901	0,998	0,939	0,987	0,995	-	<0,001
Pastaza	0,672	0,927	0,823	0,908	0,897	0,979	-

Matriz de diferencias pareadas F_{ST} (valores esquina inferior) y valor P indicando la significancia estadística de los valores F_{ST} (valores esquina superior). Se realizaron 110 permutaciones y nivel de significancia = 0.05.

Tabla XIV. Matriz de significancia de los valores p, poblaciones de *Hoplias* (ATPasa y CR) por cuencas hidrográficas.

ATPase\CR	Guayas	Chone	Santa Rosa	Arenillas	Esmeraldas	Santiago-Cayapas	Pastaza
Guayas		+	+	+	-	+	+
Chone	+		+	+	+	+	+
Santa Rosa	+	+		-	-	+	+
Arenillas	-	+	-		-	+	+
Esmeraldas	+	+	+	+		-	+
Santiago-Cayapas	+	+	+	+	+		+
Pastaza	+	+	+	+	+	+	

De color azul está representado el gen ATPasa y en rojo la Región de Control. El símbolo "+" indica diferencia significativa entre las poblaciones y el símbolo "-" indica que no hay diferencia significativa.

3.5 AMOVA, *Hoplias spp.* ATPasa y Región de Control

Para el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de *Hoplias spp.* se agruparon las poblaciones por sistema hidrográfico de la siguiente manera: Grupo 1: Abras de mantequilla, Santa Lucia, Babahoyo, Represa Daule Peripa, Samborondón, Balzar, Represa Chongón pertenecientes a la cuenca del río Guayas. Grupo 2: Viche perteneciente a la cuenca de Esmeraldas. Grupo 3: La Segua y la Esperanza pertenecientes a la cuenca Chone. Grupo 4: Buenavista perteneciente a la cuenca Santa Rosa. Grupo 5: Represa Tahuin perteneciente a la cuenca Arenillas. Grupo 6: San Agustín, perteneciente a la cuenca Santiago-Cayapas y grupo 7: Puyo, perteneciente a la cuenca Pastaza.

En la matriz se observa un porcentaje de variación similar para ambos genes mitocondriales (*Tabla XV*). Evidenciando un alto porcentaje de variación entre las cuencas; (ATPasa 93.16 % y CR 66.92%) con un índice de fijación F_{CT} de 0.931 y 0.669, ambos con un valor de significancia $p < 0.001$. El porcentaje de variación entre las poblaciones dentro de las cuencas para el gen ATPasa es de 0.19% con un F_{SC} de 0.027 y un valor de confianza de $p = 0.383$. Así mismo, la Región de Control presenta un porcentaje de variación de 6.29%, un F_{SC} de 0.190 y un valor de significancia de $p < 0.001$. Finalmente el porcentaje de varianza dentro de las poblaciones corresponde a un 6.66% para ATPasa y 26.79% para la Región de Control, con un F_{ST} de 0.933 ($p = 0.026$) y 0.732 (< 0.001).

Tabla XV. AMOVA de las poblaciones de *Hoplias spp.* muestreadas en el Ecuador agrupadas por cuencas hidrográficas.

Fuente de Variación	ATPasa				Región de Control			
	D.F	porcentaje de variación	Índice de Fijación	Valor p	D.F	porcentaje de variación	Índice de Fijación	Valor p
Entre las cuencas	6	93,16	F_{CT} : 0,931	<0,001	6	66,92	F_{CT} : 0,669	<0,001
Entre poblaciones dentro de las cuencas	7	0,19	F_{SC} : 0,027	0,383	7	6,29	F_{SC} : 0,190	<0,001
Dentro de las poblaciones	97	6,66	F_{ST} : 0,933	0,026	142	26,79	F_{ST} : 0,732	<0,001
Total	110				155			

3.6 AMOVA, *Hoplias microlepis* ATPasa y Región de control

Para el AMOVA de *Hoplias microlepis*, se agruparon las poblaciones por sistema hidrográfico de la siguiente manera: Grupo 1: Abras de mantequilla, Santa Lucía, Babahoyo, Represa Daule Peripa, Samborondón, Balzar, Represa Chongon pertenecientes a la cuenca del río Guayas. Grupo 2: Viche perteneciente a la cuenca de Esmeraldas. Grupo 3: La Segua y la Esperanza pertenecientes a la cuenca Chone. Grupo 4: Buenavista perteneciente a la cuenca Santa Rosa. Grupo 5: Represa Tahuin perteneciente a la cuenca Arenillas.

En la matriz de AMOVA (Tabla XVI) se observa un porcentaje de variación relativamente similar en ambos genes mitocondriales, evidenciando un bajo

porcentaje de variación entre las cuencas (ATPasa 17,08% y CR 21,96%), con un índice de fijación F_{CT} de 0,170 y 0,219, y con un valor de significancia $p < 0,001$ y $p = 0,011$, respectivamente. El porcentaje de variación entre las poblaciones dentro de las cuencas para el gen ATPasa es de 1,71% con un F_{SC} de 0,020 y un valor $p = 0,397$. Así mismo en la CR presenta un porcentaje de variación de 13,61%, un F_{SC} de 0,17 y un valor de significancia de $p < 0,001$. Finalmente el porcentaje de varianza dentro de las poblaciones corresponde a un 81,21% para ATPasa y 64,43% para la CR, con un F_{ST} de 0,187 ($p < 0,001$) y 0,355 ($p < 0,001$).

Tabla XVI. AMOVA de la región de control de poblaciones de *Hoplias micolepis* agrupadas por cuencas hidrográficas en la costa ecuatoriana.

Fuente de Variación	ATPasa				Región de Control			
	D.F	porcentaje de variación	Índice de Fijación	Valor p	D.F	porcentaje de variación	Índice de Fijación	Valor p
Entre las cuencas	4	17,08	F_{CT} : 0,170	<0,001	4	21,96	F_{CT} : 0,219	0,011
Entre poblaciones dentro de las cuencas	7	1,71	F_{SC} : 0,020	0,397	7	13,61	F_{SC} : 0,17	<0,001
Dentro de las poblaciones	81	81,21	F_{ST} : 0,187	<0,001	127	64,43	F_{ST} : 0,355	<0,001
Total	92				138			

CAPITULO IV

4 DISCUSIÓN

4.1 Distribución y problemas en la taxonomía del género *Hoplias*

La complejidad taxonómica que manifiesta *H. malabaricus* ha presentado problemas de identificación en sitios como Colombia, donde anteriormente se confundía a la especie *H. microlepis* con *H. malabaricus*, debido a su extremo parecido morfológico (26). Actualmente se mantiene registrada a *H. malabaricus* en esta región. *H. microlepis* se encuentra distribuida desde Costa Rica hasta el norte de Perú, manteniéndose ausente en el país Colombiano, aunque Mattox *et al.* (26), menciona que esto no necesariamente signifique que la especie no se encuentre en este sitio.

En el Ecuador, *Hoplias malabaricus* se encuentra distribuida en la parte oriental y en la costa norte del País, mientras que *Hoplias microlepis* está

restringida solo a la costa ecuatoriana (20). En el presente estudio se realizó un análisis a nivel molecular a partir de ADNmt del género *Hoplias* (Characiformes: Erythrinidae) en la costa ecuatoriana, desde la provincia de Esmeraldas hasta la provincia de El Oro y una población de la cuenca de Pastaza al oriente, para determinar la estructuración genética de las poblaciones en relación de su distribución geográfica. El análisis filogenético de *Hoplias spp.* (Figura 4 y Figura 5) confirma la existencia de tres especies genéticamente bien diferenciadas. En el oriente se encontraría una especie bien diferenciada genéticamente, *H. malabaricus* (39). La segunda especie, *H. microlepis* estaría ampliamente distribuida en la costa del Ecuador, encontrándose desde el sur en las cuencas de Arenillas y Santa Rosa, a través de toda la cuenca del Río Guayas, en la cuenca del Río Chone al oeste de la cordillera de la costa y posiblemente en la cuenca del Río Esmeraldas (este último resultado tiene que ser conformado mediante mejores muestreos pues esta conclusión está basada en dos individuos colectados en el Río Viche). Es decir, todas las poblaciones de *Hoplias* en la región de la costa desde el Río Esmeraldas hasta el norte de Perú, serían *H. microlepis*. La tercera especie de *Hoplias*, que es muy divergente genéticamente y también distinta morfológicamente a *H. microlepis* en el tamaño y número de escamas, se encontraría en la cuenca de los ríos Santiago-Cayapas. Esta forma, que actualmente se conoce como *H. malabaricus*, es también muy diferente genéticamente a *H. malabaricus* del

Oriente y debe ser una especie distinta aunque es similar en su morfología (incluyendo en el número y tamaño de sus escamas). Los valores de divergencia genética entre esta especie y las otras dos son $F_{ST} \geq 0,90$ (Tabla XII y XIII). Además se encontró una relación más cercana entre las especies de la Costa y el Oriente que con esta especie del norte (Figura 4 y 5), hecho que también se puede notar en la red de haplotipos (Figura 6 y 7).

Es posible que esta especie en la cuenca de Santiago-Cayapas haya sido confundida previamente como *H. malabaricus* debido a su similitud morfológica y que se trate de la otra especie cercana dentro del grupo de *H. malabaricus* como *Hoplias teres* (26). También se podría tratar de una nueva especie de *Hoplias*, que no está descrita. Dado el gran rango de distribución de *H. malabaricus*, la cual se ha registrado desde Argentina hasta América Central (23), es muy probable que esta especie es en realidad un complejo de especies biológicas que son morfológicamente similares. Se requieren estudios taxonómicos detallados para verificar si es que la forma de *Hoplias* en la cuenca Santiago-Cayapas se trata de una especie existente de *Hoplias* que no ha sido registrada previamente para el Ecuador o una especie nueva para la ciencia.

4.2 Uso de marcadores genéticos en estudios de evolución y biodiversidad.

La Región de Control por ser una región no codificante, posee una mayor tasa de sustitución nucleotídica, siendo un buen candidato para estudios intraespecíficos (54), mientras que los genes codificantes de proteínas (e.g., ATPasa, Citocromo b, ND2) presentan una mayor presión de selección, manteniendo su región más conservada (i.e., la tasa de mutación es más lenta), siendo su uso común en análisis interespecíficos (54). Sin embargo resulta interesante poder comparar la información que este tipo de genes con diferentes tasas de evolución nos brinda, permitiéndonos inferir los posibles procesos evolutivos dentro de una especie singular. La cuenca del Guayas, una de las más grandes del Ecuador, presenta una alta diversidad genética, tanto en CR (0,826) como en ATPasa (0,884), sin embargo en CR, se puede visualizar un posible proceso de divergencia genética entre ríos relativamente cercanos dentro de Guayas (Tabla X), situación que no se logra apreciar con el gen ATPasa (Tabla IX). El gen ATPasa posiblemente requerirá de mucho más tiempo para que se puedan presentar estas diferencias. Esto sugiere que la diversificación que ocurre dentro de la cuenca del Guayas probablemente sea mucho más reciente que la que se observa entre poblaciones del Río Guayas y poblaciones regiones más alejadas geográficamente (Esmeraldas, Chone, Arenillas y Santa Rosa).

4.3 Filogeografía y estructura poblacional de *H. microlepis* en la costa ecuatoriana

Barriga (20) en su lista de peces de agua dulce e intermareales del Ecuador, realiza una clasificación de zonas ictiohidrográficas, separando las regiones hidrográficas de acuerdo a la similitud y disimilitud de especies de peces en la Costa y el Oriente con 5 y 6 zonas ictiohidrográficas respectivamente. La zona ictiohidrográfica de Guayas corresponde a la más biodiversa en la costa (20), abarcando una gran extensión que incluye a la cuenca del río Chone, denotando la similitud de especies que existen dentro de esta zona. Esto concuerda con los resultados respecto a la relativa similitud que posee *Hoplias microlepis* dentro de la cuenca del Guayas (Tabla IX y X), incluso compartiendo ciertos haplotipos con Chone y con la cuenca Arenillas y Santa Rosa, estas dos últimas que en el contexto de las zonas ictiohidrográficas vendrían a formar parte de la zona Catamayo (20).

La estructura poblacional de *H. microlepis* presenta altos niveles de divergencia, en relación a su posición geográfica. La divergencia genética entre poblaciones aisladas geográficamente es un patrón que se observa en la naturaleza y ha sido documentado para otros grupos de organismos del país con amplio rango de distribución. Este es el caso de *Anolis gemmosus* y *A. aequatorialis*, dos especies de lagartijas que habitan en los Andes del Ecuador con similar distribución, ecología y morfología. A base de secuencias de los genes mitocondriales ND2 y seis ARNt, se encontró que ambas

especies presentan limitado flujo genético entre sus poblaciones, frente a las mismas barreras geográficas, a pesar de que estas especies difieren en cómo han adquirido sus actuales distribuciones geográficas (55). Otro estudio similar que incluye especies del Ecuador, fue realizado en colibríes del género *Adelomyia* a lo largo de la cordillera de los Andes en Suramérica y reveló que los niveles de divergencia genética estaban relacionados al aislamiento geográfico, siendo la diferencia mayor con mayor distancia de separación geográfica entre poblaciones (56). Estos resultados concuerdan con la correlación observada en este estudio entre los niveles de divergencia genética y la distancia geográfica entre poblaciones. Por ejemplo, las poblaciones de *H. microlepis* de las cuencas Arenillas y Santa Rosa (Sur del Ecuador) presentan distancias genéticas marcadas con la cuenca Chone que se encuentra muy distante geográficamente (Noroeste del Ecuador) con un $F_{ST} \approx 0,3$ y $\approx 0,8$ en ATPasa y CR respectivamente. Así mismo, Arenillas y Santa Rosa no poseen alelos privados individuales por cuencas, pero si comparten haplotipos entre ellos que no se encuentran en otras regiones. Lo mismo ocurre con la cuenca Chone donde las poblaciones de La Segua y la represa La Esperanza que comparten haplotipos y son similares genéticamente (Tabla III y IV). Sin embargo, todas estas cuencas presentan una moderada diferenciación con las poblaciones del Guayas. Esto permite inferir que existe una relación directa entre la distancia geográfica (ver mapa Figura 3) de las poblaciones y su divergencia genética (37) (38). El análisis

filogeográfico de *H. microlepis* presenta resultados concordantes a lo antes mencionado, con una topología similar en ambos genes (ATPasa y CR), aunque con diferente robustez en cuanto a las ramas formadas.

En la costa norte, Barriga (2012) separa a la zona de Esmeraldas de Santiago-Cayapas debido a la cantidad de endemismo que posee cada zona a pesar de su alto porcentaje de similitud (>60%). Barriga ubica a *Hoplias malabaricus* en estas zonas, mas no a *Hoplias microlepis*. Sin embargo, en este estudio se puede constatar la presencia de *Hoplias microlepis* en la cuenca de Esmeraldas, específicamente en la localidad de Viche, que a pesar de la baja cantidad de muestras colectadas (N=2), los haplotipos son muy similares a los haplotipos de especímenes colectados en el río Guayas. Para el gen de ATPasa, los dos especímenes de Viche (río Esmeraldas) son idénticos a un espécimen del río Guayas (Figura 6A), perteneciente a la localidad de Chongón (Tabla III), mientras que para el gen CR, son muy similares a haplotipos de especímenes colectados en el río Guayas (Figura 6B). Esta relación de Viche con Guayas también se puede observar en el análisis filogenético, donde es agrupado con Chongón en ATPasa y con Daule Peripa y Chongón en CR (Figura 4 y 5). En cambio los valores de diferenciación genética de Viche con las poblaciones de Guayas son elevadas ($F_{ST} \geq 0,30$) para el gen ATPasa, lo cual es contradictorio a los demás resultados, pudiendo tratarse de un artefacto provocado por el bajo

número de muestras. Por otro lado, CR presenta poca diferencia con Balzar, diferencia moderada con Babahoyo, Samborondón, y Chongón, que pertenecen a la cuenca del Guayas. Con el resto de localidades dentro de Guayas y el resto de cuencas se observa una elevada diferenciación en CR similar a ATPasa (Tabla IX y X). Los especímenes de Viche son muy distintos genéticamente de los especímenes de Santiago-Cayapas. De acuerdo a los resultados de este estudio, el cambio entre especies de *Hoplias* en la región de la costa se daría entre los ríos Esmeraldas y Santiago, no entre los ríos Guayas y Esmeraldas. Más, se necesita mejor muestreo de las poblaciones de *Hoplias* en la provincia de Esmeraldas para verificar los resultados encontrados en este estudio.

Un estudio reciente desarrollado por Aguirre *et al.*, (39) analiza estadísticamente la diversidad genética y morfométrica de las poblaciones de *H. microlepis* en ríos (Babahoyo y Quevedo) y embalses (Daule Peripa y Chongón) dentro de la cuenca del Guayas, empleando técnicas moleculares a partir de CR. Menciona que únicamente la represa Daule Peripa presenta una alta diferenciación con Babahoyo ($F_{ST}=0.206$) mientras que la represa Chongón con los ríos y además con Daule Peripa muestran tener distancias genéticas relativamente bajas ($F_{ST}\leq 0.085$). Concluye además que existe una mayor diversidad genética en ríos y mayor cantidad de alelos privados en los embalses (39). Estos resultados fueron confirmados en nuestros análisis utilizando CR y ATPasa (Tabla V y VII), puesto que se usó los mismos

primers para el gen CR y el mismo grupo de secuencias utilizados por Aguirre *et al.*, (39) en Daule Peripa, Babahoyo y Chongón (ver Tabla I). Se puede apreciar un comportamiento análogo al de Chongón con muestras de río cercanas (es decir, similitud con las especies de río y alta diversidad genética), en la represa Esperanza que es similar genéticamente con el río La Segua (Cuenca Chone) y la represa Tahuin con la muestra del río más cercano muestreado, el río Buenavista formando parte de las cuencas Arenillas y Santa Rosa respectivamente. En el caso de las poblaciones de represa y las muestras de río más cercanas geográficamente, la baja magnitud de divergencia genética ($F_{ST} \approx 0$), indica que existe, o ha habido en el pasado reciente, flujo genético entre las poblaciones de represa y río.

La represa Daule Peripa, presenta alta similitud con la muestra colectada en el río Daule en la localidad de Santa Lucía pero difiere de Balzar a pesar de encontrarse más cercano a la represa. Así mismo, Balzar y Santa Lucía, dos localidades contiguas que comparten el río Daule aparecen muy similares para el gen ATPasa pero presentan alta diferencia para el gen CR. Aunque no está claro por qué se produce esta particular divergencia, es probable que esto se deba a migraciones de individuos entre las poblaciones de Balzar, con otras localidades cercanas como Abras de Mantequilla que a su vez mantienen flujo genético con las demás localidades excepto con la represa Daule Peripa y Santa Lucía (ver Tabla X). La similitud genética entre las

muestras de Santa Lucía y la represa Daule Peripa (Tabla IX y X), sugiere que ha existido flujo genético entre estas poblaciones antes de la construcción del embalse. Esto concuerda con su ubicación geográfica, ya que ambas forman parte del Río Daule.

Cabe destacar que las localidades difieren con respecto a la diversidad genética, siendo esta mayor en los ríos, lo cual es consistente con el estudio previo realizado por Aguirre (39). Por ejemplo; la represa Daule Peripa presenta una reducida diversidad genética en comparación a los ríos con los que comparte la cuenca del Guayas (Tabla V), ocurriendo un patrón parecido en El Oro con las muestras de río Buenavista y represa Tahuin (Tabla VII), a pesar de tener elevada similitud entre sus poblaciones. Sin embargo, en la cuenca Chone, tanto el río como la represa muestran una diversidad genética baja (Tabla V), lo cual podría indicar un posible proceso de efecto fundador en estas poblaciones.

4.4 Conservación y pesquería

Hoplias microlepis conocido comúnmente como “guanchiche” en el Ecuador, corresponde a una fuente importante de proteína, principalmente para las áreas rurales en la costa. A pesar de ser portador asiduo de parásitos causantes de enfermedades en humanos (57). Es considerablemente explotado anualmente como lo reporta el INP con

extracciones de 48 toneladas en promedio (22). No obstante, es importante considerar el estado actual de conservación en el que se encuentra esta y todas las demás especies de peces que forman parte de la pesquería de agua dulce en la Costa. Puesto que se conoce muy poco de los peces dulceacuícolas de esta región del Ecuador, pese a la elevada intrusión que ha tenido por parte del ser humano que está causando serios peligros ambientales (39) (58). El presente estudio aporta información relacionada a la diversidad y divergencia genética de *H. microlepis* en la costa del Ecuador, pudiendo ser utilizado de forma comparativa con otras especies de distribución similar y enriqueciendo la base de datos de los recursos genéticos del País.

CAPITULO V

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El género *Hoplias* en la costa Ecuatoriana, presenta poblaciones genéticamente estructuradas en relación al sistema hidrográfico al que pertenecen, como también a la distancia de separación geográfica entre poblaciones.
2. El análisis filogenético confirma la presencia de tres especies del género *Hoplias* en el Ecuador: *Hoplias microlepis*, que se distribuye exclusivamente a lo largo de la costa, desde Esmeraldas hasta la provincia de El Oro; *Hoplias malabaricus*, que se esparce en el Oriente del país y una tercera especie aun no identificada en la cuenca Santiago-Cayapas al norte del Ecuador (provincia de Esmeraldas) que es similar morfológicamente a *H. malabaricus* del Oriente pero difiere

genéticamente de ambas especies registradas en la Costa y el Oriente.

3. La línea de divergencia de las dos especies de *Hoplias* en la costa potencialmente se manifiesta entre los ríos Esmeraldas y Santiago-Cayapas y no entre los ríos Guayas y Esmeraldas.
4. Se recomienda ampliar los estudios de *Hoplias* en la provincia de Esmeraldas para confirmar donde está la separación entre las dos especies de la costa y como son las poblaciones del río Esmeraldas a través de toda la cuenca respecto a las poblaciones de Guayas y Santiago-Cayapas.
5. Las poblaciones de *Hoplias microlepis* que habitan en los ríos tienden a presentar alta diversidad genética, debido a que se da la mayor cantidad de flujo genético entre peces en diferentes ramas o tributarios de los ríos. Por el contrario las poblaciones que se encuentran aisladas en las represas, suelen presentar una reducida diversidad genética.
6. El uso de más de un marcador molecular mitocondrial (ATPasa y CR), permite tener una mejor apreciación de los posibles procesos

evolutivos en la especie, a diferentes escalas espaciales y temporales. Sin embargo, se sugiere hacer comparaciones con marcadores moleculares de origen nuclear, para enriquecer los resultados obtenidos.

7. Existen pocos estudios de diversidad a nivel molecular en el Ecuador y este estudio presenta información que puede ser usada como base en investigaciones relacionadas a la estructura poblacional de otras especies en la Costa y para esfuerzos futuros para conservar la riqueza biológica y genética del país.

GLOSARIO

Alelo: Cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Alloenzimas: son formas alternativas de una enzima, codificadas por diferentes alelos de un mismo locus genético.

Aminoácido: Es una molécula orgánica con un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ($-COOH$)

ARN mensajero: Es el ácido ribonucleico que contiene la información genética procedente del ADN del núcleo celular a un ribosoma en el citoplasma y actúa como plantilla o patrón para la síntesis de proteínas.

Bioprospección: Es el estudio de la naturaleza dedicado al hallazgo de organismos y sustancias con posibles usos para beneficio del ser humano que pueden tener un valor comercial significativo en sectores como el industrial, alimentario, cosmético y farmacéutico, entre otros.

Cariotipo: Es el patrón cromosómico de una especie expresado a través de un código, que describe las características de sus cromosomas.

Clado: Cada una de las ramas del árbol filogenético propuesto para agrupar a los seres vivos.

Contig: Mapa cromosómico que muestra la ubicación de aquellas regiones del cromosoma donde se sobrelapan segmentos contiguos de DNA (clonados).

Cromosoma: Cada una de las estructuras altamente organizadas formadas por ADN y proteínas que contiene parte de la información genética de un individuo.

Depresión endogámica: Es la pérdida de adaptación, producida por la pérdida de variación genética debido a la homocigosidad, que impide la supervivencia de la especie.

Deriva genética: Es una fuerza evolutiva que actúa junto con la selección natural cambiando las frecuencias alélicas de las especies en el tiempo.

Diversidad interespecífica: Es la variedad que existe entre miembros de especies diferentes

Diversidad intraespecífica: Es la variedad que existe entre miembros de una misma especie.

Ecología: La ciencia que estudia las interrelaciones de los diferentes seres vivos entre sí y con su entorno.

Ecología evolutiva: Estudia la evolución en poblaciones de organismos actuales.

Ecosistema: Es un sistema natural que está formado por un conjunto de organismos vivos (biocenosis) y el medio físico donde se relacionan (biotopo).

Electroforesis: Es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico.

Enzima: Molécula de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas.

Filogenia: Es la historia del desarrollo evolutivo de un grupo de organismos.

Flujo genético: También conocido como migración es la transferencia de alelos de genes de una población a otra.

Frecuencia: Es una magnitud que mide el número de repeticiones por unidad de tiempo de cualquier fenómeno o suceso periódico.

Gen: Unidad de información dentro del genoma que contiene todos los elementos necesarios para su expresión de manera regulada.

Grupo externo: Grupo o ejemplo diferente de las especies estudiadas para determinar diferencias.

Haplotipo: Es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos.

Linajes genéticos: Un linaje es la línea de ascendencia o descendencia a nivel genético

Loci: El plural de locus.

Locus: Es una posición fija en un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador (marcador genético).

Matrilineal: Sistema de linaje en el que la adscripción del individuo se realiza por vía materna.

Migración: Es el desplazamiento de la población (humana o animal) que se produce desde un lugar de origen a otro destino.

Mioceno: Una división de la escala temporal geológica, es la cuarta época geológica de la era Cenozoica y la primera época del periodo Neógeno.

Oligoceno: una división de la escala temporal geológica, es la tercera época del Período Paleógeno en la Era Cenozoica.

Diploide: Son las células que tienen un número doble de cromosomas (a diferencia de los gametos), es decir, poseen dos series de cromosomas.

Polimorfismo: Son los múltiples alelos de un gen entre una población, normalmente expresados como diferentes fenotipos

Proteínas: Son moléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos.

Región hipervariante: Es una ubicación dentro del ADN nuclear o de ADN mitocondrial en el que pares de bases de nucleótidos repetidos varían mucho. Los cambios o que se repiten en la región hipervariable son altamente polimórficos.

Región repetitiva: *Sitios de inestabilidad genómica y se caracterizan por experimentar cambios reversibles en la longitud de la secuencia repetida.*

Ribonucleótido: es un nucleótido formado por la unión de una purina o una pirimidina y una molécula de ribosa.

Ribosomas: son complejos macromoleculares de proteínas y ácido ribonucleico (ARN) que se encuentran en el citoplasma, en las mitocondrias, en el retículo endoplasmático y en los cloroplastos. Son un complejo molecular encargado de sintetizar proteínas a partir de la información genética que les llega del ADN.

Varianza: es una medida de dispersión definida como la esperanza del cuadrado de la desviación de dicha variable respecto a su media.

ANEXOS

A. Anexo: Figura y tabla informativa

Tabla XVII Tabla informativa de las especies muestreadas.

Código	ATP asa	Región de Control	Localidad	Area	Fecha de muestreo	Método de extracción
Vi1	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi2	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi3	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi4	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi5	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi6	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi7	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi8	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi9	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi10	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi11	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
Vi12	ATP	CR	Abras de Mantequilla	Río Guayas	Aug/19/12	Qiagen
SL28 6	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
SL28 7	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
SL28 8	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
SL28 9	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
SL29 0	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
SL29	ATP	CR	Santa Lucia	Río	Sep/11/12	Qiagen

1				Guayas		
SL29 2	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
SL29 3	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
SL29 4	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
SL29 5	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
SL29 6	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
SL29 7	ATP	CR	Santa Lucia	Río Guayas	Sep/11/12	Qiagen
Pu3 88	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
Pu3 89	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
Pu3 90	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
Pu3 91	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
Pu3 92	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
Pu3 93	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
Pu3 94	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
Pu3 95	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
Pu3 96	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
Pu3 97	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
Pu3 98	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/23/12	Qiagen
Pu3 99	ATP	CR	Puyo	Puyo	Sep/25/12	Qiagen
BV1 78	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
BV1 79	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
BV1 80	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
BV1	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen

81						
BV1 82	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
BV1 83	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
BV1 84	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
BV1 85	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
BV1 86	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
BV1 87	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
BV1 88	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
BV1 89	ATP	CR	Buena Vista	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
Sg24 3	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg24 4	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg24 5	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg24 6	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg24 7	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg24 8	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg24 9	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg25 0	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg25 1	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg25 2	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg25 3	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Sg25 4	ATP	CR	La Segua	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
SA3 80	ATP	CR	San Agustin	Esmeraldas	Sep/19/12	Qiagen
SA3	ATP	CR	San Agustin	Esmeralda	Sep/19/12	Qiagen

81				s		
SA3 82	ATP	CR	San Agustin	Esmeraldas	Sep/19/12	Qiagen
SA3 83	ATP	CR	San Agustin	Esmeraldas	Sep/19/12	Qiagen
SA3 84	ATP	CR	San Agustin	Esmeraldas	Sep/19/12	Qiagen
SA3 85	ATP	CR	San Agustin	Esmeraldas	Sep/19/12	Qiagen
Vc38 6	ATP	CR	Viche	Esmeraldas	Sep/20/12	Qiagen
Vc38 7	ATP	CR	Viche	Esmeraldas	Sep/20/12	Qiagen
Es27 5	ATP	CR	La Esperanza	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Es27 6	ATP	CR	La Esperanza	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Es27 7	ATP	CR	La Esperanza	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Es27 8	ATP	CR	La Esperanza	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Ch7 96	ATP	CR	Represa Chongon	Río Guayas	Dec/13/12	Qiagen
Ch7 97	ATP	CR	Represa Chongon	Río Guayas	Dec/13/12	Qiagen
Ch7 98	ATP	CR	Represa Chongon	Río Guayas	Dec/13/12	Qiagen
Ch7 99	ATP	CR	Represa Chongon	Río Guayas	Dec/13/12	Qiagen
Ch8 00	ATP	CR	Represa Chongon	Río Guayas	Dec/13/12	Qiagen
Ch8 01	ATP	CR	Represa Chongon	Río Guayas	Dec/13/12	Qiagen
Ch8 02	ATP	CR	Represa Chongon	Río Guayas	Dec/13/12	Qiagen
Ch8 03	ATP	CR	Represa Chongon	Río Guayas	Dec/13/12	Qiagen
Sa81 1	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Sa81 2	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Sa81 3	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Sa81	ATP	CR	Samborondon	Río	Nov/30/12	Qiagen

4				Guayas		
Sa81 5	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Sa81 6	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Sa81 7	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Sa81 8	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Sa81 9	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Sa82 0	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Sa82 1	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Sa82 2	ATP	CR	Samborondon	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 21	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 22	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 23	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 24	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 25	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 26	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 27	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 28	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 29	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 30	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 31	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
BH5 32	ATP	CR	Babahoyo	Río Guayas	Nov/30/12	Qiagen
Ta17 0	ATP	CR	Represa Tahuin	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
Ta17	ATP	CR	Represa	El Oro	Sep/6/12	Qiagen

1			Tahuin			
Ta17 2	ATP	CR	Represa Tahuin	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
Ta17 3	ATP	CR	Represa Tahuin	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
Ta17 4	ATP	CR	Represa Tahuin	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
Ta17 5	ATP	CR	Represa Tahuin	El Oro	Sep/6/12	Qiagen
Ta17 6	ATP	CR	Represa Tahuin	El Oro	Dec/9/12	Qiagen
Ta17 7	ATP	CR	Represa Tahuin	El Oro	Dec/9/12	Qiagen
Ba3 70	ATP	CR	Balzar	Daule (Guayas)	Sep/11/12	Qiagen
Ba3 71	ATP	CR	Balzar	Daule (Guayas)	Sep/11/12	Qiagen
Ba3 72	ATP	CR	Balzar	Daule (Guayas)	Sep/11/12	Qiagen
Ba3 73	ATP	CR	Balzar	Daule (Guayas)	Sep/11/12	Qiagen
Ba3 74	ATP	CR	Balzar	Daule (Guayas)	Sep/11/12	Qiagen
Ba3 75	ATP	CR	Balzar	Daule (Guayas)	Sep/11/12	Qiagen
Ba3 76	ATP	CR	Balzar	Daule (Guayas)	Sep/11/12	Qiagen
Ba3 77	ATP	CR	Balzar	Daule (Guayas)	Sep/11/12	Qiagen
Es27 9	ATP	CR	La Esperanza	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Es28 0	ATP	CR	La Esperanza	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Es28 1	ATP	CR	La Esperanza	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
Es28 2	ATP	CR	La Esperanza	Manabi	Sep/13/12	Qiagen
DP8 01	ATP	CR	Represa Daule Peripa	Daule (Guayas)	Sep/13/12	Qiagen
DP8 02	ATP	CR	Represa Daule Peripa	Daule (Guayas)	Sep/13/12	Qiagen
DP8 03	ATP	CR	Represa Daule Peripa	Daule (Guayas)	Sep/13/12	Qiagen
DP8	ATP	CR	Represa Daule	Daule	Sep/13/12	Qiagen

04			Peripa	(Guayas)		
DP8 05	ATP	CR	Represa Daule Peripa	Daule (Guayas)	Sep/13/12	Qiagen
DP8 06	ATP	CR	Represa Daule Peripa	Daule (Guayas)	Sep/13/12	Qiagen
DP8 07	ATP	CR	Represa Daule Peripa	Daule (Guayas)	Sep/13/12	Qiagen
DP8 08	ATP	CR	Represa Daule Peripa	Daule (Guayas)	Sep/13/12	Qiagen

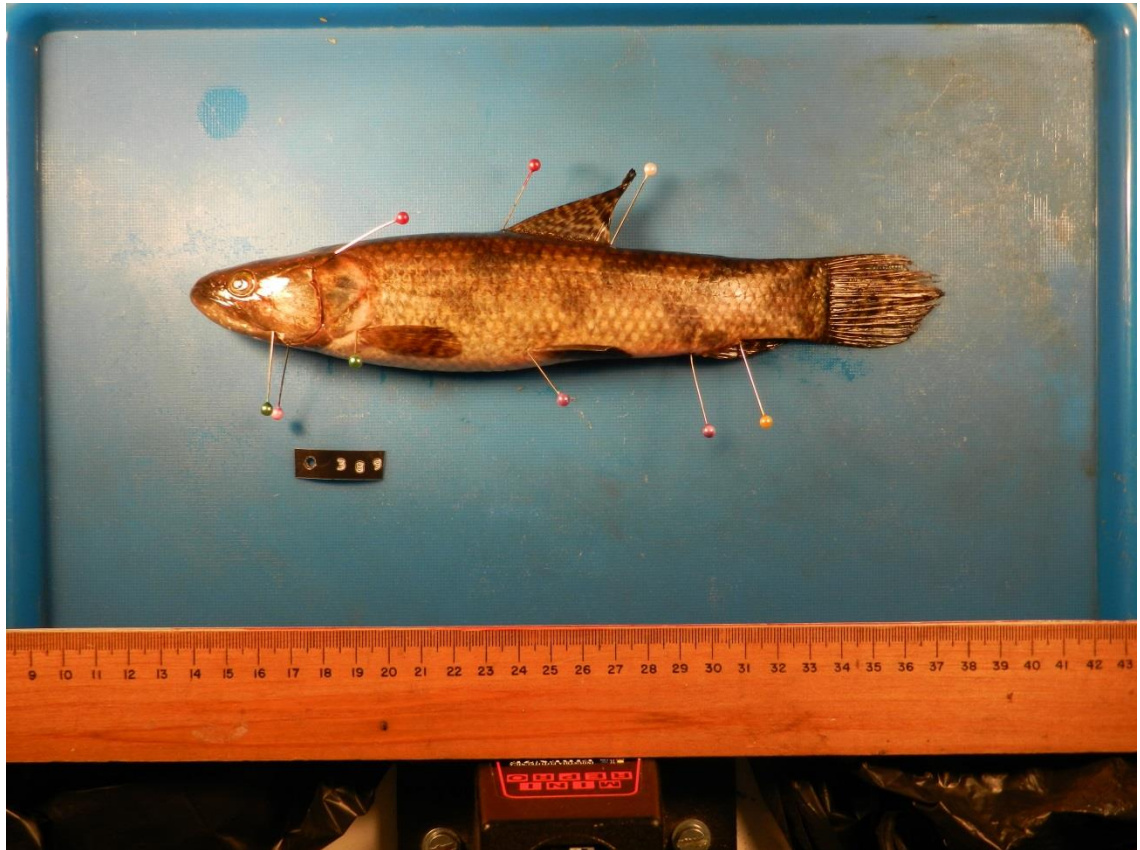
Fuente: Autores

Figura 9.- *Hoplias microlepis* de la localidad Daule Peripa.



Fuente: Fotos tomadas de Granda y Montero 2015

Figura 10.- *Hoplias malabaricus* perteneciente al Oriente Ecuatoriano (Puyo).



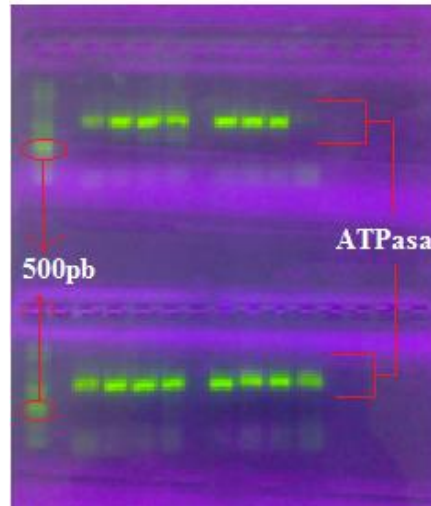
Fuente: Fotos tomadas de Granda y Montero 2015

Figura 11.- *Hoplias ps.* Muestra de San Agustín.



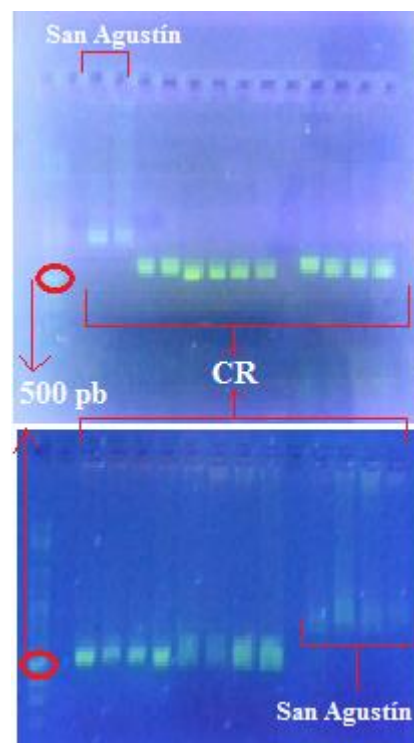
Fuente: Fotos tomadas de Granda y Montero 2015

Figura 12.- Electroforesis del gen ATPasa del ADNmt.



Fuente: Autores.

Figura 13.- Electroforesis de la región control del ADNmt.



Fuente: Autores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Claude A. Villee et al. Biología. 2nd ed. Mexico: InterAmericana-Mc Graw-Hill; 1992.
2. Izco J. Biodiversidad y conservación. In Izco J. Botánica. ESPAÑA: S.A. MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA; 2004. p. 920.
3. Scott Freeman , Jon C. Herron. Análisis evolutivo Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, S.A; 2002.
4. Tirira DG. Mamíferos endémicos del Ecuador. [Online].; 2011 [cited 2015 Febrero 21. Available from: www.mamiferosdeecuador.com.
5. Susana León-Yáñez RVHNNPLECUU. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. In Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Quito: Publicaciones del Herbario QCA; 2011. p. 344-359.
6. Todos los miembros del programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Municipalidad de Loja y Naturaleza y Cultura Internacional. Perspectivas del Medio Ambiente Urbano. Geo Loja. [Online].; 2007 [cited 2015 Febrero 21. Available from: <http://www.naturalezaycultura.org/docs/Geo%20Loja.pdf>.
7. Flor de María Valverde JJP. La biodiversidad vegetal como capital natural de la sostenibilidad en la costa Ecuatoriana. 1st ed. Guayaquil: Programa editorial de la M.I. Municipalidad de Santiago de Guayaquil; 2012.
8. INOCAR. Derrotero de las costas ecuatorianas. Guayaquil: INOCAR, INOCAR; 2012.
9. Instituto Geográfico Militar. Mapas y planos de ciudades. [Online]. Quito: Instituto Geográfico Militar; 2012 [cited 2014 noviembre 4. Available from: <http://www.geoportaligm.gob.ec/portal/index.php/descargas/geoinformacion/mapas-oficiales/>.
10. Consejo Nacional de Recursos Hídricos (CNRH). Division Hidrográfica del Ecuador. Memoria Tècnica. ; 2002.
11. Pesantes Vigano F. Algunas características geográficas y oceanográficas del estuario interior del golfo de Guayaquil y sus afluentes Daule y Babahoyo. Instituto Nacional de Pesca. 1998;; p. 5-13.
12. Pino EA. Encoclopedia del Ecuador. [Online].; 2014 [cited 2014 Octubre 18. Available

from: [http://www.encyclopediadelecuador.com/temasOpt.php?Ind=820&Let=.](http://www.encyclopediadelecuador.com/temasOpt.php?Ind=820&Let=)

13. Ayala L,AA,&MA. Caracterización y Propuesta Técnica de la Acuicultura en el Sector de Rio Verde, Provincia de Esmeraldas. 2007. Tesis de Grado Escuela Superior Politecnica del Litoral.
14. Vasquez N, Gil V, Varela C, Mardones G. Gestion integral del riesgo por inundaciones: Caso de estudio ciudad de Chone. Caso de estudio. ; 2005.
15. Rocha A. Proyecto de factibilidad de la creación de cabañas en la isla Jambelí. Universidad Tecnológica Equinoccial. 2006 Junio; Tesis.
16. Valarezo A. Corporación de Desarrollo de El Oro. [Online].; 2006 [cited 2014 Octubre. Available from: <http://corpeloro.blogspot.com/2006/01/cuenca-hidrogrfica-rio-arenillas.html>.
17. Hoorn C, Wesseling P, Ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, et al. Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. Science. 2010 Noviembre; 330.
18. Guerrero J, Hoorn C, Sarmiento GA, Lorente MA. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. Geology. 1995; 23(3): p. 237 - 240.
19. Lynch JD, Duellman WE. Frogs of the Genus Eleutherodactylus (Leptodactylidae) in western Ecuador: Systematic, Ecology and Biogeography Trueb L, editor.: Natural History Museum; 1997.
20. Barriga R. Lista de peces de agua dulce e intermareales del Ecuador. Revista Politécnica. 2012; 30(3): p. 83-119.
21. Laaz Moncayo E, Torres Noboa A. Lista de peces continentales de la Cuenca del Río Guayas. Estudio sobre listado de peces en la cuenca del río Guayas. ; 2014.
22. MAGAP. ASPECTOS PESQUERO DE LAS PRINCIPALES ESPECIES CAPTURADAS EN EL EMBALSE PARQUE LAGO CHONGÓN EN 2008. Instituto Nacional de Pesca; 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013.
23. Mattox, Osvaldo T. Oyakawa and George M. T. Revision of the Neotropical trahiras of the Hoplias lacerdae species-group. Sociedade Brasileira de Ictiologia. 2006.

24. Rivadeneira J.F. EAYSD. Peces de la cuenca del río Pastaza, Ecuador. Publicación. Quito-Ecuador: Fundación Natura; 2010.
25. Roberto E RSOKCJFJ. Check list of the freshwater fishes of south and central America. Edipucrs. 2003.
26. George M. T. Mattox, Alessandro G. Bifi and Osvaldo T. Oyakawa. Taxonomic study of *Hoplias microlepis* (Günther, 1864), a trans-Andean species of trahiras (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae). Sociedade Brasileira de Ictiologia. 2014.
27. Willian Revelo y Enrique Laaz. catalogo peces de aguas continentales provincia de los rios ECUADOR Guayaquil: Instituto Nacional de Pesca; 2012.
28. Froese R. Fish Base. [Online].; 200 [cited 2014 noviembre 10. Available from: http://www.fishbase.org/manual/English/FishBaseThe_Species_Table.htm.
29. Espinach A., Gill Morlis W, Liotta ea. Uso sostenible de peces en la Cuenca del Plata. Evaluación: Información aplicada a la mejora de los medios de vida de las poblaciones locales. Paraguay: Fundación Proteger; 2008.
30. Aguirre W. The Freshwater Fishes of Ecuador. [Online].; 2011 [cited 2014 Diciembre 11. Available from: http://condor.depaul.edu/waguirre/fishwestec/hoplias_malabaricus.html.
31. José Luque Cabrera, Ángel Herráez Sánchez. Biología Molecular e Ingeniería Genética Madrid: MMI Elsevier España, S.A.; 2002.
32. Gilbert S. Biología del desarrollo. 7th ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2005.
33. Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology. Elsevier Science. 2000; II.
34. Manuel J. López Pérez y Julio Montoya. Sistema genético mitocondrial humano. In. España: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177. 50013 p. 40-41.
35. Brown WM, et al. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76. 1979.
36. Domínguez EF. Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea Ph.D. Thesis. University of Barcelona. 2005.

37. Domínguez E. Cib.uaem.mx. [Online].; 1987 [cited 2014 enero. Available from: http://www.cib.uaem.mx/biogeografia/lecturas/Filogeografia_gaby.pdf.
38. Ella OD&. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*. 2009;(32.1: 59–70.).
39. Aguirre W, Shervette VR, Navarrete R, Calle P, Agorastos S. Morphological and Genetic Divergence of *Hoplias microlepis* (Characiformes: Erythrinidae) in Rivers and Artificial Impoundments of Western Ecuador. 2013;(2).
40. Chromas Lite Version 2.1. Technelysium Pty Ltd. 2012. Australia.
41. Hall TA. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 1999. *Nucleic Acids Symposium Series*.
42. Geneious Version 5.6.7. Created by Biomatters. [Online]. Available from: www.geneious.com.
43. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Geneteics Analysis Version 6.0. 2013. *Molecular Biology and Evolution*.
44. Nakatani M, Miya M, Mabuchi K, Saitoh K, Nishida M. Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeen origin and Mesozoic radiation. 2011; 11(177).
45. Reeves G, Bermingham E. Colonization, population expansion, and lineage turnover: phylogeography of Mesoamerican characiform fish. *Biological Journal of the Linnean Sociecity*. 2006; 88: p. 235-255.
46. Borden WC, Li C, Farias IP, Orti G. *Prochilodus magdalenae* isolate ATPase8 (ATPase8) gene, complete cds; and ATPase6 (ATPase6) gene, partial cds; mitochondrial. 2010 Agosto 13..
47. Polzin T, Vahdati Daneshman S. NETWORK 4.6.1.3. Copyright 2004-2015 Fluxus Technology Ltda. All rights reserved.
48. Librado P, Rozas J. DnaSP V5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. 2009..
49. Holsinger KE, Weir BS. Genetics in geographically structured populations: defining,

- estimating and interpreting FST. *Nature*. 2009 September; 10.
50. Shane's. Simple Guide to F-statistics. In.
 51. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics Society of America*. 1992 June; 131: p. 479-491.
 52. Excoffier , Laval LG, Schneider S. Arlequin Ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. 2005. *Evolutionary Bioinformatics Online*.
 53. Martinazzo Giménez LB. Sistemática, Filogenia y Filogeografía de las Ranas Patagónicas *Atelognathus paagonicus* y *Atelognathus praebasalticus*. Universidad Nacional de la Plata (UNLP). 2011.
 54. Saunders MA, Edwards SV. Dynamics and Phylogenetic Implications of MtDNA Control Region Sequences in New World Jays (Aves: Corvidae). *Molecular Evolution*. 2000; 51: p. 97-109.
 55. Troya Rodríguez DC. Filogeografía comparada de dos especies simpátricas de *Anolis* (Squamata: Iguanidae) y evaluación del impacto del calentamiento global sobre su distribución. 2013. Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas.
 56. Chaves JA, Smith TB. Evolutionary patterns of diversification in the Andean hummingbird genus *Adelomyia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2011; 60: p. 207-218.
 57. Jiménez PJ, Alava JJ. Infección por *Gnathostoma* (Spirurida: Gnathostomatidae) en *Hoplias microlepis*: prevalencia, correlación con la talla del pez, huéspedes e implicaciones para salud pública en Ecuador. *Biomédica*. 2009; 29: p. 591-603.
 58. Barnhill B, Lopez E, Les AJ. Estudio sobre la biología de los peces del rion Vices. 1974 Enero. *Boletín Científico y Técnico*.
 59. Bertollo L, Born G, Dergam J, Fenocchio A, Moreira-Filho O. A biodiversity approach in the neotropical erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Res*. 2000; 8(7).
 60. Vu V, Christman J, Calle P, Aguirre WE. Isolation of microsatellite loci for the predatory fish *Hoplias microlepis* (Characiformes: Erythrinidae) from a highly impacted river

system in western Ecuador. *Conservation Genet Resour.* 2013; 5: p. 437-439.