



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA RAYA DE AGUA DULCE
***Potamotrygon magdalenae* (ELASMOBRANCHII:**
POTAMOTRYGONIDAE) EN EL RÍO MAGDALENA, COLOMBIA

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:
ANDREA MARCELA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

TUTOR:
Dr. PINDARO DÍAZ JAIMES
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dr. MANUEL GALLARDO CABELLO
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA, UNAM
Dr. JUAN NÚÑEZ FARFAN
INSTITUTO DE ECOLOGIA, UNAM
Dr. JUAN CARLOS PÉREZ JIMÉNEZ
COLEGIO DE LA FRONTERA SUR, ECOSUR
Dr. JAVIER TOVAR ÁVILA
INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUACULTURA

ASESORA EXTERNA:
Dra. PAOLA ANDREA MEJÍA FALLA
DIRECTORA CIENTÍFICA, FUNDACIÓN SQUALUS

. CD. MX., FEBRERO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA RAYA DE AGUA DULCE
Potamotrygon magdalenae (ELASMOBRANCHII:
POTAMOTRYGONIDAE) EN EL RÍO MAGDALENA, COLOMBIA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:
ANDREA MARCELA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

TUTOR:
Dr. PINDARO DIAZ JAIMES
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dr. MANUEL GALLARDO CABELLO
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA, UNAM
Dr. JUAN NÚÑEZ FARFAN
INSTITUTO DE ECOLOGIA, UNAM
Dr. JUAN CARLOS PÉREZ JIMÉNEZ
COLEGIO DE LA FRONTERA SUR, ECOSUR
Dr. JAVIER TOVAR ÁVILA
INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUACULTURA

ASESORA EXTERNA:
Dra. PAOLA ANDREA MEJÍA FALLA
DIRECTORA CIENTÍFICA, FUNDACIÓN SQUALUS

MÉXICO, CD. MX., FEBRERO, 2018



A mis padres y hermano

Stella Hernández, Alberto Ramírez y Edgar Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la dirección General de Posgrado, por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría.

A mi tutor Dr. Píndaro Díaz Jaimes por su respaldo, confianza al aceptarme para trabajar en su laboratorio. A mi comité tutorial: Dr. Manuel Gallardo Cabello, Dr. Juan Núñez Farfan, Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez, Dr. Javier Tovar Ávila y la Dra. Paola Andrea Mejía Falla, por su apoyo académico, asesorías, observaciones y comentarios durante la realización de mi tesis de grado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por haberme permitido vivir tantas experiencias nuevas, en especial a los miembros de la dirección y coordinación del Posgrado, por su amable atención y la ayuda brindada durante mi estancia en esta institución.

Gracias a la Fundación SQUALUS, mi familia cartilaginosa que siempre me brindó apoyo con el muestreo. A todas las personas que colaboraron con muestras de tejidos, a los pescadores de las zonas de muestreo que colaboraron y brindaron información valiosa.

Mi eterno agradecimiento a mi amada familia La Prima y Pao, son mi hogar, hemos reído y llorado y siempre hacen que todo valga la pena. A mis padres que con la distancia hace que nos amemos cada día más, no me alcanzan las palabras ni la vida para explicar y agradecer por el amor de mi familia.

A mis amigos, que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos. Qué bueno es tener amigos como ustedes que me han ayudado a salir de los momentos difíciles que he pasado en esta vida. Nunca voy a cansarme de agradecerles por esta amistad incondicional.



Resumen

La diversidad genética de las especies representa la base que asegura su capacidad reproductiva, resistencia a enfermedades y a cambios ambientales. En peces de agua dulce una parte importante de la diversidad es el reflejo de la diferenciación poblacional. El presente estudio está orientado a definir la diversidad genética de *Potamotrygon magdalenae*, para determinar si ésta consiste de una población panmíctica distribuida a lo largo de la cuenca del río Magdalena o si se encuentra estructurada como varias poblaciones genéticamente discretas en diferentes regiones geográficas. Se recolectaron muestras de tejido muscular de 120 individuos de cinco localidades, dos localidades del Bajo Magdalena y tres localidades del Medio Magdalena. El ADNmt fue amplificado usando cebador universal para el gen citocromo oxidasa I (COI) para su posterior secuenciación y análisis. se estimó la estructura poblacional y se elaboró una red de haplotipos; así mismo, se realizaron los estadísticos de las pruebas de neutralidad, un análisis Bayesian Skyline Plot o Perfil Demográfico Bayesiano y también se realizó un gráfico circular de flujo de migración en R con los datos de MIGRATE, con el fin de visualizar migración entre localidades. Se obtuvo un total de 112 secuencias (549 pb) del gen COI del ADNmt, encontrando 22 sitios polimórficos (S), los cuales representaron 20 haplotipos (h). Los valores promedio de diversidad genética estimados para todas las muestras fue moderado en el caso de la diversidad haplotípica ($H_d = 0.47$) y notablemente bajo en el caso de la diversidad nucleotídica ($\pi = 0.0001$). Las estimaciones de diferenciación genética pareadas Φ_{ST} con el marcador COI entre las zonas de muestreo permitió determinar diferencias entre localidades, esto probablemente puede estar influenciado por barreras físico-hidrográficas, marcadas con el régimen hidrológico y orográfico de la cuenca del río Magdalena. La población más divergente fue Guarinocito, la cual se aísla de las otras localidades, porque ésta localidad se originó por un cauce del río Magdalena abandonado donde solo hay flujo en época de lluvia y es una laguna semi-cerrada. La red de haplotipos muestra que 78 de las secuencias tienen un haplotipo dominante (*Pm-1*) presente en todas las localidades, seguido del *Pm-2* que lo comparten siete secuencias; así mismo, en las 112 secuencias usadas hay 17 haplotipos únicos, de los cuales seis pertenecen a individuos de la localidad de Ayapel. Los análisis de demografía histórica indican una tendencia hacia la expansión espacial y demográfica. Los valores de flujo genético y tamaño efectivo poblacional fueron altos en la localidad de Ayapel y muy bajos en Guarinocito, concordando con los resultados obtenidos de estructura poblacional. Esta evaluación genética inicial con las secuencias de ADNmt del gen COI sugiere una separación entre las localidades estudiadas a lo largo del río Magdalena, lo cual puede tener implicaciones relevantes en la conservación de la variabilidad genética de las poblaciones naturales de la raya de agua dulce endémica para Colombia *P. magdalenae*.

Contenido

I.	INTRODUCCIÓN	9
II.	MARCO TEÓRICO	12
2.1.	Origen evolutivo de las rayas de agua dulce de Sur América	12
2.2.	Origen geológico de la cuenca del río Magdalena.....	13
2.2.1.	Variables ambientales de la cuenca del río Magdalena.....	15
2.2.2.	Alto Magdalena	16
2.2.3.	Medio Magdalena	16
2.2.4.	Bajo Magdalena.....	17
2.3.	Biología de las rayas de la familia Potamotrigonidae	19
2.3.1.	Posición y clasificación taxonómica.....	19
2.3.2.	Distribución y hábitats	20
2.3.3.	Comportamiento y migración	21
2.3.4.	Características reproductivas.....	22
2.3.5.	Aspectos pesqueros y de comercialización	23
2.4.	Uso de secuencias génicas de ADN mitocondrial en el estudio de la variación genética 25	
III.	ANTECEDENTES.....	27
3.1.	Estudios de genética en rayas de la familia Potamotrigonidae	27
IV.	JUSTIFICACIÓN	29
V.	HIPÓTESIS.....	30
VI.	OBJETIVOS.....	31
6.1	. Objetivo general	31
6.2	. Objetivos específicos.....	31
VII.	METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	32
7.1	. Área de estudio y recolecta de muestras	32
7.2	.Recolecta de muestras	32
	Ciénaga de Mesolandia:	34
	Chimichagua – complejo cenagoso de Zapatosa:.....	34
	Ayapel:.....	34
	Ciénaga de Paredes:	35
	Charca de Guarinocito:.....	35

7.2. Trabajo de laboratorio	35
Extracción de ADN	35
Amplificación de la región mitocondrial Citocromo oxidasa subunidad I (COI).....	36
7.3 . Análisis de datos.....	37
7.3.1 Análisis de secuencias e índices de diversidad del gen citocromo oxidasa I (COI).	37
7.3.2 Estructura poblacional.....	37
7.3.3 Red de haplotipos.....	38
7.3.4 Análisis de aislamiento por distancia.....	38
7.3.5 Demografía Histórica	39
VIII. RESULTADOS	40
8.1. Análisis de secuencias e índices de diversidad del gen citocromo oxidasa I (COI).....	40
8.2. Estructura poblacional	41
8.4. Red de haplotipos.....	45
8.3. Análisis de aislamiento por distancia	47
IX. DISCUSIÓN	52
9.1. Análisis Genético	52
9.2. Estructura poblacional	55
9.3. Demografía Histórica.....	59
9.4 Implicaciones para la conservación de <i>Potamotrygon magdalenae</i>	62
X. CONCLUSIONES.....	65
XII. BIBLIOGRAFIA.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de la cuenca del río Magdalena detallando las zonas alta, media y baja; ríos tributarios y la cuenca del río Cauca (Tomado de Restrepo A. 2015) _____ **18**
- Figura 2.** Fotografía de un individuo de la especie *Potamotrygon magdalenae*. (Foto tomada por Viviana Márquez) _____ **20**
- Figura 3.** Registros de *Potamotrygon magdalenae* en la cuenca del Magdalena (Imagen tomada de Lasso *et al.*; 2013). _____ **21**
- Figura 4.** Localización geográfica de las áreas de muestreo sobre el río Magdalena, Ciénaga de Mesolandia (Atlántico), Ciénaga de Paredes (Santander), Ayapel (Córdoba), Chimichagua (Cesar) y Charca de Guarinocito (Caldas). _____ **33**
- Figura 5.** Barreras geográficas detectadas entre las localidades de estudio del río Magdalena: Mesolandia, Chimichagua, Ayapel, Paredes y Guarinocito. Las líneas en rojo muestran las barreras geográficas, ordenadas alfabéticamente respecto a su importancia. _____ **45**
- Figura 6a.** Red de haplotipos del gen COI para *P. magdalenae*, por localidades de muestro: Mesolandia (azul), Ayapel (verde), Ciénaga Paredes (amarillo) y Guarinocito (lila). _____ **46**
- Figura 6b.** Red de haplotipos del gen COI para *P. magdalenae*, para las localidades de acuerdo a su ubicación a lo largo de la cuenca: Bajo Magdalena (verde claro) y Medio Magdalena (verde oscuro). _____ **46**
- Figura 7.** Distribución del número de diferencias pareadas (Mismatches) para *Potamotrygon magdalenae*. Las comparaciones se realizaron para todas las muestras y para cada una de las localidades. Las barras azules son los valores observados y la línea naranja los valores esperados bajo el modelo de expansión. _____ **48**
- Figura 8.** Perfil demográfico bayesiano del tamaño efectivo poblacional. La línea negra es la estimación promedio, las líneas azules muestran los intervalos de confianza al 95 %. _____ **49**
- Figura 9.** Gráfico circular del flujo de migrantes entre las localidades, a partir de m calculados con el software MIGRATE, el ancho de las curvas de migración indica la cantidad de migración ____ **51**
- Figura 10.** Planicies inundables de la cuenca del Magdalena. (Tomado y modificado de IDEAM, 2010). _____ **57**
- Figura 11.** Hipótesis filogenética para las rayas de agua dulce con su pariente marino más cercano, y calendario de los eventos paleogeológicos en Sur América. (Tomado y modificado de Lovejoy *et al.*, 1998). _____ **61**

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Parámetros reproductivos reportados para las hembras de *Potamotrygon magdalenae* en vida silvestre (tres cuencas del Magdalena y río Atrato) y en cautiverio. * Intervalo de tallas de las hembras gestantes (Tomado de Mejía-Falla *et al.*, 2016) _____ 23

Tabla 2. Estimadores de diversidad genética por localidad, cuenca y total para COI-ADNmt. S: es número de sitios polimórficos, h: número de haplotipos, Hd: la diversidad haplotípica y π : diversidad nucleotídica. _____ 40

Tabla 3. Comparaciones de diferenciación genética entre pares de muestras de *P. magdalenae*. Valores debajo de la diagonal: el valor de Φ_{ST} obtenido de las secuencias de ADNmt; valores encima de la diagonal: el valor de significancia estadística (P); en rojo: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$). _____ 42

Tabla 4. Resultados de la AMOVA (SS: suma de los cuadrados, %V: porcentaje de Varianza e Índices de fijación (Fct, Fsc, Fst) y su grado de significancia. _____ 42

Tabla 5. Análisis espacial de la varianza molecular entre dos grupos inferidos por SAMOVA 1.0, según las varianzas y las coordenadas geográficas dentro de la cuenca del río Magdalena. %V= porcentaje de Varianza. _____ 43

Tabla 6. Pruebas de neutralidad Tajima's, Fu's y SSD, para las localidades de muestreo de *P. magdalenae*. ($p = 0.005$) _____ 49

Tabla 7. Valores de tamaño efectivo poblacional (N_e) y migrantes efectivos por punto de muestreo (N_m) a partir de estimadores Θ y M calculados en Migrate, asumiendo una tasa de mutación de $\mu = 1 \times 10^{-8}$. En la diagonal superior se encuentran las localidades emisoras de migrantes y en la inferior las localidades receptoras de migrantes de *P. magdalenae*. _____ 50

Tabla 8. Estimadores de diversidad genética en diferentes especies, donde: Hd: la diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica, N: número de secuencias, h: número de haplotipos. ____ 54

I. INTRODUCCIÓN

La genética de poblaciones es una disciplina que ofrece una base teórica, para entender los procesos adaptativos y de evolución de las especies y para hacer predicciones sobre su estatus en el futuro (Eguiarte *et al.*, 1990), al examinar la variación genética en las poblaciones, en un contexto biogeográfico puede dar indicios de asociaciones históricas y los procesos que han derivado en la divergencia genética, que en su momento, pueden conducir a la especiación. Dicha información brinda una importante base para la definición de estrategias de manejo y conservación. El primer paso para inferir los procesos evolutivos en las poblaciones, es entender cómo han sido derivados los patrones de variación genética en un contexto geográfico (Eguiarte *et al.*, 2007).

La diversidad genética de las especies es crucial para mantener sus expectativas evolutivas y representa la base que asegura la capacidad reproductiva, la resistencia a enfermedades y la capacidad de respuesta a los cambios ambientales (Frankham, 1995; Hedrick, 2001; Wang *et al.*, 2002). En peces de agua dulce una parte importante de la diversidad resulta de procesos evolutivos que conducen a la diferenciación genética de las poblaciones (Ward *et al.*, 1994; Waples, 1998). Los procesos evolutivos encargados de la variación genética en las poblaciones son mutación, recombinación, deriva génica, migración, endogamia y selección natural (Hamilton, 2009). Dicha diferenciación se debe a que a lo largo de la historia de las poblaciones, han surgido barreras temporales, conductuales o geográficas que separan a la población inicial, de manera que los diferentes grupos poblacionales se aíslan reproductivamente parcial o totalmente, permitiendo la acumulación de diferencias genéticas (Laikre *et al.*, 2005).

Las poblaciones pueden variar en cuanto a su conectividad en paisajes heterogéneos o fragmentados, como en el caso de la cuenca del Magdalena que tiene un régimen hidrológico de acuerdo a las diferentes regiones climáticas que atraviesa el río, o estar influida por historias biogeográficas espacialmente diversas que determinan la variación genética actual (Excoffier *et al.*, 2009).

Son numerosas las hipótesis que se han propuesto para explicar el origen y diversificación de la ictiofauna dulceacuícola de la región, entre las que destacan:

1) las transgresiones marinas del Mioceno Temprano (Lovejoy *et al.*, 1998; Lovejoy *et al.*, 2006); 2) las elevaciones de sistemas montañosos y el tiempo de aislamiento de drenajes transandinos (Albert *et al.*, 2006); 3) las conexiones históricas que permitieron la dispersión entre drenajes (Hubert y Renno, 2006; Hubert *et al.*, 2007a); 4) los refugios originados durante el Pleistoceno (Hubert *et al.*, 2007b) y 5) los cambios de curso, eventos de captura y divisoria de aguas de los grandes ríos de América del Sur (Lundberg *et al.*, 1998).

Para entender la influencia de estos factores, primero hay que ser capaz de describir y cuantificar la cantidad de variación genética en una población y el patrón de variación genética entre poblaciones (Hedrick, 2012). Esto posteriormente puede ser utilizada para reconstruir la historia evolutiva, examinar la situación contemporánea de las poblaciones en cuanto a sus niveles de variabilidad genética y con base en esto implementar estrategias de gestión (Hedrick y Hurt, 2012).

Potamotrygonidea es la única familia de peces cartilaginosos restringida a hábitats dulceacuícolas con unas 23 especies reconocidas como válidas hasta el momento (Lasso *et al.*, 2013, 2016). Es exclusiva de Sudamérica y presenta una amplia distribución, desde la cuenca del río Atrato en Colombia hasta el sistema del río de la Plata en Argentina (Dahl, 1971; Rosa, 1985; Mojica *et al.*, 2005; Maldonado-Ocampo *et al.*, 2006; Mejía-Falla *et al.*, 2009).

Los Potamotrygónidos son un grupo muy complejo desde el punto de vista taxonómico, encontrando dificultades en la identificación (Rosa *et al.*, 2010; de Carvalho y Lovejoy, 2011; de Carvalho *et al.*, 2011) y ecológico pues los vacíos de información hacen difícil conocer la condición poblacional real de las especies presentes en los ecosistemas dulceacuícolas de Colombia (Mejía-Falla *et al.*, 2009). Su historia de vida incluye características similares a sus congéneres marinos (Holden, 1974) y son vulnerables a actividades antrópicas en su medio natural. Dentro de las amenazas en las cuencas, están la pesca de subsistencia con propósitos de consumo y ornamental, la captura incidental y directa para evitar accidentes con su espina, así como la alteración,

destrucción y contaminación de sus hábitats (Mojica *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2004; Mejía- Falla *et al.*, 2009).

Potamotrygon magdalenae es la única especie de rayas de agua dulce endémica de Colombia. Se encuentra presente a lo largo de la cuenca del río Magdalena y sus principales tributarios (Dahl, 1971), así como en las cuencas del Atrato, Cauca, Catatumbo y San Jorge (Mejía- Falla *et al.*, 2009).

Esta especie ha sido catalogada tanto por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y a nivel nacional bajo el estatus de casi amenazada (NT) (Charvet-Almeida y Almeida, 2009; Mojica *et al.*, 2012). En consecuencia, resulta necesario desarrollar investigaciones sobre su biología, ecología y aspectos relacionados con su explotación y conservación como recursos pesqueros de importancia comercial. Así mismo, a nivel nacional, se estableció en el Plan de Acción Nacional para la Conservación y Manejo de Tiburones, Rayas y Quimeras de Colombia (PAN - Tiburones Colombia) (Caldas *et al.*, 2010), con un grado de prioridad alta para *P. magdalenae*, identificando además la necesidad de generar información sobre aspectos de genética poblacional, definiendo acciones a corto plazo para aguas continentales.

En este sentido, y considerando que los factores que moldean el patrón de diversidad genética varía dependiendo la especie y es el resultado en conjunto de procesos históricos y contemporáneos, intrínsecos (biológicos / ecológicos) y extrínsecos (físicos / ambientales) (Kelly y Palumbi, 2010), se desarrolló este estudio, con miras a caracterizar la diversidad genética y su distribución a lo largo del rango de distribución de *P. magdalenae* en el río Magdalena. Se espera con ello, determinar si ésta consiste de una población panmíctica o si se encuentra estructurada como varias poblaciones genéticamente discretas en diferentes zonas geográficas a lo largo de la cuenca, donde pueden estar aisladas en épocas secas. La determinación o estudio de la variabilidad genética poblacional en esta especie permitirá un mejor manejo de sus poblaciones (Sinclair, 1988) y un mejor entendimiento de procesos microevolutivos a los que se encuentran sujetas (Coyne, 1994), sentando así las bases necesarias para continuar proyectos de investigación orientados a la conservación de los recursos genéticos de esta especie.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Origen evolutivo de las rayas de agua dulce de Sur América

El registro fósil de los peces de Sudamérica muestra cómo a finales del Cretáceo, poco después de la separación de África y Sudamérica, ya existían familias y aún géneros de peces actuales. En la bibliografía se registran fósiles del género *Potamotrygon* en los depósitos fosilíferos del Mioceno en la localidad de La Venta al norte de Neiva en Colombia (Lundberg *et al.*, 1986; Lundberg y Chernoff, 1992; Lundberg, 1997, 1998); estas evidencias indican que los peces neotropicales en el Mioceno ya estaban muy diversificados y existían la mayoría de los géneros y aún algunas especies actuales, como por ejemplo, *Phractocephalus hemiliopterus* (cajaro), *Lepidosiren paradoxa* (pulmonado) y *Hoplias malabaricus* (tararira).

Diferentes autores reconocen la ascendencia marina de los potamotrygónidos (Miyake, 1988; Nishida, 1990; Dingerkus, 1995; McEachran *et al.*, 1996; Lovejoy, 1996; Marques, 2000; Quijada, 2003; Dunn *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2010), aunque actualmente se sigue discutiendo sobre el ancestro marino más cercano, el cual estaría entre el nuevo género (monotípico) *Megratrygon*, el cual incluye a *Himantura schmardae* y es grupo hermano de la familia Potamotrygonidae y Urotrygonidae (Last *et al.*, 2016). Así mismo queda por resolver la incógnita si este grupo invadió el continente de América del Sur desde las costas del Atlántico o del Pacífico (Rosa *et al.*, 2010).

Otras hipótesis filogenéticas han propuesto varios escenarios biogeográficos para explicar el origen de las rayas de agua dulce en América del Sur, basados en modelos dispersionistas o vicariantes. En el primer caso el ancestro marino invadió el continente en uno o más episodios distintos, posiblemente a partir de la costa Atlántica. La hipótesis vicariante destaca que el ancestro quedó “atrapado” o aislado en las cuencas de agua dulce después de las incursiones marinas sobre el continente, fueran éstas a partir de la costa Atlántica o Pacífica (Brooks *et al.*, 1981; Rosa, 1985; Lovejoy, 1997; Lovejoy *et al.*, 1998, Carvalho *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2010).

La conexión del Istmo Centroamericano entre el Pacífico oriental y el Caribe podía proporcionar amplios intercambios de la fauna marina con distintos orígenes (Pacífico o Atlántico-Tethyana), así como una amplia distribución de la especie ancestral a lo largo de la costa norte de América del Sur. Esta conexión permaneció activa durante el largo período de tiempo geológico en el que ocurrió la diferenciación de las rayas de agua dulce en América del Sur, hasta la emergencia del Istmo Centroamericano en el Plioceno superior (3 millones de años atrás) (Albert *et al.*, 2006; Posadas y Ortiz-Jaureguizar, 2010). También hay incertidumbre acerca de la datación del origen de los potamotrigónidos, ya que el intervalo señalado en la literatura va desde el Cretácico hasta el Mioceno (Lovejoy, 1996, 1997; Lovejoy *et al.*, 1998; Marques 2000; Brito y Deynat, 2004; Carvalho *et al.*, 2004).

2.2. Origen geológico de la cuenca del río Magdalena

Al finalizar el Cretáceo (hace 60 millones de años), se incrementó el ciclo tectónico andino y el vulcanismo, lo que provocó el levantamiento de fondos oceánicos de basalto que generaron un arco de islas que más tarde se convirtieron en la cordillera Occidental y la consolidación de las principales montañas de la cordillera Central, con el resultado del desplazamiento de las aguas marinas que desde hacía millones de años cubrían la región (Castaño, 2003). La intensificación de las lluvias torrenciales incrementó los procesos erosivos y la gran cantidad de sedimentos generados por la cordillera Central, creando lo que en la actualidad es el valle del Magdalena.

En el caso de Colombia, el levantamiento de la cordillera Oriental y su unión con la sierra de Mérida terminaron aislando las cuencas del Catatumbo, Magdalena y todas las que se formaron posteriormente al occidente de esta cordillera. Esta barrera determinó que la cuenca del Orinoco dejara de desembocar junto con el río Magdalena en el golfo de Venezuela y desvió su curso hacia el Oriente, hace aproximadamente 11 millones de años (Hoorn, 1994).

El levantamiento final de la cordillera Central ocurrió durante el Plioceno (6 y 8 millones de años atrás) y muchos de los suelos y estratos geológicos de la antigua plataforma continental que estaba sumergida total o parcialmente bajo el agua marina, se levantaron y dejaron atrapados en las altas cumbres andinas infinidad de organismos marinos, como

lo demuestran los restos paleontológicos del área fosilífera de Villa de Leyva y Sáchica en Boyacá. Durante ese período terminó de estructurarse la cuenca del río Magdalena y otros vestigios marinos quedaron depositados en la parte baja del valle en el desierto de la Tatacoa en Huila, donde los fósiles fueron sometidos a procesos de acumulación, desgaste, exposición y relleno, producto de la dinámica de una cuenca fluvial recientemente formada (Castaño, 2003).

El aislamiento durante 10 millones de años, ha hecho que la ictiofauna de la región transandina (al occidente de la cordillera Oriental) sea altamente endémica. En la cuenca hidrográfica Magdalena-Cauca se registran unas 213 especies de peces (Maldonado-Ocampo *et al.*, 2008), con un porcentaje de endemismo es alto con un poco más de 50 %, destacándose la presencia de la única raya dulceacuícola endémica para el país, la raya del Magdalena *P. magdalenae*.

Los ríos Magdalena y Catatumbo continuaron compartiendo una cuenca común hasta el final del Terciario, cuando el levantamiento de la serranía del Perijá dividió en dos este drenaje común. Se registra una mayor afinidad entre la fauna íctica del Magdalena y el Catatumbo que entre cada una de éstas y la cuenca Orinoco. Lo anterior evidencia que las mismas compartieron un área común durante un lapso muy prolongado, de por lo menos 8 millones de años (Castaño, 2003).

La cuenca del Magdalena es relativamente joven; aparte del cauce bien definido de su parte alta, compuesta por estrechos cañones y profundas gargantas, se presenta un serpenteante río que recorre el valle entre las cordilleras y una corriente zigzagueante que al llegar a las llanuras bajas se diluye en las sabanas y llena miles de vasos comunicantes, ciénagas, lagunas y brazos de diversas dimensiones; es un río que aún no encuentra su lecho definitivo antes de desembocar en el Caribe (Castaño, 2003). Precisamente, esta juventud explica el inclinado gradiente del río y su lecho irregular, con cauce cambiante, alta erosión y considerable transporte de materiales, hechos que han dificultado su navegación (CORMAGDALENA, 2005).

2.2.1. Variables ambientales de la cuenca del río Magdalena

El recorrido del río por el país establece tres zonas bioclimáticas entre ellas la Alta, Media y Baja Montaña. La primera se localiza entre los 5.700 y 2.700 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m) de la cordillera de los Andes, donde se encuentran los pisos glaciales, páramos y los deshielos que provienen de los Nevados del Huila, Tolima y Ruiz. La Media Montaña se encuentra en el piedemonte andino a 2.700 m s.n.m, conformada por fallas producidas con el choque de las placas tectónicas y los macizos montañosos de actividad volcánica, lo que origina procesos morfológicos que incrementan la sedimentación que contiene el río Magdalena. La baja montaña que recibe los sedimentos de las partes altas y está ubicada en las llanuras del piso térmico cálido (Castaño, 2003).

En un estudio realizado por la Fundación Squalus (Mejía-Falla *et al.*, 2014) se encontraron diferencias significativas en todas las variables ambientales analizadas (profundidad, pH, temperatura de fondo, oxígeno disuelto y conductividad) entre las tres zona del río Magdalena (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de la prueba de Kruskal-Wallis de las variables ambientales en las tres regiones de estudio, indicando el tamaño de muestra válido (N), el estadístico (H) y el valor de p. Así mismo, se especifican entre que regiones se presentan tales diferencias, definidas a partir de la prueba de comparaciones múltiples ($p < 0.05$). A: Alto Magdalena, M: Magdalena Medio, B: Bajo Magdalena (Mejía- Falla *et al.*, 2014).

Variable	N	H	p	Diferencias
Profundidad (m)	360	118.18	$p < 0.0001$	A vs M y B
pH	342	12.438	0.020	A vs B
Temperatura fondo (°C)	357	110.65	$p < 0.0001$	A vs M vs B
Oxígeno disuelto (mg/L)	342	20.374	$p < 0.0001$	A vs M y B
Conductividad (m us)	307	19.870	$p < 0.0001$	B vs A y M

Los rangos de las características físico-químicas fueron: temperatura del fondo del agua: 12.5°C - 38.5°C (moda: 28.7°C; promedio 27.9°C), pH: 4.5 – 10 (moda: 7; promedio 6.8), oxígeno disuelto: 0 mg/L – 220 mg/L (moda: 2.53 mg/L y promedio 4.4 mg/L) y conductividad del agua: 1.3 Ω cm – 64516.129 Ω cm (moda: 53191.49 Ω cm; promedio 12600.55 Ω cm).

2.2.2. Alto Magdalena

La región del Alto Magdalena con una extensión de 54,785 km², representa aproximadamente 4.8% del territorio nacional, incluye los departamentos de Huila y Tolima en su totalidad y parte de los departamentos de Cauca (parte alta de la cuenca del río Paéz) y Cundinamarca (cuencas de los ríos Bogotá, Seco y Sumapáz). Entre su nacimiento y su límite norte, los raudales de Honda donde la pendiente del río es de 5%, ha recorrido aproximadamente 591 km (Valderrama y Zarate, 1989). El valle del Alto Magdalena se caracteriza por precipitaciones menores de 1.100 mm anuales y un régimen bimodal de lluvias; este valle no presenta llanuras aluviales actuales aunque sí terrazas amplias del Cuaternario Superior, las cuales están profundamente disectadas donde la agricultura mecanizada ha reemplazado los bosques (García y Dister 1990).

En términos generales, ésta es la parte más seca de la cuenca y desde el punto de vista ecosistémico se extiende desde el páramo húmedo, en donde nace el río, hasta el bosque seco tropical característico de la zona de Honda, en el fondo del valle. La cobertura vegetal que crecía originalmente en lo profundo del valle, conformada principalmente por el bosque seco tropical, casi ha sido extinguida por las actividades agropecuarias y la demanda de leña (Castaño, 2003).

2.2.3. Medio Magdalena

La parte media del Magdalena se extiende desde el raudal de Honda hasta población de Tamalameque (García y Dister 1990), y tiene como principales tributarios provenientes de la Cordillera Central los ríos Guarinó, La Miel, Cocorná, Samaná Norte, San Bartolomé, Ité y Cimitarra, y de la Oriental los ríos Negro, Ermitaño, Carare, Opón, Sogamoso y Lebrija.

A diferencia del Alto y Bajo Magdalena, su clima es húmedo tropical con un régimen de lluvias bimodal y precipitaciones promedio cercanas a los 3.000 mm anuales, aunque en algunos enclaves como la zona del bosque de Florencia, en las cabeceras de los ríos La Miel y Samaná Sur, la Serranía de Las Quinchas, entre los ríos Carare y Magdalena, las cabeceras del río Opón y el extremo sur de la Serranía de San Lucas, alcanza valores entre 5.000 y 7.000 mm al año. Por esta razón, la casi totalidad del Valle Medio del Magdalena era una gran selva que separaba las regiones semiáridas del Alto y Bajo

Magdalena, hasta mediados del siglo pasado cuando fue deforestado masivamente (Mojica *et al.*, 2006). En términos generales, este sector de la cuenca es el más húmedo, y dominaba en él la selva húmeda tropical con su característica vegetación de grandes árboles, lamentablemente muy intervenida en la actualidad por la expansión de la frontera agrícola y ganadera.

2.2.4. Bajo Magdalena

Presenta condiciones particulares en su composición y en sus características físicas bióticas, es una de las zonas más ricas del país. La dinámica hidrológica, climática y en particular su desarrollo biológico, le imprimen un carácter de alta productividad a sus ecosistemas; las épocas de subienda y bajanza propician las migraciones de reproducción y alimentación de especies ícticas de interés comercial y regulan la actividad de los pescadores en los ríos y ciénagas (Castaño, 2003).

Aguas abajo de El Banco, se forma la bifurcación entre los brazos de Mompós y Loba, dejando en el medio la planicie inundable conocida como la isla de Mompós, ubicada en el centro de la región de La Mojana y la depresión momposina. Estos terrenos se encuentran por debajo del nivel del mar y en ellos confluyen los sistemas del Cauca, San Jorge y Magdalena, por lo que su característica esencial es la presencia de innumerables caños y cuerpos de agua de diversos tamaños que se entrelazan entre sí, formando una compleja red. Esta zona padece de dos períodos de inundaciones, de los cuales el más importante se presenta entre los meses de octubre y diciembre. En esta sección, el canal navegable conformado por los grandes brazos es profundo y permite la navegación durante todo el año sin mayores inconvenientes. A su vez, los canales menores permiten el paso de embarcaciones de poco calado. En Tacaloa, el río se vuelve a unir y toma un cauce más uniforme (Guzmán, 2005).

El río atraviesa así el valle ubicado entre las cordilleras Central y Oriental de sur a norte hasta verter sus aguas en tres bocas distintas, que conforman el delta: la primera y más importante es la de Bocas de Ceniza en Barranquilla, hasta donde el río realiza un recorrido de 1.540 km y deposita unos 7.000 metros cúbicos de agua por segundo al Atlántico (Anónimo, 1999); la segunda, se refiere al Canal del Dique que, a la altura del municipio de Calamar, Bolívar, dirige una porción del líquido hasta la Bahía de Cartagena; una tercera boca comprende una intrincada serie de canales y humedales que comunican al río con la Ciénaga Grande de Santa Marta y que, además, almacenan agua en los

2.3. Biología de las rayas de la familia Potamotrygonidae

La familia Potamotrygonidae está conformada por peces cartilagosos (Chondrichthyes) caracterizados y diferenciados de otras rayas cercanas de hábitos marinos y/o estuarinos (*Hypanus*, *Megatrygon* y *Urotrygon*), por tener un proceso pre-pélvico extendido o alargado. El cuerpo es en forma de disco, circular u oval, deprimido y la boca está en posición ventral. Tienen cinco pares de hendiduras branquiales en posición ventral y un par de espiráculos en posición dorsal. Exhiben dimorfismo sexual en la forma y tipo de dientes y, así como en todos los condriictios, los machos tienen órganos copuladores o “claspers” también conocidos como “mixoptergios”, para la fecundación interna. Tanto los machos como las hembras pueden realizar migraciones de carácter reproductivo (Lasso *et al.*, 2013).

Estos peces son de hábitos bentónicos y viven posados en el fondo. Presentan en la cola una o más espinas aserradas de origen dérmico, recubiertas de células que secretan veneno, y que clavan como un mecanismo defensivo cuando son atacadas o pisadas accidentalmente (Castex y Loza 1963; Lasso, 1985; Haddad Jr. *et al.*, 2013).

2.3.1. Posición y clasificación taxonómica

Clase Chondrichthyes

Subclase Elasmobranchii

Superorden Batoidea (Orden Rajiformes)

Orden Myliobatiformes (Suborden Myliobatoidei)

Familia Potamotrygonidae)

Género *Heliotrygon* Carvalho & Lovejoy 2011

Género *Paratrygon* Duméril 1865

Género *Plesiotrygon* Rosa et al. 1987

Género *Potamotrygon* Garman 1877

Potamotrygon magdalenae (Duméril, 1965)

Potamotrygonidae es una familia compuesta por 28 especies válidas y cuatro géneros incluyendo *Potamotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* y *Heliotrygon* (de Carvalho y Lovejoy, 2011; Weigmann, 2016) El género *Potamotrygon* es el más complejo, ya que está constituido por 23 especies descritas y tres no descritas, con distribución en ríos de Colombia, Venezuela, Bolivia, Guyana, Guyana Francesa, Surinam, Perú, Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay (Mejía-Falla *et al.*, 2009; Weigmann, 2016). Colombia posee 11 especies de rayas de agua dulce descritas, destacando a *P. magdalenae* (Figura 1) por ser endémica de las cuencas de los ríos Magdalena, Atrato y San Jorge (Araújo *et al.*, 2004; Mejía-Falla *et al.*, 2009; Lasso *et al.*, 2013).

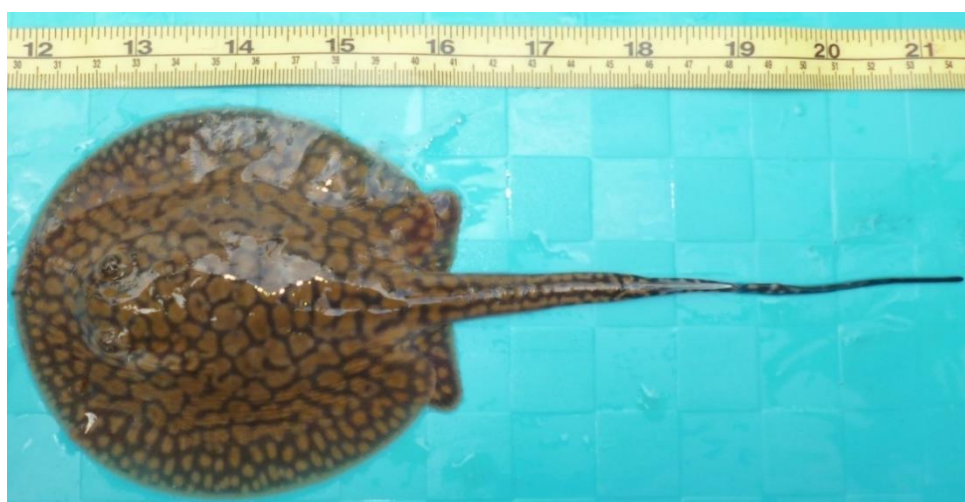


Figura 2. Fotografía de un individuo de la especie *Potamotrygon magdalenae*. (Foto tomada por Viviana Márquez)

2.3.2. Distribución y hábitats

Potamotrygon magdalenae es una especie endémica que se encuentran en la cuenca del Río Magdalena (Teshima y Takeshita, 1992; Villa-Navarro *et al.*, 2006; Mojica *et al.*, 2006). Esta especie ha sido reportada en el río Atrato, San Jorge, Catatumbo, Magdalena y Cauca. Se distribuye en el Magdalena-Cauca (Magdalena hasta el Huila; en el Cauca hasta Puerto Valdivia, y en el río San Jorge hasta unos 50 km arriba de Monte Líbano (Dahl, 1971), y en los afluentes del río Magdalena, con registros en los ríos Cimitarra, Opón, La Miel, Guarinocito, Manso, Opia y Pata. Registrada en los embalses de Betania y el Prado (Jiménez-Segura *et al.*, 2011).

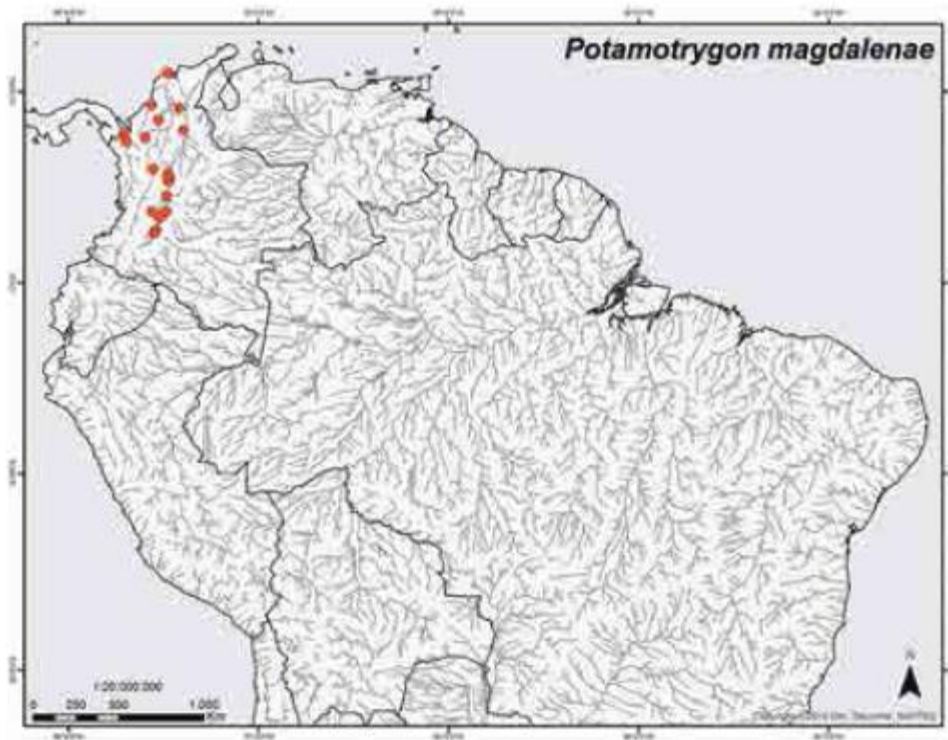


Figura 3. Registros de *Potamotrygon magdalena* en la cuenca del Magdalena (Imagen tomada de Lasso *et al.*; 2013).

2.3.3. Comportamiento y migración

Los aspectos ecológicos como las migraciones de la familia Potamotrygonidae en condiciones naturales ha sido poco estudiada (Garrone-Neto y Sazima, 2009a, b), ya que la mayoría de los datos existentes se basan en observaciones indirectas.

En el caso de *P. magdalena*, se ha planteado que esta especie prefiere fondos lodosos, en aguas turbias y poco profundas (Dahl, 1971; Galvis *et al.*, 1997). Lasso *et al.* (2013) reportan que en el embalse de Betania los pescadores señalan su presencia (avistamientos) cuando el nivel del agua de la represa sube y se mantiene por quince días. Las rayas dejan de observarse y desaparecen cuando baja el nivel. Aparentemente dichas fluctuaciones en su presencia están asociadas con la búsqueda de ensenadas para la reproducción. En el alto Magdalena los pescadores reportan un comportamiento gregario (grupos de 5 a 6 rayas). Así mismo, durante la época reproductiva los arponeros del Magdalena han observado la formación de cardúmenes.

Investigaciones recientes sobre este tema en Brasil (Garrone-Neto *et al.*, 2007) registran la presencia de dos especies de rayas *P. falkneri* y *P. motoro* en la parte alta de río Paraná. Dicha distribución no había sido reportada en estas especies ya que antes la parte alta del río Paraná, era separada de la parte media y baja del mismo. En la actualidad, ambas zonas se encuentran conectadas debido a las presas construidas en gran parte de su curso. Las presas habían destruido las barreras naturales, por lo que es posible asumir la dispersión reciente de muchas especies de organismos acuáticos hacia las cabeceras del río Paraná.

Hoy en día, ambas especies se encuentran a más de 400 kilómetros aguas arriba de donde sus poblaciones se habían aparentemente establecido y muestran signos de expansión (Garrone-Neto *et al.*, 2007; Garrone-Neto y Haddad Jr. 2010; Haddad Jr. *et al.*, 2013).

Garrone-Neto *et al.* (2014), probaron la hipótesis de que las rayas están expandiendo su distribución hacia nuevas áreas por medio de pasajes artificiales construidos para la navegación fluvial en la cuenca superior del río Paraná, Sureste de Brasil. Los individuos de *P. falkneri* y *P. motoro* fueron capturados, con marcas t-bar, que habían sido colocadas en los individuos en la presa de Jupíá - una planta de energía hidroeléctrica construida en la década de 1970- la cual tiene una esclusa de navegación instalada en 1998 para el movimiento de los buques. Dos individuos de *P. falkneri* fueron recapturados aguas arriba de la presa Jupíá, unos ocho kilómetros de distancia del lugar de captura. Este estudio demuestra la capacidad de las rayas para superar las barreras artificiales, como las centrales hidroeléctricas, a través de esclusas de navegación.

2.3.4. Características reproductivas

Potamotrygon magdalenae es una especie vivípara aplacentaria, matrotrofica y con histotrofia lipídica. La talla de madurez sexual de hembras varía entre regiones y entre individuos en vida silvestre y en cautiverio, según reportan varios autores (Tabla 2). Se reproduce a lo largo del año, las crías nacen con un promedio de 10 cm de Ancho de Disco (AD) y un período de gestación es de tres meses (Mejía-Falla *et al.*, 2011).

Ramos-Socha (2010) registró para la ciénaga de Sabayo, hembras maduras en noviembre y entre enero y mayo. Ramos-Socha y Grijalba-Bendeck (2011) reportaron que

el ovario derecho de las hembras es menos desarrollado que el izquierdo, ambos úteros son funcionales y pueden tener de uno a cinco embriones que nacen entre 8.7 y 9.5 cm AD.

Tabla 2. Parámetros reproductivos reportados para las hembras de *Potamotrygon magdalenae* en vida silvestre (tres cuencas del Magdalena y río Atrato) y en cautiverio.

* Intervalo de tallas de las hembras gestantes (Tomado de Mejía-Falla *et al.* 2016).

Cuenca	Localidad	Talla de madurez (cm AD)	Talla de nacimiento (cm AD)	Fecundidad uterina	Referencia
Bajo Magdalena	Ciénaga de Sabayo	16 - 24	8,7 - 9,5	1 a 5	Ramos Socha y Gribalba-Bendeck (2011)
	Lagos Cartagena	17 - 21	10	2	Teshima y Takeshita (1992)
Magdalena Medio	Ciénaga de Paredes	14,4	8 - 8,5	1 a 10	Pedreros (2012)
Alto Magdalena	No indicado	22 - 26,1	-	7 a 10	Lasso <i>et al.</i> (2013)
Río Atrato	Cuenca Media	23	7 - 9	2	Mosquera (2012)
Cautiverio	<i>Ex-situ</i>	17 - 19,6*	4,5 - 6,5	1 a 3	Pérez <i>et al.</i> (datos no publ.)

Mejía-Falla *et al.* (2016) encontraron que los machos de *P. magdalenae* en la cuenca del Magdalena medio presentaron claspers calcificados y de mayor tamaño a menores tallas que los machos del Bajo Magdalena. Las estructuras reproductivas de machos maduros e inmaduros de esta especie presentaron igual desarrollo del lado derecho e izquierdo. Las hembras maduras del Bajo Magdalena presentaron mayor desarrollo del útero derecho e igual desarrollo de las glándulas oviducuales; por su parte, las del Medio Magdalena presentaron mayor desarrollo del útero y de la glándula oviducal izquierda. Los autores sugieren que *P. magdalenae* como especie, presenta una estrategia reproductiva que consiste de madurez sexual temprana, fecundidad alta, crías pequeñas y probablemente ciclo reproductivo continuo.

2.3.5. Aspectos pesqueros y de comercialización

Potamotrygon magdalenae se captura en el Bajo Magdalena con fines ornamentales en estado juvenil, siendo comercializados nacional e internacionalmente, representando el primer o segundo lugar dentro de los potamotrygónidos más exportados entre los años 2003 y 2012 (Perdomo-Núñez, 2005; Sánchez-Duarte *et al.*, 2013) y ante el colapso de

las pesquerías, los adultos son capturados con fines de subsistencia y es más común en la parte alta de la cuenca (Mejía-Falla *et al.*, 2016).

Sin embargo, se desconocen las variaciones en términos de captura, comercialización y uso de la especie entre las tres regiones de la cuenca y por ende, la presión que sobre la especie se ejerce a lo largo de su distribución. El método de captura es manual con fines ornamentales y se captura de manera incidental con algunos métodos de pesca como atarrayas, trasmallos y chinchorros (Lasso *et al.*, 2013).

Mejía- Falla *et al.* (2016) encontraron que a partir de entrevistas a 150 pescadores en 24 localidades ubicadas a lo largo de la cuenca del río Magdalena, y de monitoreos a bordo de embarcaciones pesqueras, las rayas cuyo fin es el comercio ornamental se capturan a lo largo del año en el Bajo Magdalena, por encargo, y siendo de principal interés los juveniles, los cuales, luego de ser capturados, son aclimatados en una piscina temporal, empacados en bolsas plásticas con oxígeno, a una densidad de tres a cinco rayas por bolsa, y llevados en cajas de cartón hasta el aeropuerto. En cuanto a la comercialización, las rayas son vendidas principalmente a un acopiador (95,2%) y unos pocos se venden directamente a un exportador (4,8%).

En las otras regiones los pescadores no se dedican a la pesca de rayas, todos afirmaron haberlas capturado por accidente en sus jornadas de pesca y tan sólo el 18% las han consumido, aunque su consumo es ocasional y es más común en la parte alta de la cuenca. La espina es usada, aunque en menor proporción, con fines de brujería tanto en la parte alta como baja de la cuenca. Esta especie es usada tradicionalmente para extraerle el hígado, cuyo aceite es empleado en el tratamiento de afecciones del sistema respiratorio (Mejía-Falla *et al.*, 2014). En este aspecto, en la cuenca baja se ha reportado su uso para tratar dolores de cabeza y para el fortalecimiento del feto durante el embarazo (Rojas-Ceballes *et al.*, 2013).

En las tres zonas de la cuenca, la pesca de rayas se realiza en canoas y usando nasas, chinchorros, trasmallos y atarrayas. La efectividad de la atarraya en la captura de rayas varió entre localidades, presentando mayor efectividad de lance y mayor captura por lance en el Bajo Magdalena, siendo superior al Medio Magdalena y nulo en el Alto Magdalena (Mejía-Falla *et al.*, 2014). Los lances con trasmallos presentaron una efectividad de

captura similar entre las tres regiones, tanto en los lances como en la abundancia relativa por lance y por hora. Considerando el tiempo efectivo del arte en el agua en cada faena, con trasmallo (entre 710 y 780 min) y con atarraya (1-4 min), se encontró una mayor captura de rayas por hora con la atarraya ($Z=5,759$, $p<0,001$; Mejía-Falla *et al.*, 2014)

2.4. Uso de secuencias génicas de ADN mitocondrial en el estudio de la variación genética

Para el análisis molecular en estudios de diversidad genética se han utilizado regiones conservadas de ADN nuclear, ADN mitocondrial y ADN ribosomal. El ADN mitocondrial (ADNmt) en particular, ha sido utilizado como una poderosa herramienta en el estudio de la estructura genética de poblaciones y estimaciones de flujo de genético, hibridación, biogeografía y relaciones filogenéticas (Kambhampati y Smith, 1995). Esto, debido a que el ADNmt es pequeño comparado con el genoma nuclear, posee un rango relativamente rápido de cambio evolutivo, es heredado de forma uniparental por vía materna y tanto el orden como la composición de genes se hayan generalmente conservadas (Hoy, 1994). Además el alto número de copias de genes mitocondriales hace mucho más fácil el trabajo a diferencia de las copias individuales de genes nucleares, adicionalmente su herencia materna ha sido particularmente útil a nivel intraespecífico (Cruickshank, 2002).

Dentro de las subunidades que contiene el ADNmt, el gen citocromo oxidasa I (COI), posee varias características que lo convierten en uno de los mejores marcadores moleculares disponibles para estudios relacionados con la evolución (Salinas, 2010). Es ampliamente utilizado en estudios de “Barcoding” gracias a su gran rango de señal filogenética, y cuya evolución es lo suficientemente rápida para permitir la discriminación de especies relacionadas y grupos filogeográficos dentro de una especie (Hebert *et al.*, 2003), por lo que su análisis permite tener una mejor aproximación a la identidad taxonómica de las muestras.

El tamaño y estructura, son características conservadas en la mayoría de organismos que se han estudiado, la longitud del gen, la cual es mayor dentro de las tres subunidades del citocromo oxidasa, permite amplificar y secuenciar un mayor número de caracteres o nucleótidos. La presencia de extremos altamente conservados permite el uso de cebadores universales para generar comparaciones y conclusiones robustas en diferentes tipos de análisis (Salinas, 2010). Así mismo, al poseer una tasa de mutación más rápida

comparada con otros genes mitocondriales, permite el análisis de polimorfismos nucleotídicos dentro de una misma especie, a diferencia del ND4, por ejemplo, que es utilizado para analizar diferencias nucleotídicas a nivel de género o familia (Salinas, 2010).

La filogeografía es el estudio de los procesos que rigen la distribución geográfica de los linajes genéticos en las poblaciones. Debido a que en ella convergen aspectos macro y microevolutivos, integra información de disciplinas variadas como la genética de poblaciones, la genética molecular, la demografía histórica, los análisis filogenéticos, la paleontología y geología. Con estas herramientas, busca interpretar la manera en la que los procesos históricos alteraron la demografía de las poblaciones y dejaron una huella evolutiva en la distribución geográfica de la variabilidad genética (Avise, 2000).

El estudio de los patrones de variación genética en un contexto geográfico a través de la filogeografía, ha contribuido considerablemente a la comprensión de los factores que han influenciado la estructura poblacional y la divergencia de las especies (Knowles y Maddison, 2002). A pesar de que la filogeografía se ha utilizado comúnmente como una herramienta para esclarecer patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie, las aproximaciones filogeográficas también pueden ser útiles para inferir procesos demográficos históricos como flujo génico, tamaño efectivo poblacional, secuencias de colonización, cuellos de botella y también para determinar fronteras entre especies e identificar unidades de conservación (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000, 2008; Freeland, 2005; Vázquez-Domínguez, 2007).

De esta forma, el estudio de la distribución geográfica de linajes genealógicos ha sido ampliamente usado para describir eventos históricos, como fragmentación de hábitats o expansión del rango de distribución de especies y poblaciones, eventos de migración, vicarianza, o extinción de linajes genéticos, así como otros procesos que afectan la estructura de las poblaciones o que causan especiación en un contexto espacial y temporal (Hardy *et al.*, 2002). Además, el estudio comparado de los patrones filogeográficos de varias especies o poblaciones co_distribuidas permite plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes, por ejemplo de vicarianza o dispersión, e identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieron haber influido en ellos (Arbogast y Kenagy, 2001; Zink, 2002; Lanteri y Confalonieri, 2003). Una de las aplicaciones más

usadas en estudios de filogeografía y en genética evolutiva ha sido determinar el grado de estructura poblacional de las especies a lo largo del área de distribución, reconocer grupos intraespecíficos (subespecies, poblaciones, etc.), estimar tiempo de divergencia y establecer causas de la diversificación y distribución geográfica (Avice, 2000).

III. ANTECEDENTES

3.1. Estudios de genética en rayas de la familia Potamotrygonidae

Marques (2000) realizó una investigación utilizando sistemática molecular y datos parasitológicos, dirigida a estudiar los orígenes y patrones de diversificación de la familia Potamotrygonidae, para estudiar los componentes biogeográficos de las rayas de agua dulce. Los marcadores moleculares utilizados fueron ARN ribosomal 12S (12S), ARN ribosomal 16S (16S), Citocromo Oxidasa subunidad 1 (COI) y Citocromo b (Cyt-b) combinados con 65 caracteres morfológicos. Esta investigación apoya la monofilia de la familia y a su vez que el género marino más cercano era *Himantura*. Esta investigación fue la primera en intentar definir las relaciones entre especies dentro del género *Potamotrygon*, aunque algunas especies no fueron muestreadas en toda su área de distribución geográfica, por lo que no es muy clara la relación entre las mismas (Lasso *et al.*, 2013).

Toffoli (2006) propuso una filogenia molecular con base en dos genes mitocondriales (ATP sintetasa subunidades 6 e 8, y Citocromo c oxidasa I - COI), y su resultado fue que *Paratrygon* es el género basal y *Potamotrygon* el más derivado. La posición de *Plesiotrygon* varió de acuerdo con el método de reconstrucción, indicando todavía que este género puede ser parte de *Potamotrygon*. Lo mismo demostró Toffoli *et al.* (2008) donde el cladograma con máxima parsimonia para ambos genes indicó *Plesiotrygon* como el grupo hermano de *Potamotrygon schroederi*, y las dos últimas como el grupo hermano de una especie no descrita de *Potamotrygon* del Río Negro en Brasil. El tiempo de divergencia entre los dos clados se estimó como 7,68 (6,10 – 9,57) millones de años atrás y entre *Plesiotrygon iwamae* y *Potamotrygon schroederi* como 6,77 (5,61 – 7,93) millones de años atrás. En el escenario biogeográfico, Toffoli (2006) destacó la posible importancia

del Arco Purús (cf. Lundberg *et al.*, 1998), constituyendo una barrera geográfica que restringió la ocupación de la Amazonia oriental por los potamotrigónidos hasta dos millones de años atrás.

A partir del 2010, en la Universidad de los Andes se ha venido realizando una investigación enfocada en la sistemática molecular de las rayas de agua dulce en Colombia y Venezuela en colaboración con el Instituto Alexander von Humboldt y la Fundación La Salle de Ciencias Naturales (García-Villamil, 2012). El objetivo de este estudio estuvo enmarcado en el Plan de Acción Nacional de Tiburones, PAN-Tiburones, Colombia (Caldas *et al.*, 2010), que establece la necesidad de incluir herramientas moleculares que puedan contribuir a la conservación y manejo de los elasmobranquios. Se hizo una aproximación sistemática del grupo analizando los marcadores moleculares Cyt-b, COI y ATPasa 6, de muestras colectadas en las cuencas de los ríos Amazonas, Orinoco, Magdalena, Esequibo, Atrato y Lago de Maracaibo. Como resultado se resalta la utilidad del marcador molecular Cytb, para sustentar las relaciones previamente establecidas a nivel morfológico. Este marcador ha sido efectivo resolviendo relaciones en linajes divergentes (Martin *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1994; García *et al.*, 2000), incluso previamente dentro de Batoidea, donde mostró también mayor compatibilidad entre los datos moleculares morfológicos probando ser más efectivo (Dunn *et al.*, 2003).

En Brasil Maniglia (2010) y Cruz (2013), realizaron tesis doctorales empleando herramientas moleculares con el fin de detectar efectos negativos de poblaciones invasoras identificando patrones generales de impacto en la estructura y la variabilidad genética en las especies de raya de agua dulce *P. motoro* y *P. falkneri* a lo largo del río Paraná y aclarar algunas dudas acerca de la posibilidad de hibridación natural entre estas dos especies en esta región. La primera tesis identificó y caracterizó genéticamente dos especies de *Potamotrygon* en el alto del río Paraná, *P. motoro* presentó mayor diversidad morfológica y genética y *P. falkneri* presentó dos grupos bien diferenciados genéticamente. La diferenciación genética de las dos especies fue muy baja, indicando que la especiación fue reciente y pone en evidencia individuos híbridos de estas dos especies. Por su parte Cruz (2013), obtuvo que para en la zona de estudio del río Paraná la población de *P. motoro* es panmítica, es decir durante el proceso de colonización no hubo diferenciación genética. En contraste, *P. falkneri* presentó diferenciación genética con evidencias de estructuración a lo largo del Río Paraná, esta diferenciación ocurrió

probablemente como consecuencia del proceso de colonización de los nuevos ambientes por la especie. Los individuos híbridos fueron constatados con marcadores moleculares, en algunos individuos con coloración intermedia entre *P. motoro* y *P. falkneri* revelaron identidad con la especie *P. falkneri* por el análisis del ADNmt, mientras que los marcadores nucleares tenían compatibilidad con el genoma de *P. motoro*, concluyendo que estos individuos son realmente híbridos entre *P. motoro* y *P. falkneri* y que tienen como origen materno la especie *P. falkneri*.

En cuanto al uso de ADN nuclear, Cruz et al. (2013), utilizaron el método de pirosecuenciación para generar microsatélites en *P. motoro* a partir de ADN genómico. Se analizaron 40 individuos de una población silvestre de dicha especie y obtuvieron 10 loci polimórficos e identificaron un total de 35 alelos. Los primers de este estudio serán útiles para la investigación de la estructura de la población y la inferencia de los patrones demográficos de rayas de agua dulce.

IV. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la variabilidad genética constituye un factor fundamental para entender la forma en cómo se estructuran las poblaciones de especies de peces en sistemas dulceacuícolas y su interpretación se encuentra estrechamente relacionada con características geomorfológicas de la cuenca, con aspectos biológicos y ecológicos de la especie, como su carácter migratorio, y con la influencia de actividades antrópicas sobre las poblaciones y su hábitat. El nivel de conocimiento de la genética de poblaciones de la fauna íctica en los principales ríos de Suramérica, es aún incipiente y las deficiencias en la información disponible impiden el análisis histórico sobre la biogeografía de las especies (Sivasundar *et al.*, 2001) o la existencia de stocks o subpoblaciones genéticamente discretas con fines de manejo. Sin embargo, para *P. magdalenae* no registra información sobre la genética de sus poblaciones por lo que es importante aumentar los conocimientos de genética, con el fin de obtener información de la diversidad genética entre las zonas de muestreo ya que es fundamental para cualquier especie que requiera planes de manejo y medidas de conservación de la especie (Haig, 1998; Grijanva-Chon *et al.*, 2003).

Potamotrygon magdalenae se encuentra en la categoría “Casi Amenazada”, en la Lista Roja de la UICN y en el libro Rojo de Peces Dulceacuícolas de Colombia (Mojica *et al.*, 2012) debido a que es un recurso de doble propósito, ornamental y pesquero (subsistencia), lo cual potencia las amenazas sobre sus poblaciones (Lasso *et al.*, 2011e). En Colombia esta especie fue considerada con prioridad de acción muy alta en el PAN-Tiburones (Caldas *et al.*, 2010) y la reciente inclusión e CITES (apéndice III), también Mejía-Falla *et al.* (2016) registraron diferencias reproductivas entre hembras y machos (maduros e inmaduros) entre dos localidades ubicadas en el bajo y medio Magdalena haciéndose necesario realizar estudios en torno a la misma.

v. HIPÓTESIS

Dado que la distribución de una especie está influenciada por factores bióticos y abióticos del ambiente en el que habita, así como por el comportamiento y la capacidad de movimiento, se espera encontrar que la población de *P. magdalenae* a lo largo de su distribución en la cuenca del río Magdalena no es panmíctica, diferenciándose genéticamente las localidades del Bajo y Medio Magdalena debido a que se encuentra sometida a un amplio rango de variabilidad ambiental a lo largo de su distribución en la cuenca del río Magdalena.

VI. OBJETIVOS

6.1 . Objetivo general

- ✓ Determinar la variabilidad genética poblacional de *Potamotrygon magdalenae* y la posible estructura genética a lo largo de su distribución en la cuenca del Río Magdalena.

6.2 . Objetivos específicos.

- ✓ Analizar la distribución espacial de la variabilidad genética de *P. magdalenae* entre las zonas de muestreo.
- ✓ Estimar el grado de diferenciación genética entre las localidades de *P. magdalenae* entre las localidades de estudio.
- ✓ Determinar la presencia de fluctuaciones demográficas de *P. magdalenae* relacionadas con eventos históricos.

VII. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

7.1. Área de estudio y recolecta de muestras

El río Magdalena nace cerca de la laguna de La Magdalena a 3.685 m s.n.m, en una pequeña planicie del páramo de Las Papas (departamento de Huila), en el macizo colombiano de la cordillera de los Andes y desemboca en el mar Caribe después de recorrer 1.540 km. Su cuenca hidrográfica abarca una extensión de 257.000 km², que corresponde a cerca del 23 % de Colombia, se encuentra enmarcada entre el macizo colombiano, el flanco oriental de la cordillera Central al occidente, el flanco occidental de la cordillera Oriental al oriente y por la planicie costera del Caribe al norte (Villa-Navarro *et al.*, 2006).

La precipitación media anual varía entre 3000 y 4000 mm y la temperatura media anual es de 28°C, con humedad media relativa de 74%. Este río originalmente se compone de bosque húmedo tropical (64%), las áreas restantes son el bosque seco tropical (CORPOMOJANA, 2002). Hay dos estaciones secas anuales de diciembre a mediados de abril y de julio a agosto y dos estaciones de lluvias de mediados de abril a principios de julio y finales de agosto a noviembre (Turbay, 2000).

7.2. Recolecta de muestras

La cuenca del Magdalena es una región interandina en la mayor parte de su extensión y caribeña en su parte baja. La presencia de los Andes asegura al territorio de la cuenca una variación de la temperatura en función de la altitud. En sentido vertical, la cuenca abarca desde el nivel del mar hasta alturas superiores a los 5.000 m s.n.m, y en ella se encuentran los puntos más altos de la geografía nacional. Esta variación altitudinal hace que en ella se encuentren todos los pisos térmicos y se dividan en tres zonas: Alto, Medio y Bajo.

Se definieron cinco puntos de muestreo a lo largo del río Magdalena, dos localidades ubicadas en el Bajo Magdalena y tres del Magdalena Medio: complejo lagunar de Mesolandia (Atlántico), Chimichagua (Cesar), Ayapel (Córdoba), ciénaga de Paredes (Santander) y Guarinocito (Caldas) (Figura 4).



Figura 4. Localización geográfica de las áreas de muestreo sobre el río Magdalena, Ciénaga de Mesolandia (Atlántico), Ciénaga de Paredes (Santander), Ayapel (Córdoba), Chimichagua (Cesar) y Charca de Guarinocito (Caldas).

La captura de individuos de *P. magdalenae* se realizó entre 2012 y 2015, en medio de las jornadas tradicionales de trabajo con los pescadores, especialmente en las zonas en las que las rayas son usadas como recurso ornamental (Magdalena Bajo); sin embargo, en muchas ocasiones los pescadores facilitaban las rayas que salían de la pesca con redes. Una vez capturados, los animales fueron medidos (ancho de disco, cm), sexados y se le extrajo una muestra de tejido, el cual fue preservado en alcohol al 96% y mantenido a 20°C.

La recolecta de muestras han sido desarrollados a través de proyectos co-financiados por la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP), Conservación Internacional Colombia, Colciencias, Fundación Squalus e Idea Wild.

Ciénaga de Mesolandia:

Ubicada en el departamento del Atlántico, dentro del complejo lagunar de Malambo, en el cual son vertidos desechos sólidos y aguas residuales de origen industrial y doméstico provenientes de los municipios de Soledad y Malambo, vertimientos que afectan negativamente el ecosistema (CRA, 2011). Hernández y Martínez (2011) reportan que la zona recibe desechos del aeropuerto internacional “Ernesto Cortissoz”, del matadero del municipio de Malambo, de industrias avícolas y del barrio subnormal de Mesolandia. Al norte, la ciénaga es influenciada por el caño de Soledad, que contiene descargas de desechos provenientes del sector industrial y del municipio de Soledad y en el margen oriental, llegan las aguas negras del arroyo Manuela Beltrán.

Chimichagua – complejo cenagoso de Zapatosa:

Ubicada en el municipio de Chimichagua, en el departamento del Cesar. La ciénaga está localizada en el margen derecho del río Magdalena y actúa como un reservorio que acumula agua en época de lluvias y la devuelve a la depresión Momposina-Bajo Magdalena en época de sequía. Este complejo cenagoso tiene capacidad para almacenar 1.000 millones de metros cúbicos de agua provenientes de los ríos Magdalena y Cesar (Rangel, 2007). Esta ciénaga es una depresión con profundidades variables, entre 1 y 8 m, dependiendo de la zona y de la época del año, pero en períodos atípicos ha llegado hasta los 13 m. El promedio mínimo de profundidad se presenta en febrero (sequía) y el máximo en mayo (aguas altas o época de lluvias). El clima de la subregión es cálido y oscila entre 28° y 32°C (Viloria, 2008).

Ayapel:

Este municipio forma parte de la subregión del San Jorge en Córdoba. Está ubicado en la parte más oriental del departamento y su mayor atractivo es la ciénaga de Ayapel, la mayor reserva hidrobiológica de Córdoba, de la cual depende la subsistencia de sus pobladores. La ciénaga está localizada en el noroccidente de Colombia, sobre un área aproximada de 150 km², a 25 m s.n.m y a 25 Km de la zona minera con la más alta producción de oro en el país (sur de Bolívar y noreste de Antioquia) (García *et al.*, 2009).

Ciénaga de Paredes:

La ciénaga de Paredes pertenece al valle medio de la cuenca del río Magdalena (García y Dister, 1990) y está localizada entre los municipios de Puerto Wilches y Sabana de Torres, al noreste del departamento de Santander, a una altura de 75 m s.n.m. La ciénaga presenta una profundidad promedio de 4 m en época de aguas altas y aproximadamente 0.9 m en los meses de diciembre a marzo (Castelblanco-Martínez *et al.*, 2005). Tiene un área aproximada de 1.431 hectáreas y es considerada como un cuerpo cenagoso de segundo orden (Arias, 1985).

Charca de Guarinocito:

La Charca es un humedal natural palustre emergente, ubicado entre las ciudades de Honda en el departamento del Tolima y La Dorada en el departamento de Caldas, es originada por el cauce abandonado del río Magdalena y está formada por la acción erosiva del mismo (PAI, 2008). Reúne un total de 78 hectáreas, su profundidad media es de 2 m y se comunica con el río Magdalena en las épocas de lluvias, cuando el nivel del río sube por un caño meándrico de 2.770m (Lombo, 2006).

7.2. Trabajo de laboratorio

Extracción de ADN

La extracción ADN se realizó en el Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, utilizando el kit de extracción de Promega® o el protocolo de Fenol-Cloroformo descrito por Sambrook *et al.*, (1989); este consiste en incubar un trozo de tejido en 500 µL de buffer de Lisis (100mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM EDTA, 2% SDS y 20 mM NaCl) conteniendo 15 µL de proteinasa K durante 3-4 hrs a 55 °C y su posterior precipitación con isopropanol, limpieza con etanol y posterior resuspensión en 50-100 µl de buffer TE. Al finalizar la extracción del ADN se comprobó la cantidad y calidad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador (UVP®).

Amplificación de la región mitocondrial Citocromo oxidasa subunidad I (COI)

Se amplificó el gen Citocromo Oxidasa subregión I (COI) del ADN mitocondrial (COI-ADNmt) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Usando los siguientes primers universales (Ward *et al.*, 2005):

FishF₁: 5'- T CAACCAACCACAAAGACATTGGCAC -3',

FishR₁:5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3';

FishR₂:5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3',

FishF₂:5'- TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC 3'.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador de gradiente de última generación modelo T100TOUCH de 96 pozos Bio-rad, en un volumen final de 15µl, conteniendo 10-100 ng de DNA, 1Xde buffer de reacción (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0.8mM de mix de dNTP's, de 0,25 -1 pmol/µl de cada uno de los primers (F y R) y 0,025 U de DreamTaq® Polymerase. El programa utilizado en la amplificación consistió de 95°C durante 2 minutos, para la separación inicial de las cadenas de ADN, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, para finalizar con un ciclo a 72°C durante 10 minutos como extensión final. Una vez amplificados los fragmentos de ADNmt se enviaron a secuenciar a Hig Throughput (htSEQ) o a MacroGen Corp (Rockville, MD, EUA).

La visualización, edición y alineamiento de las secuencias de COI se llevaron a cabo en el programa BIOEDIT. De igual forma, cada entrada de la matriz de datos (alineamiento), fue verificada en su identidad taxonómica a través del algoritmo BLAST disponible en la página web de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), así como a través de la base de datos de la iniciativa "International Barcoding of Life" (<http://www.boldsystems.org/>). Cada secuencia fue inspeccionada a ojo y corregida cuando fue necesario. Las secuencias dudosas (mal alineados o incluso con muchos nucleótidos indeterminados) se retiraron manualmente.

7.3. Análisis de datos

7.3.1 Análisis de secuencias e índices de diversidad del gen citocromo oxidasa I (COI)

Utilizando el programa DNASP 5.2 (Rozas *et al.*, 2010), se determinaron los siguientes estimadores de diversidad genética para las secuencias de ADNmt: diversidad haplotípica (H_d), nucleotídica (π), número de haplotipos (h) y número de sitios polimórficos (S) para el total de muestras secuenciadas y por localidad.

Se seleccionó el modelo de sustitución nucleotídica más adecuado, esto es, el que mejor se ajusta a las secuencias. Mediante el programa JModelTest2 (Darriba *et al.*, 2012), el cual utiliza estimaciones de máxima verosimilitud y el criterio de Akaike.

7.3.2 Estructura poblacional

Con el programa Arlequin 3.5 se estimó el grado de divergencia genética entre localidades por medio del índice de fijación Φ_{ST} (Excoffier *et al.*, 1992), el cual refleja las diferencias entre las secuencias con relación a un valor de distancia, de acuerdo a los parámetros del modelo de sustitución, estimando el grado de diferenciación entre pares de localidades.

Se agruparon las secuencias de acuerdo a las localidades de muestreo, en la división de la cuenca del río Magdalena, esto es, las localidades de Ciénaga de Mesolandia y Chimichagua, como Bajo Magdalena y las localidades de Ayapel, Ciénaga de Paredes y Guarinocito como Magdalena Medio.

Para estimar la variación genética en diferentes niveles jerárquicos y explicar dónde están concentradas las diferencias, si dentro de las poblaciones (F_{ST}), entre las poblaciones dentro de las regiones (F_{SC}), o entre regiones (F_{CT}), se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) en el software Arlequín versión 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Además, con la finalidad de incorporar el criterio de la ubicación espacial de las zonas de muestreo y los grupos, se utilizó el programa SAMOVA1.9, el cual maximiza la proporción de la varianza total debida a diferencias entre grupos considerando la

ubicación espacial de las localidades y diferencias máximas entre éstas. La agrupación es inferida por el programa según el número de grupos que se asignan (Duplanloip *et al.*, 2002).

Para encontrar las posibles barreras geográficas y genéticas en la distribución de la especie, se usó el programa Barrier 2.2 (Manni *et al.*, 2004). Este método de análisis usa el algoritmo de máxima diferencia de Monmomier usando los valores de distancias genéticas y geográficas (Monmomier, 1973), dando como resultado una imagen con polígonos de cada localidad y las principales barreras correlacionadas con las tasas más altas de diferenciación en la matriz de distancia genética.

7.3.3 Red de haplotipos

Se elaboró una red de haplotipos, con la finalidad de visualizar si éstos se distribuyen de manera aleatoria entre las diferentes regiones analizadas, para ello se usó el programa NETWORK, y el algoritmo de Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999).

7.3.4 Análisis de aislamiento por distancia

Con el fin de evaluar la correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas se realizó la prueba de Mantel (Mantel, 1967), con el programa Arlequin 3.5, con 20.000 permutaciones. Se necesitaron dos matrices, una de distancias genéticas, usando los valores de Φ_{ST} , la cual fue linealizada mediante la aproximación sugerida por Slatkin (1983) $F_{ST,RE} = F_{ST} / (1 - F_{ST})$ con Arlequin 3.5, y otra de distancias geográficas, la fue obtenida con Google maps, calculando el trayecto en kilómetros, recorriendo el cauce de río Magdalena.

Si el coeficiente de correlación es positivo, indica que existe estructura espacial que puede relacionarse a la distancia geográfica, a barreras o a características del paisaje que impiden o reducen el flujo genético, considerando una $P = 0.05$ (Guillot *et al.*, 2009).

7.3.5 Demografía Histórica

Se realizó el análisis de distribución de Mismatches, por medio del programa Arlequin 3.1 con 10.000 permutaciones (Excoffier *et al.*, 2005), obteniendo gráficas de diferencias nucleotídicas entre comparaciones pareadas de haplotipos para las localidades del estudio y parámetros de demografía histórica. También se incluyó el estadístico de la prueba de Fu y Tajima (Fu, 1997; Tajima, 1998) los cuales son pruebas de neutralidad, indicando una expansión demográfica que generalmente produce valores negativos.

Se efectuó el análisis Bayesian Skyline Plot o Perfil Demográfico Bayesiano, utilizando el procedimiento de Monte Carlo con cadenas de Markov, donde combina los perfiles demográficos para generar una distribución posterior de tamaño efectivo poblacional a través del tiempo. Posteriormente se trazó un horizonte bayesiano con los datos simulados de forma coalescente, reconstruyendo la historia demográfica, con un margen de error del 95% Por medio del programa BEAST 1.6.1 “Bayesian evolutionary analysis by sampling trees” con 100 millones de iteraciones (Drummond y Rambaut, 2007). Este método estima la dinámica de las poblaciones en el pasado a través del tiempo mediante una muestra de secuencias moleculares, sin requerir un modelo paramétrico pre-especificado de historia demográfica (Drummond *et al.*, 2005).

Para obtener los análisis de número de migrantes y el tamaño efectivo poblacional, se usó el programa MIGRATE 3.6.11 (Beerli y Felsenstein 1999; Beerli, 2004). El static heating se aplicó a 4 cadenas independientes usando ajustes de temperatura de 1, 1.5, 3.0 y 1000000. Un total de 13.500 de steps fueron corridos, registrando un valor cada 2.700 generaciones, posteriormente 33.750 fueron descartadas como burn-in. Se realizaron tres corridas independientes, evaluando un total de 1.093.500.000 genealogías. Los resultados se expresaron como el valor promedio de estas tres corridas independientes. Para hacer esta comparación posible, la tasa de migración histórica se escaló usando la fórmula $m = M \times \mu$, y la tasa de mutación utilizada fue 1×10^{-8} . Los valores de m calculados fueron graficados en círculo con ayuda de los paquetes Migest 1.6 (Abel y Sander, 2014), Plyr 1.8.1 (Wickham, 2011) y Circlize 0.2.4 (Gu *et al.*, 2014) en el software R 3.1.2 (R Development Core Team, 2008).

VIII. RESULTADOS

8.1. Análisis de secuencias e índices de diversidad del gen citocromo oxidasa I (COI)

De las 120 muestras de tejido obtenidas para el presente análisis, 23 pertenecen a individuos capturados en el complejo lagunar de Mesolandia, 7 de Chimichagua, 26 de Ayapel, 35 de ciénaga de Paredes y 29 de Guarinocito. Se logró una amplificación exitosa de 112 secuencias de ADNmt en las que se amplificó un fragmento de 549 pares de bases (pb) del gen COI encontrando 22 sitios polimórficos (S), los cuales representaron 20 haplotipos (h).

Los índices de diversidad genética de las secuencias de ADNmt, para cada una de las localidades, pueden observarse en la Tabla 3. Los valores promedio estimados para todas las muestras fue moderado en el caso de la diversidad haplotípica ($H_d = 0.47$) y notablemente bajo en el caso de la diversidad nucleotídica ($\pi = 0.001$). La Localidad con mayor número de sitios polimórficos (ocho) y haplotipos únicos fue Ayapel, mientras que la localidad de Chimichagua presento tres sitios polimórficos.

Tabla 3. Estimadores de diversidad genética por localidad, cuenca y total para COI-ADNmt. S: es número de sitios polimórficos, h: número de haplotipos, H_d : la diversidad haplotípica y π : diversidad nucleotídica.

Cuenca	Nº Secuencias	S	h	$H_d \pm sd$	$\pi \pm sd$	ϕK
Mesolandia	22	8	4	0.333±0.124	0.0014±0.0008	0.978
Chimichagua	7	3	4	0.810±0.130	0.0020±0.0005	1.143
Ayapel	25	8	8	0.543±0.119	0.0014±0.0004	0.790
Paredes	35	6	6	0.437±0.097	0.0009±0.0002	0.538
Guarinocito	23	5	4	0.439±0.114	0.0011±0.0004	0.648
Bajo Magdalena	29	11	7	0.478±0.012	0.0019±0.0006	
Magdalena Medio	83	15	15	0.475±0.004	0.0012±0.0002	
Todas	112	22	20	0.474±0.059	0.001±0.0002	0.676

Al agrupar las localidades de muestreo por cuencas, esto es, Bajo Magdalena (Ciénega de Mesolandia y Chimichagua) y Magdalena Medio (Ayapel, Ciénega de Paredes y Guarinocito), se encontró que los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica fueron muy similares entre ambas regiones. La mayoría de los haplotipos están en el Magdalena medio, sin embargo, el bajo Magdalena y la localidad de Chimichagua presentan ligeramente mayor diversidad haplotípica y nucleotídica por lo que tienen menos secuencias (Tabla 3).

El modelo de evolución molecular que mejor se ajustó al grupo de secuencias, es el modelo TrN (asumiendo el modelo evolutivo Tamura-Neí, 1993), el cual parte modelos de sustitución nucleotídica de la familia de General Time-Reversible (GTR) y considera que los nucleótidos tienen frecuencias distintas. Dicho modelo reduce el número de tasas relativas de sustitución de nucleótidos a tres: transversiones, transiciones entre purinas y transiciones entre pirimidinas.

8.2. Estructura poblacional

La señal de divergencia genética con las secuencias de ADNmt mediante el estimador Φ_{ST} entre pares de las localidades, permitió reconocer diferencias entre éstas. La localidad de Guarinocito (Magdalena medio) se diferencia respecto de todas las localidades del estudio; Mesolandia (bajo Magdalena) se diferencia con las localidades de Paredes (Magdalena medio) y Chimichagua (bajo Magdalena). Se observan valores de Φ_{ST} altos entre la localidad de Chimichagua (medio Magdalena) con Ayapel (bajo Magdalena) (Tabla 4). Las comparaciones Φ_{ST} entre las localidades de la cuenca baja y media del río Magdalena, mostraron un valor bajo estadísticamente no significativo ($\Phi_{ST} = 0.006$, $p = 0.252$).

Tabla 4. Comparaciones de diferenciación genética entre pares de muestras de *P. magdalenae*. Valores debajo de la diagonal: el valor de Φ_{ST} obtenido de las secuencias de ADNmt; valores encima de la diagonal: el valor de significancia estadística (P); en rojo: valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Localidad	Mesolandia	Chimichagua	Ayapel	Paredes	Guarinocito
Mesolandia	-	0.009	0.468	0.000	0.000
Chimichagua	0.137	-	0.009	0.054	0.000
Ayapel	-0.001	0.133	-	0.090	0.045
Paredes	0.039	0.092	0.011	-	0.000
Guarinocito	0.041	0.203	0.028	0.066	-

El AMOVA indicó un nivel significativo de heterogeneidad genética, con un 96% de varianza dentro de las poblaciones. En cuanto a los índices de fijación, entre poblaciones (F_{SC}) y dentro de las poblaciones (F_{ST}) las diferencias fueron moderadas pero estadísticamente significativas ($F_{SC} = 0.027$, $F_{ST} = 0.033$, $P < 0.05$) (Tabla 5). Este análisis nos está indicando que hay más variabilidad entre las poblaciones dentro de los grupos que entre regiones, por lo que podemos inferir que las diferencias ocurren entre poblaciones de una misma región más que entre poblaciones de las regiones.

Tabla 5. Resultados de la AMOVA (SS: suma de los cuadrados, %V: porcentaje de Varianza e Índices de fijación (F_{CT} , F_{SC} , F_{ST}) y su grado de significancia.

Fuente de Variación	SS	Varianza	% V	Índice de Fijación	Valor de significancia
Entre Regiones	0.499	-0.008	-2.24	$F_{CT} = 0.491$	$P = 0.589$
Entre Poblaciones	2.659	0.023	6.16	$F_{SC} = 0.001$	$P = 0.001$
Dentro de Poblaciones	39.693	0.370	96.08	$F_{ST} = 0.001$	$P = 0.001$
Total	42.851	0.386	-	-	-

En el análisis de SAMOVA, se agruparon las localidades del Bajo (BM) y Medio Magdalena (MM) en dos y tres grupos, definidos por el programa, de la siguiente manera:

Dos grupos:

1: Guarinocito (MM), Mesolandia (BM), Ayapel (MM), Paredes (MM)

2: Chimichagua (BM)

Tres grupos:

1: Guarinocito (MM)

2: Mesolandia (BM), Ayapel (MM), Paredes (MM)

3: Chimichagua (BM)

Cuatro grupos:

1: Ayapel (MM), Paredes (MM)

2: Mesolandia (BM)

3: Chimichagua (BM)

4: Guarinocito (MM)

Bajo Magdalena (BM); Medio Magdalena (MM)

Los resultados señalan diferencias genéticas, estadísticamente significativas, para las localidades de estudio, entre y dentro de las poblaciones para la todas las agrupaciones, lo cual concuerda con los resultados de la AMOVA.

Tabla 6. Análisis espacial de la varianza molecular entre dos grupos inferidos por SAMOVA 1.0, según las varianzas y las coordenadas geográficas dentro de la cuenca del río Magdalena. %V= porcentaje de Varianza.

Grupos	Fuente de variación	Varianza	% V	Índice de fijación	Valor significancia
DOS	Entre grupos (F_{CT})	1.19	12.97	0.12	P= 0.21±0.01
	Entre poblaciones dentro de grupos (F_{SC})	1.93	2.45	0.02	P= 0.00±0.00
	Dentro de las poblaciones (F_{ST})	39.45	84.59	0.15	P= 0.00±0.00

TRES	Entre grupos(F_{CT})	2.06	6.05	0.06	P= 0.09±0.00
	Entre poblaciones dentro de grupos(F_{SC})	1.06	1.55	0.01	P= 0.00±0.00
	Dentro de las poblaciones (F_{ST})	39.45	92.41	0.07	P= 0.00±0.00
CUATRO	Entre grupos(F_{CT})	2.7	5.39	0.053	P= 0.10±0.00
	Entre poblaciones dentro de grupos(F_{SC})	0.42	0.51	0.00	P= 0.01±0.00
	Dentro de las poblaciones (F_{ST})	39.45	94.1	0.05	P= 0.00±0.00

Con el programa Barrier 2.2, se obtuvo una representación de las barreras en un paisaje genético, arrojando tres barreras: la primera denominada **A**, separa la localidad de Mesolandia del (Bajo Magdalena), de las demás; la barrera **B**, separa las localidades de Mesolandia y Chimichagua y la barrera **C**, separa la localidad de Guarinocito. Este patrón se relaciona con los resultados de las comparaciones de diferenciación genética entre las zonas de muestreo para *P. magdalenae* (Φ_{ST}) (Figura 5)

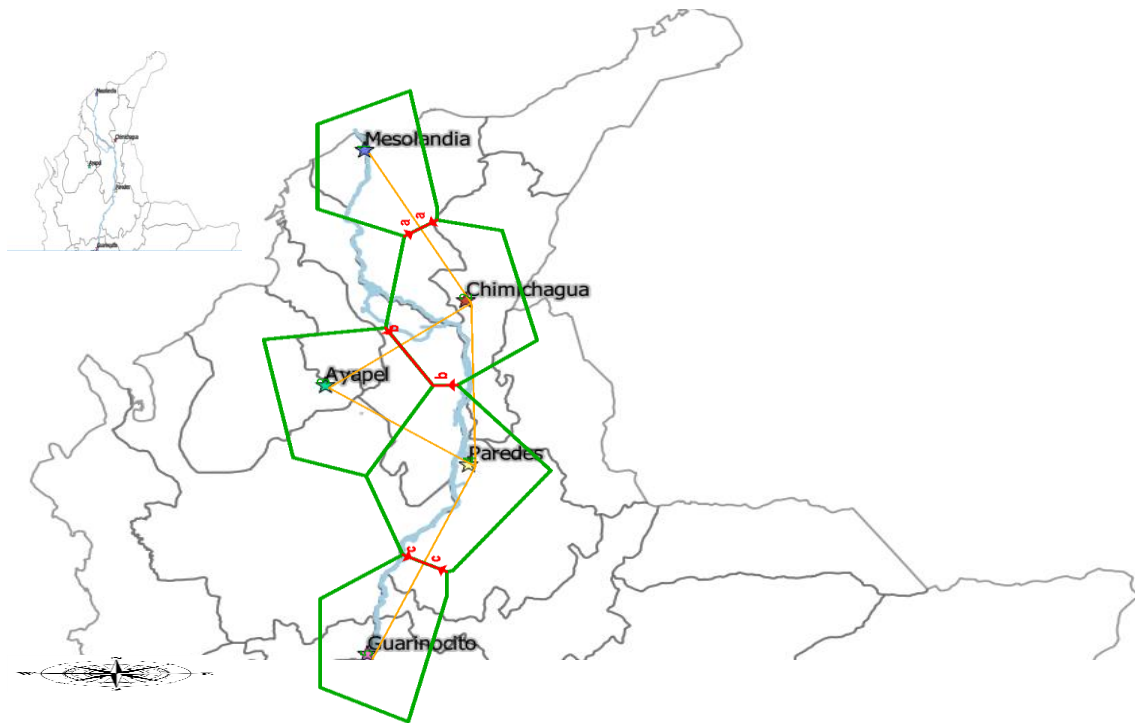


Figura 5. Barreras geográficas detectadas entre las localidades de estudio del río Magdalena: Mesolandia, Chimichagua, Ayapel, Paredes y Guarinocito. Las líneas en rojo muestran las barreras geográficas, ordenadas alfabéticamente respecto a su importancia.

8.4. Red de haplotipos

Se encontró que 78 de las secuencias conforma al haplotipo dominante *Pm-1*, presente en todas las localidades, seguido del *Pm-2* que lo comparten siete secuencias. Se resalta que en total, de las 112 secuencias empleadas para el estudio, hay 17 haplotipos únicos de los cuales seis pertenecen a individuos de la localidad de Ayapel (Figura 6a). Al momento de agrupar las localidades en las cuencas Media y Baja de la cuenca del Magdalena, se observa que las localidades del Bajo Magdalena solo tienen cinco haplotipos únicos, en tanto que las localidades del Magdalena Medio tienen la mayoría de los haplotipos; así mismo, los *Pm-1* y *Pm-2* se encuentran en las dos zonas y son los más abundantes (Figura 6b).

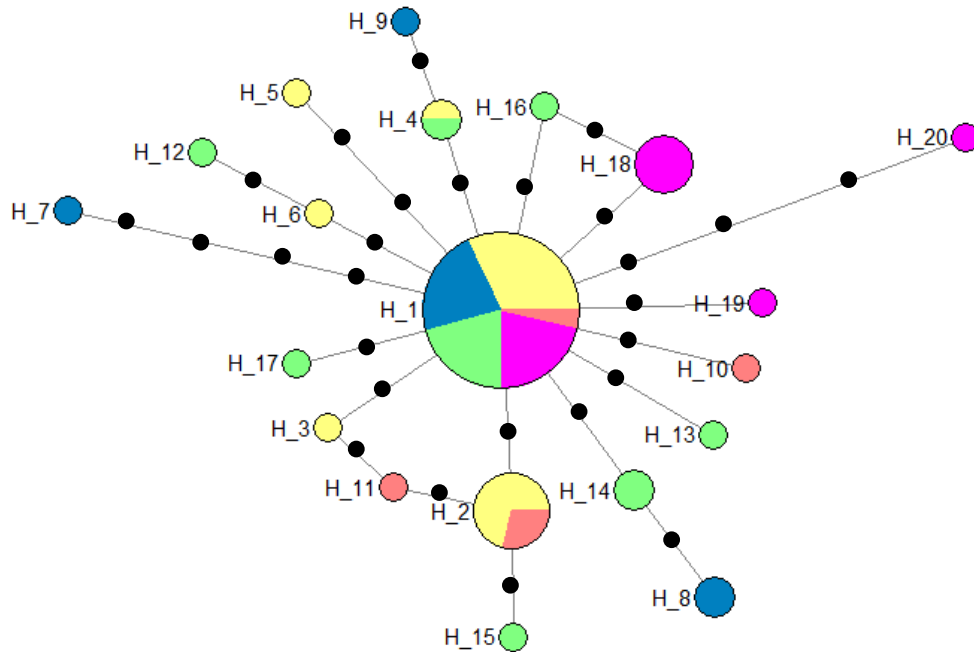


Figura 6a. Red de haplotipos del gen COI para *P. magdalенаe*, por localidades de muestro: Mesolandia (azul), Ayapel (verde), Ciénaga Paredes (amarillo) y Guarinocito (lila).

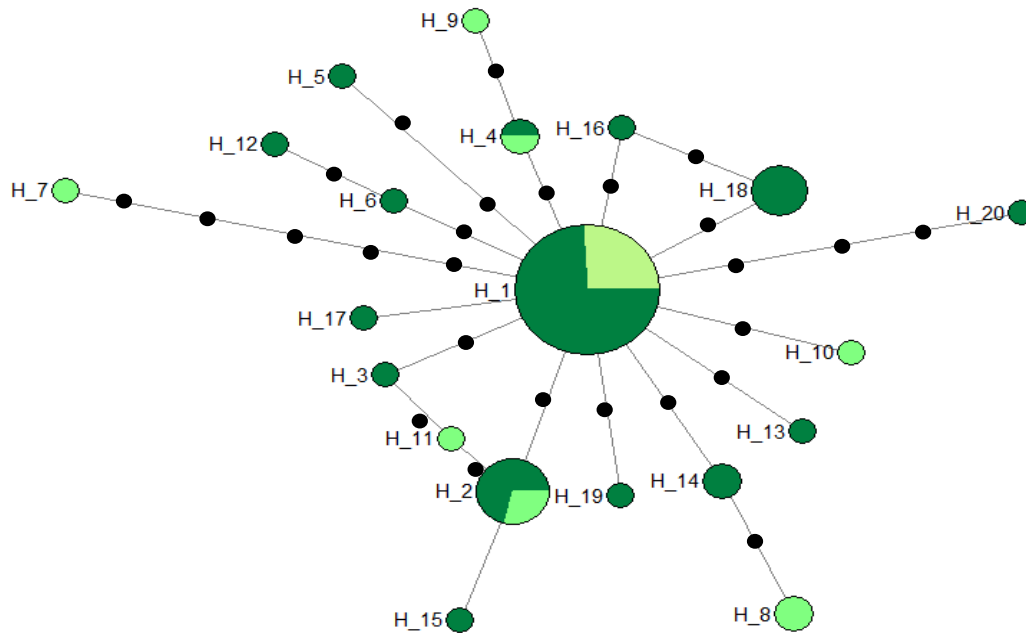


Figura 6b. Red de haplotipos del gen COI para *P. magdalенаe*, para las localidades de acuerdo a su ubicación a lo largo de la cuenca: Bajo Magdalena (verde claro) y Medio Magdalena (verde oscuro).

8.3. Análisis de aislamiento por distancia

Al realizar la correlación de la matriz de distancias entre las localidades de muestreo y los valores de Φ_{ST} (linealizados con Slatkin $F_{ST,RE} = F_{ST} / (1 - F_{ST})$), dio como resultado una correlación negativa entre la distancia geográfica y la genética ($R = -0.463$), aunque no es estadísticamente significativa $P = 0.630$.

8.5. Demografía Histórica

La distribución de mismatches, representa la curva de distribución de frecuencias del número de diferencias entre pares de secuencias. En las localidades muestreadas con presencia de *P. magdalenae*, la distribución de mismatches se obtuvo tanto para la totalidad de las secuencias como para cada localidad. De éstas se observa una curva de tipo unimodal de los histogramas, lo que refleja que esta población se ajusta al modelo de expansión demográfica (Figura 7). Lo anterior es apoyado por la estimación de la desviación de la suma de cuadrados respecto de lo esperado bajo el modelo de expansión (SSD), el cual presentó un valor bajo y no significativo (Tabla 7).

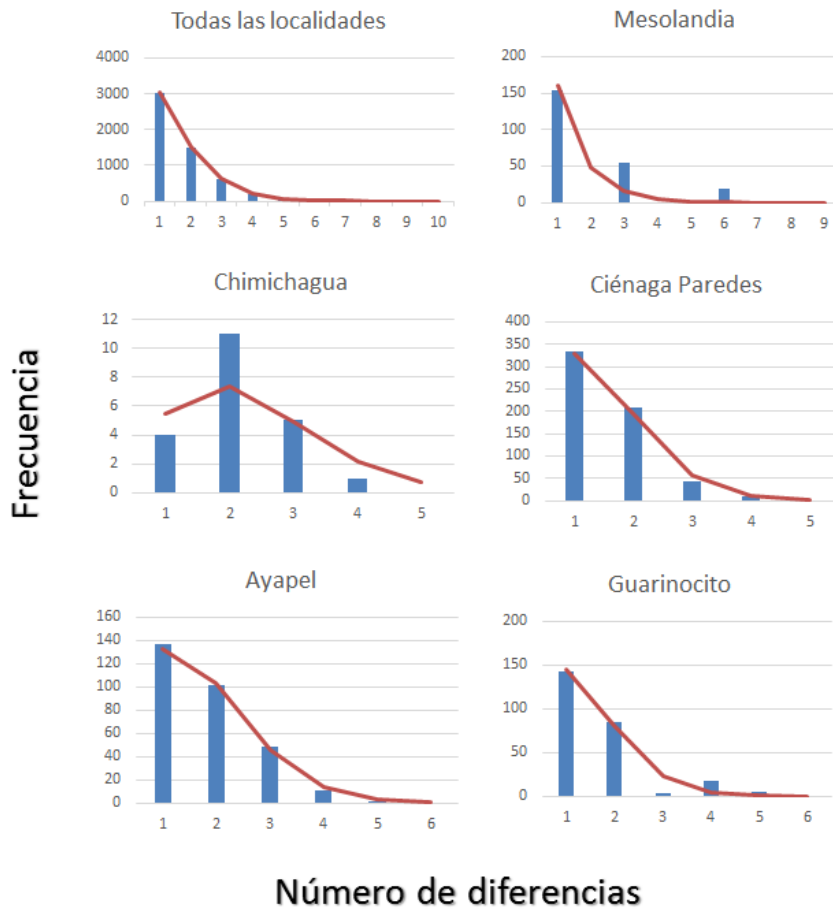


Figura 7. Distribución del número de diferencias pareadas (Mismatches) para *Potamotrygon magdalenae*. Las comparaciones se realizaron para todas las muestras y para cada una de las localidades. Las barras azules son los valores observados y la línea naranja los valores esperados bajo el modelo de expansión.

Las pruebas de neutralidad (D de Tajima's y Fu's) fueron negativas y estadísticamente significativas para el total de las muestras y para la mayoría de las localidades, indicando una expansión poblacional y un exceso de mutaciones de baja frecuencia, en relación con lo que se espera bajo un modelo neutral (por ejemplo, una estricta neutralidad selectiva de variantes y tamaño constante de la población).

Tabla 7. Pruebas de neutralidad Tajima's, Fu's y SSD, para las localidades de muestreo de *P. magdalenae*. ($p = 0.005$)

Localidad	Tajima's	P	Fu's	P	SSD	P
Mesolandia	-1.819	0.015	0.041	0.496	0.035	0.423
Chimichagua	-0.301	0.378	-1.216	0.075	0.036	0.307
Ayapel	-1.991	0.007	-5.510	0.000	0.000	0.916
Paredes	-1.734	0.017	-3.456	0.006	0.001	0.486
Guarinocito	-1.475	0.091	-0.852	0.232	0.008	0.014
Todas las localidades	-2.336	0.001	-23.114	0.000	0.002	0.840

El perfil demográfico bayesiano para inferir fluctuaciones en el tamaño de la población a través del tiempo mostró una tendencia constante durante los últimos 40.000 años, con un leve incremento sostenido en los últimos 10.000 años (Figura 8).

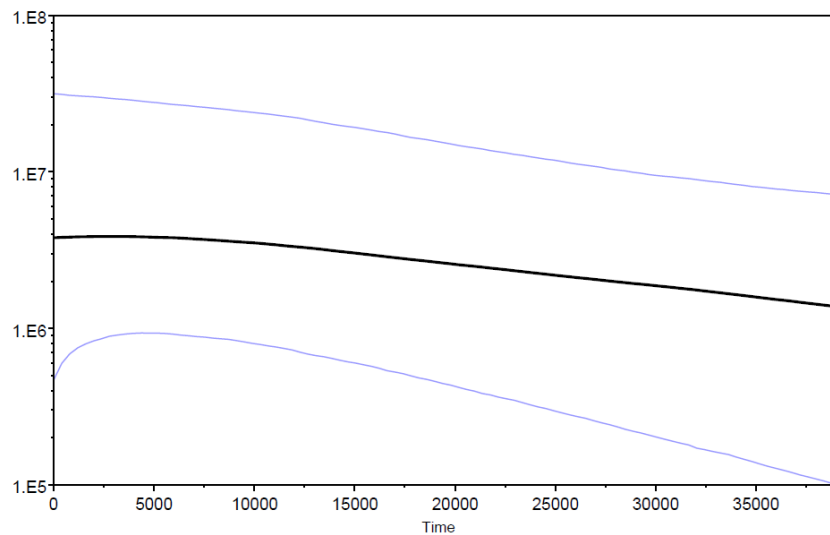


Figura 8. Perfil demográfico bayesiano del tamaño efectivo poblacional. La línea negra es la estimación promedio, las líneas en gris muestran los intervalos de confianza al 95 %.

Respecto al tamaño efectivo se observa tres tipos de tamaño: alto para las localidades de Chimichagua y Ayapel, medio para Mesolandia y Paredes y bajo para Guarinocito. Los valores de número de migrantes (N_m) variaron de un mínimo de 0.46 entre las localidades de Paredes y Guarinocito y un máximo de 35.14 entre Guarinocito y Paredes. Se puede describir tres niveles de flujo genético, bajos (<1), intermedios ($>1 - 20$) y altos (> 25) (Tabla 8).

Con el gráfico circular del flujo de migrantes, se visualiza el intercambio de inmigrantes entre las localidades estudiadas, apoyando la validez de los datos de la tabla 8. Guarinocito mostró valores bajos como localidad receptora de inmigrantes, mientras que en Mesolandia, Chimichagua y Paredes se detectaron flujos genéticos intermedios de inmigrantes de todas las localidades. Ayapel por su parte recibió altas tasas de inmigrantes destacando las provenientes de Mesolandia y Guarinocito (Figura 9).

Tabla 8. Valores de tamaño efectivo poblacional (N_e) y migrantes efectivos por punto de muestreo (N_m) a partir de estimadores Θ y M calculados en Migrate, asumiendo una tasa de mutación de $\mu=1 \times 10^{-8}$. En la diagonal superior se encuentran las localidades emisoras de migrantes y en la inferior las

Localidad	N_e	N_m				
		Mesolandia	Chimichagua	Ayapel	Paredes	Guarinocito
Mesolandia +	1.252.333		6.21	18.60	6.28	7.98
Chimichagua +	3.646.667	19.22		17.49	20.24	22.51
Ayapel +	4.976.000	31.10	25.82		28.41	35.14
Paredes +	1.762.000	10.17	9.38	8.86		12.05
Guarinocito +	113.667	0.50	0.47	0.48	0.46	

localidades receptoras de migrantes de *P. magdalenae*.

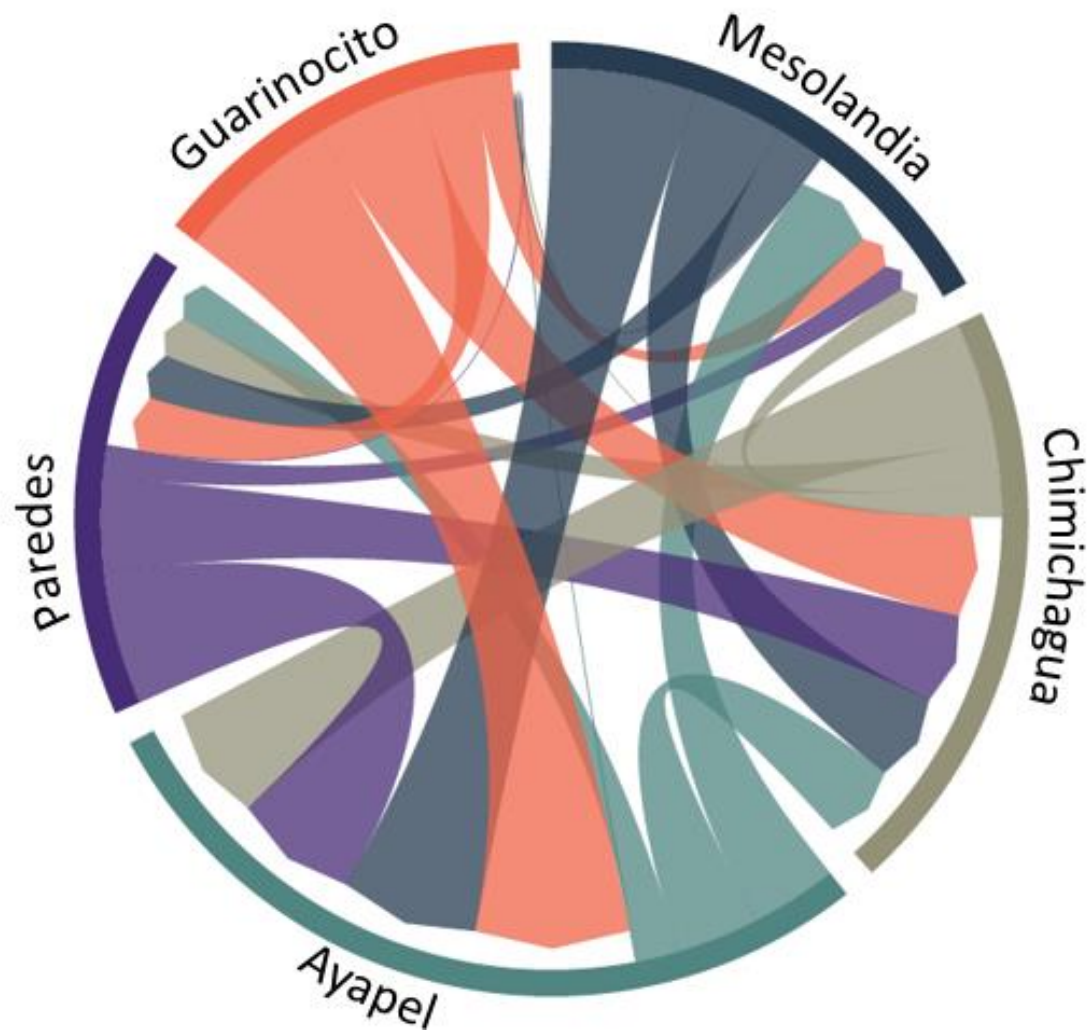


Figura 9. Gráfico circular del flujo de migrantes entre las localidades, a partir de m calculados con el software MIGRATE, el ancho de las curvas de migración indica la cantidad de migración

IX. DISCUSIÓN

En este estudio, se presenta la primera evaluación de la diversidad genética de *Potamotrygon magdalenae* en la cuenca del río Magdalena, Colombia, con el fin de aportar datos que apoyen la existencia de heterogeneidad genética de esta especie endémica en la cuenca del Magdalena.

9.1. Análisis Genético

En términos de diversidad genética, las estimaciones efectuadas para *P. magdalenae* fueron similares entre las localidades muestreadas al igual que al agruparse en Bajo y Medio Magdalena. Los niveles de diversidad mitocondrial de *P. magdalenae* en la cuenca del río Magdalena fueron bajos, pero no atípica de peces cartilaginosos (Heist, 2004; Sandoval-Castillo *et al.*, 2004; Duncan *et al.*, 2006; Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares, 2011; Puckridge *et al.*, 2013), confirmando así, que al igual que en elasmobranquios marinos, la tasa de sustitución de genes mitocondriales en peces cartilaginosos es de siete a ocho veces más lenta que otros vertebrados, probablemente debida a tasas metabólicas bajas (Martin *et al.*, 1992; Martin y Palumbi, 1993).

Los resultados del presente estudio son similares a otros trabajos de genética de poblaciones en especies del mismo género, como es el caso de Tofolli (2006), quien trabajó con el gen ATPase 6 y 8 en *P. motoro*, *P. orbigny* y *P. scobina*; Cruz (2013), reporta valores cercanos a los del presente estudio para *P. motoro* y *P. falkneri* con el gen D-loop y valores más bajos con los genes Cytb y ATPase 6 y 8. Mientras que, Federico *et al.* (2012), en *Paratrygon aiereba* con el gen ATPase 6 reporta un valor más alto, probablemente éste sea un indicativo de que las frecuencias haplotípicas para ATPase 6/8 en rayas de la cuenca del Río Paraná sean más conservadas y que estas poblaciones todavía estén en proceso de diferenciación genética.

A pesar de que la variación del gen COI tiene un patrón de diversidad bajo como la que se observa en *P. motoro* y *P. falkneri* (Cruz, 2013), lo que no se refleja en las tasas diferenciales de evolución entre el D-loop no codificante y el gen estructural COI.

No obstante, no es la primera vez que se encuentran valores bajos para el gen D-loop en una especie de batoideo y siendo comparable con las que se encuentran en *Raja asterias* y *R. miraletus* en el Mediterráneo (Valsecchi *et al.*, 2005). En contraste, Puckridge *et al.* (2013) con el gen COI para Dasyatidae y otros peces óseos de la cuenca del río Magdalena han presentado valores cercanos a 1 (Aguirre *et al.*, 2013) (Tabla 9).

Cabe destacar que los genes del ADN mitocondrial no sólo difieren en los niveles de diversidad molecular, sino también en sus patrones de variación geográfica; por lo tanto, es prematuro concluir qué región geográfica es genéticamente menos diversa (Tabla 2). Las diferencias de diversidad genética presentadas en este estudio entre localidades, pueden estar relacionadas con su origen geográfico dentro de la cuenca del Magdalena, ya que pueden estar influenciadas por barreras físico-hidrográficas (limitando el flujo genético) y por efectos de la deriva genética.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el número limitado de muestras obliga a interpretar con cautela los marcadores empleados y los resultados obtenidos de diversidad en las poblaciones, ya que la evolución de las secuencias opera a distintos niveles en el genoma, en los linajes y en el tiempo, influido además por el tamaño de los organismos, el tiempo generacional y la tasa metabólica (Martin, 1999).

Tabla 9. Estimadores de diversidad genética en diferentes especies, donde: **Hd**: la diversidad haplotípica, **π** : diversidad nucleotídica, **N**: número de secuencias, **h**: número de haplotipos.

	Especie	Localidad	Gen	Hd	π	N	h
Este estudio	<i>Potamotrygon magdalenae</i>	Río Magdalena	COI	0.474±0.59	0.001±0.0002	112	20
Tofolli (2006)	<i>Potamotrygon motoro</i>	Río Itú (tributario Negro)	ATPase 6 y 8	0.515± 0.052	0.008± 0.004	19	2
	<i>Potamotrygon orbignyi</i>	Alto río Negro (Aiuaná)	ATPase 6 y 8	0.933± 0.122	0.010± 0.006	9	3
	<i>Potamotrygon scobina</i>	Ilha de Marajó (Brasil)	ATPase 6 y 8	0.556 ± 0.165	0.0037 ± 0.002	9	3
Federico et al. (2012)	<i>Paratrygon aiereba</i>	cuena del Amazonas	ATPase 6	1.000±0.0031	0.0349±0.0174	61	59
Cruz (2013)	<i>Potamotrygon motoro</i>	Ilha Solteira –PR	ATPase 6 y 8	0.087	0.0009	31	4
		Ilha Solteira –PR	Cytb	0.214	0.0010	37	5
		Foz do Iguaçu – PR	D-loop	0.405	0.0018	24	8
	<i>Potamotrygon falkneri</i>	Ilha Solteira –PR	ATPase 6 y 8	0.154	0.0009	36	2
		Ilha Solteira –PR	Cytb	0.231	0.0009	36	2
Valsecchi et al. (2005)	<i>Raja asterias</i>	Mediterraneo	D-loop	0.29	0.0092	18	2
	<i>Raja miraletus</i>		D-loop	0.17	0.0031	12	2
Aguirre-Pabón et al. (2013)	<i>Prochilodus magdalenae</i>	Río Magdalena incluyendo tributarios	D-loop	0.997±0.0009	0.0303±0.004	292	233
Barragan (2009)	<i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i>	Río Magdalena	Cytb	1.000	0.00512		
Puckridge et al. (2013)	<i>Dasyatidae</i>	Indo Pacífico occidental	COI	0.963	0.08963	95	48
Keeney et al. (2005)	<i>Carcharhinus limbatus</i>	Golfo de México	D-loop	0.805	0.0021		

Las combinaciones de valores bajos y altos de diversidad haplotípica y nucleotídica, generalmente reflejan diferentes historias demográficas pero ambas están afectadas por eventos demográficos históricos y contemporáneos (Freeland, 2005). Para *P. magdalenae* se obtuvo una alta diversidad haplotípica y una baja diversidad nucleotídica, sugiriendo un evento de cuello de botella seguido de una expansión poblacional aunque también podría indicar que el tamaño efectivo de la población es reducido (Bowen y Avise, 1995; Aris-Brosou y Excoffier, 1996).

Dentro de ADNmt, el número de haplotipos y la diversidad de haplotipos responden más rápido que la diversidad de nucleótidos. Por lo tanto, la diversidad de nucleótidos puede estar más influenciado por factores históricos, como las fluctuaciones en el tamaño de la población, los cuellos de botella, vicarianza, la introgresión, en comparación con otras estadísticas (MCCusker y Bentzen, 2010).

9.2. Estructura poblacional

Los resultados del presente estudio indican la presencia de estructura genética en la población de *P. magdalenae* de las localidades analizadas, aunque con un patrón geográfico complejo. Para la cuenca del Amazonas, Tofolli (2006), encontró que *P. motoro* no forma una población panmíctica, ya que se encontraron diferencias significativas entre diferentes comparaciones entre localidades, pero cuando se agruparon las localidades que están separadas a menos de 100 Km (cuenca media, río Negro), éstas formaron una sola población. Para *P. magdalenae* se agruparon mediante un SAMOVA y AMOVA de diferentes formas en relación a su ubicación geográfica, pero siempre el resultado indicó diferencias genéticas significativas entre y dentro de las poblaciones, teniendo en cuenta que las localidades más cercanas están a una distancia de 262 Km y las más distantes a 879 Km.

Los grupos probados con el análisis AMOVA indican que la varianza no se incrementó al agrupar las localidades, lo cual es coherente con lo que se observó en la red de haplotipos, revelando que son de origen reciente, al presentar pocos pasos mutacionales.

Las estimaciones de diferenciación genética pareadas Φ_{ST} con el marcador COI entre las zonas de muestreo, permitió determinar que la población más divergente fue Guarinocito, la cual se aísla de las otras localidades; esto puede ser debido a que esta localidad mencionada se originó por un cauce del río Magdalena abandonado donde solo hay flujo en época de lluvia (PAI, 2008).

Estos resultados contrastan con el estudio de Cruz (2013), quien trabajó con la región control con miras a detectar estructura genética en dos especies de rayas que invadieron en el año 1982 el río Paraná en Brasil. Este autor encontró que el índice de Φ_{ST} para *P. falkneri* (0.052) fue más significativo comparado con *P. motoro* (0.051), indicando ausencia de estructura poblacional dentro de cada especie a lo largo del río Paraná con marcadores mitocondriales, esto debido a que la colonización de estas especies del río Paraná fue reciente (30 años).

Una posible explicación para los resultados de estructura poblacional del presente trabajo se relaciona con el régimen hidrológico de la cuenca del río Magdalena, determinado por la diversidad del sistema orográfico y las condiciones climáticas que son influenciadas por el desplazamiento de la zona de confluencia intertropical (IDEAM, 2014). Las cinco zonas de estudio pertenecen a sistemas lagunares (Ayapel), ciénagas (Mesolandia, Chimichagua y Paredes) o laguna semi-cerrada (Guarinocito), las cuales se aíslan durante la época seca y por tanto, podrían contener poblaciones diferenciadas genéticamente. Esto concuerda con las barreras estimadas con el programa Barrier 2.2, para este estudio (Figura 5), ya que la dinámica hidrológica del río Magdalena determina la configuración espacio-temporal de los sistemas cenagosos que interactúan con una densa red de caños y corrientes, construyendo un entorno acuático muy activo, que se expande y contrae a lo largo del año, acorde con el régimen de precipitaciones y la variación de nivel que pueden comportarse como barreras (Figura 10) (Villa-Navarro *et al.*, 2006). Las barreras geográficas acentúan la subdivisión poblacional que, en combinación con las capacidades de dispersión de *P. magdalenae* pueden también reducir la panmixia en una o varias subpoblaciones que se encuentren distribuidas en áreas geográficas extensas (Templeton, 1998), y que subsecuentemente actuarían como grupos aislados (aislamiento por distancia).

De la misma forma, Turner *et al.* (2004) apoyan la idea de que el aislamiento geográfico de linajes a través de los drenajes principales, es una parte importante del proceso de especiación en especies de peces óseos. En este sentido, las hipótesis basadas en ADN

mitocondrial del Bocachico (*Prochilodus magdaleneae*) son consistentes con evidencia geológica documentada del surgimiento de la Cordillera Oriental 10 millones de años atrás (Lundberg *et al.*, 1998), como un evento de temprana separación vicariante que aisló las poblaciones de peces en el sistema de la cuenca del río Magdalena.

Entre los elementos más importantes que pueden impedir el intercambio de especies de hábitat dulceacuícola están las barreras naturales, representadas por cadenas montañosas y cuencas hidrográficas. La cordillera de los Andes genera gradientes altitudinales en los sistemas acuáticos así como en la biota asociada a lo largo de la cuenca del río Magdalena (Jiménez-Segura *et al.*, 2010).



Figura 10. Planicies inundables de la cuenca del Magdalena. (Tomado y modificado de IDEAM, 2010).

La parte alta del río Magdalena está influenciada por el régimen climático amazónico y muestra un régimen monomodal con caudales altos (320 m³/s) hacia la mitad del año y los caudales bajos se presentan en julio (77 m³/s). Mientras que en la cuenca media (4.298 m³/s alto y 1.578 m³/s bajo) y baja del Magdalena (6.100 m³/s alto y 2.500 m³/s bajo) tiene un régimen bimodal, con caudales diferentes, registrando valores máximos en mayo y noviembre (IDEAM, 2014). Es posible que los diferentes valores registrados del caudal en las zonas de muestreo afecten en la distribución y el flujo genético de la especie, situación que se refleja en las diferencias observadas entre las localidades con base en los valores de Φ_{ST} .

El IDEAM (2010) reporta que después de recibir los aportes de los ríos Cauca y Cesar, el Magdalena bajo, muestra un régimen bimodal no tan marcado como en el Magdalena medio, en el cual, disminuyen los valores del caudal entre julio y septiembre, condición que podría dar razón a las diferencias encontradas entre las localidades de Mesolandia con Chimichagua, que parecen estar relacionadas con la intervención del brazo de Mompo y desembocadura del río Cesar, de igual manera entre las localidades de Ayapel y Chimichagua, interviene el cauce y la desembocadura del río Cauca, siendo el río Cauca el afluente principal del río Magdalena que desemboca a la altura del municipio de Pinillos (Bolívar), aportando el 32 % del caudal total de la cuenca, debido a estas características podría existir una movilidad restringida entre localidades.

En cuanto a la capacidad de dispersión de las rayas, Garrone-Neto et al. (2014) registran para *P. falkneri* y *P. motoro* largas migraciones y gran capacidad de estas rayas de superar barreras artificiales como las impuestas por hidroeléctricas. Para *P. magdalenae*, no hay estudios de migración; sin embargo, Mejía-Falla et al. (2016), destacan diferentes características ambientales en tres zonas de la cuenca del río Magdalena (alta, media y baja) y su relación con la presencia/ausencia de rayas en las mismas, registrando que prefiere fondos lodosos, en aguas turbias con corrientes de intensidad media, encontrando en mayor proporción en aguas más someras y más cálidas, lo que también podría corroborar la divergencia entre poblaciones al preferir este tipo de hábitats y en algunos casos quedando aisladas unas localidades de otras. Lo anterior podría limitar el flujo genético entre las cuencas y resultar en poblaciones diferenciadas, ya que la variabilidad genética se encontrará distribuida de manera diferencial produciendo un efecto de estructuración genética.

A pesar de lo anterior, no se detectó divergencia genética entre las localidades de Mesolandia y Ayapel ni de Paredes con Chimichagua y Ayapel. Esto podría estar relacionado con las ciénagas, que son terrenos inundables situados en los sectores medio y bajo de las cuencas Magdalena y Cauca, cuyo papel regulador consiste en almacenar las aguas que traen los ríos cuando aumentan su nivel por las lluvias durante el invierno, y dejarlas salir durante las sequías, cuando dicho nivel desciende (Jiménez-Segura *et al.*, 2014). Otro factor que puede influir en detectar señales de divergencia genética es el bajo número de muestras de la localidad de Chimichagua.

En Guarinocito, Gómez-Martínez *et al.* (2014), realizaron un trabajo sobre tolerancia de *P. magdalenae* a altas temperaturas, donde concluyen que es una raya resistente al incremento de temperatura y que actualmente no está siendo afectada por las altas temperaturas registradas en la laguna. No obstante, la especie corre un riesgo al enfrentarse a cambios climáticos a corto plazo como el evento del Niño, el cual genera una disminución del nivel del agua y un aumento de la temperatura de la misma. Si estos factores continúan, la magnitud de adaptación dependerá de la variabilidad genética, la historia de vida y el tiempo generacional, es decir los individuos expuestos a cambios a largo plazo tienen mayor número de generaciones y pueden incrementar la variabilidad genética (Mora y Ospina, 2001).

Considerando que la fragmentación del hábitat es un factor determinante en el establecimiento de la variabilidad genética (Chakravorty y Leimar, 1987; Hartl y Clark, 1989), la interrupción del flujo génico con individuos que hacían parte de un paisaje mucho más amplio y diverso como la cuenca del Magdalena, pudo haber propiciado un proceso de pérdida de diversidad genética, evidencia en los resultados obtenidos.

9.3. Demografía Histórica

Dos de las teorías biogeográficas que han tratado de explicar la distribución actual de las especies son la dispersión y la vicarianza. Es probable que ambos procesos hayan actuado de forma independiente pero con la misma importancia a escalas distintas de tiempo actuando de forma independiente pero con la misma importancia a escalas distintas de tiempo, permitiendo ampliar zonas de distribución de las especies (dispersión)

y fragmentándolas (vicarianza) en el espacio y tiempo (Ronquist, 1997; Crisci, 2001; Posadas *et al.*, 2006).

Los análisis de demografía histórica con el gen COI indican una tendencia de *P. magdalenae* hacia la expansión espacial y/o demográfica. Estos resultados son apoyados por la distribución de las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (*mismatches*), misma que generó histogramas unimodales y sin desviaciones de las expectativas en el marco del modelo de expansión súbita (Rogers y Harpending, 1992).

Con base en estas predicciones y a partir de la red de haplotipos obtenida, es posible sugerir que debido a una colonización progresiva de la cuenca y sus diferentes regiones, para *P. magdalenae* han existido ciclos de expansión precedidos de un efecto fundador, por lo que la colonización en la parte alta de la cuenca ha sido gradual en la que un grupo de individuos se desprenden de una población principal o de mayor tamaño en la parte baja y por tanto contienen una pequeña muestra de la diversidad de la población de la que provienen, al colonizar un nuevo espacio a partir de esos individuos y al estar sujeto a los efectos de la deriva, se diferencia de la población de origen, pero contiene el haplotipo ancestral. Lo anterior genera una señal de diferenciación entre poblaciones próximas o aledañas. Esto concuerda con la hipótesis de Lovejoy (1996), la cual considera que las rayas de río invadieron América del Sur desde el norte, por el Caribe, durante una de las introgresiones marinas de la zona, en el Mioceno tardío, evidenciado por depósitos marinos en las cuencas del norte de Ecuador, Colombia, Venezuela y las Guyanas (Figura 11) (Harrington, 1962; Bellizzia y Munoz, 1981; Megard, 1989; Hoorn, 1994a, b). Por lo anterior y desde un punto evolutivo, podemos suponer que la raya del río Magdalena ha sufrido procesos de fragmentación espacial a diferentes escalas de tiempo, debido a los fenómenos de vicarianza, promoviendo el aislamiento e interrupción de flujo genético entre sus poblaciones.

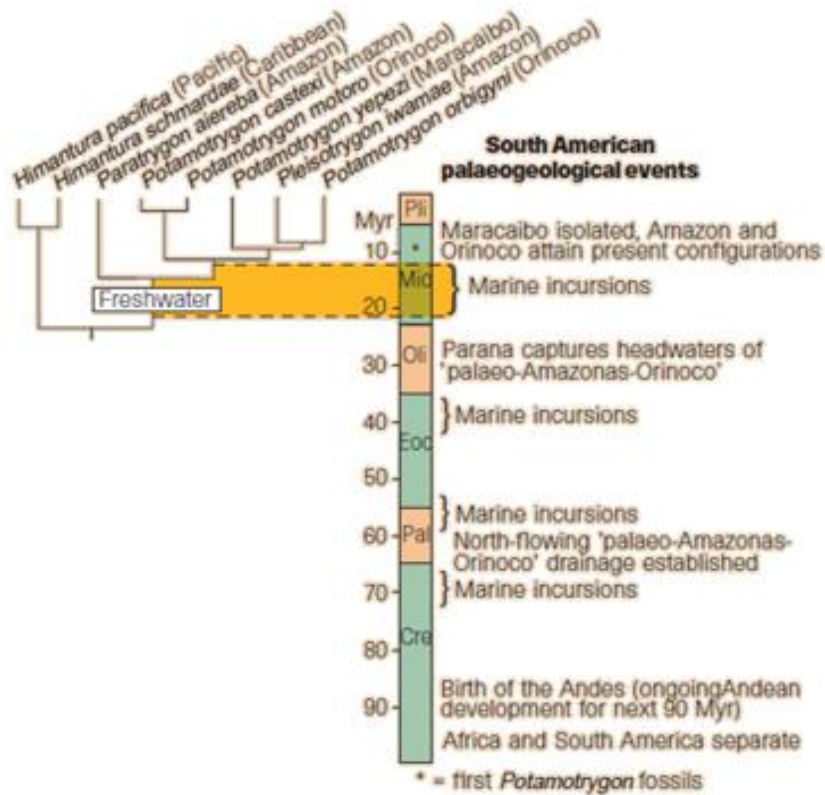


Figura 11. Hipótesis filogenética para las rayas de agua dulce con su pariente marino más cercano, y calendario de los eventos paleogeológicos en Sur América. (Tomado y modificado de Lovejoy *et al.*, 1998).

La señal de divergencia observada puede deberse al confinamiento en las zonas, por preferencia de hábitat o condiciones ambientales, resultando en una conectividad disminuida entre las poblaciones, debido al largo tiempo de residencia de algunas rayas en esas áreas. La disminución de los tamaños poblacionales concuerda con la baja o nula diversidad observada en las poblaciones de las localidades de Mesolandia, Paredes y Guarinocito en la cuenca del río Magdalena. De manera similar, las pruebas de neutralidad (D de Tajima y F_s de Fu) mostraron valores negativos que indican desviaciones de la neutralidad debidas a expansión demográfica (Tajima, 1989).

Una de las ventajas de utilizar un método como el de máxima verosimilitud para calcular las tasas de migración (MIGRATE) es que emplea algoritmos que no asumen que todas las poblaciones han sido muestreadas (Berli y Felsentein, 1999; Beerli, 2004). Los resultados obtenidos en este análisis concuerdan con los análisis de estructura poblacional, destacando que la localidad que está más al sur (Guarinocito) presenta un

flujo genético asimétrico y por ende se aísla, obteniendo la baja tasa de migrantes provenientes de otras localidades. De la misma manera, se observa con los datos de N_m , que la dispersión de esta especie es más fácil de norte a sur hasta la localidad de Ayapel, por ende también se ve reflejado en el número de haplotipos únicos para esta localidad.

Un aspecto importante a resaltar, es que los valores de flujo genético se han relacionado con la densidad de las poblaciones, en donde se señala que existe una relación directa entre el tamaño efectivo poblacional pequeño y el flujo genético reducido (Knutsen *et al.*, 2003). Estas evidencias apoyan los resultados observados de *P. magdalenae* en la localidad de Guarinocito, la cual presentó valores muy bajos de N_e , contrario a los resultados en las localidades de Ayapel y Chimichagua.

De acuerdo a Frankham *et al.* (2004) el tamaño efectivo poblacional calculado por métodos indirectos representa aproximadamente el 11% del tamaño real de la población, por lo que la abundancia total de *P. magdalenae* en las zonas de muestreo de la cuenca del río Magdalena sería en la localidad de Ayapel de 45.236.363 y en Guarinocito de 1.033.336. Sin embargo, es necesario desarrollar investigaciones que permitan profundizar sobre la dinámica de las poblaciones de la Raya del Magdalena para confirmar los resultados obtenidos a partir de las estimaciones indirectas del tamaño efectivo de las poblaciones.

9.4 Implicaciones para la conservación de *Potamotrygon magdalenae*

La biodiversidad de peces de agua dulce ha disminuido más rápidamente que la biodiversidad terrestre y marina en las últimas décadas (Jenkins, 2003). Hasta el 75% de las especies de peces de agua dulce que se producen en ríos con caudal reducido, podrían extinguirse en 2070 debido al cambio climático y a la extracción de agua (Xenopoulos *et al.*, 2005).

En los últimos diez años se han aumentado las amenazas a los peces dulceacuícolas, debido principalmente a la contaminación, deforestación y a la sobreexplotación pesquera. Es así como para las cuencas de los ríos Magdalena, Orinoco y Amazonas se registran signos claros y preocupantes de una fuerte declinación en sus pesquerías; la cuenca del Magdalena registra un descenso cercano al 90% de las capturas en los últimos 40 años, pasando de 80.000 toneladas anuales en la década de 1970 a menos de 10.000 a finales del siglo pasado (Galvis y Mojica, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2011).

En la cuenca del Magdalena se registra la presencia de la única raya dulceacuícola endémica para el país, la raya del Magdalena (*Potamotrygon magdalenae*), la cual fue considerada como una especie con prioridad de acción muy alta en el Plan de acción nacional para la conservación y manejo de tiburones, rayas y quimeras de Colombia (Caldas *et al.*, 2010), y posteriormente, en el libro rojo de peces dulceacuícolas fue evaluada como Casi Amenazada (NT; Lasso *et al.*, 2012), haciéndose necesario realizar estudios en torno a la misma.

Recientemente Mejía-Falla *et al.* (2016), Registraron una ampliaron en la distribución de *P. magdalenae* a lo largo del río Magdalena, también confirman la pesca con fines ornamentales la cual se restringe a pocos cuerpos de agua en la parte baja del río, como el embalse del Guájaro (entre los municipios de Repelón y Sabanalarga) y la ciénaga de la Bahía o Mesolandia (entre los municipios de Soledad y Malambo), ambos en el departamento del Atlántico. Los individuos como recurso ornamental corresponden principalmente a juveniles, mientras aquellos para consumo, aunque ocasional, corresponden a individuos adultos.

Este trabajo representa el primer trabajo con herramientas moleculares, en el cual se estudia un número considerable de localidades ampliamente distribuidas en la cuenca del Magdalena que brindan información sobre la conectividad genética en el río, así como de estimaciones de los tamaños efectivos poblacionales y proporción de migrantes para la raya endémica *P. magdalenae*. La especie actualmente está sometida a numerosos problemas ambientales y antrópicos a lo largo de su distribución, derivados de la deforestación, erosión, desecación de humedales, contaminación por residuos sólidos y líquidos. Incluso, problemas de sequía en varias regiones de la cuenca, los cuales afectan cuerpos de agua donde la especie habita, han llevado a la ausencia local de individuos de la especie, e incluso al traslado de individuos entre cuerpos de agua por parte de pescadores de la cuenca baja del Magdalena (Mejía-Falla *et al.*, 2016)

Los cambios climáticos graduales así como los fenómenos extremos, probablemente afectan a las poblaciones de peces de agua dulce, resultando en drásticas reducciones y/o cambios en los rangos de distribución de las especies, en la estructura de las comunidades y en las historias de vida de las poblaciones, que en última instancia pueden conducir a la extinción (Lawrence y Bonada, 2013).

Estos resultados pueden servir de base para entidades competentes en la toma de decisiones relacionadas con el adecuado manejo del recurso, ya que se ha confirmado una divergencia genética a lo largo de la cuenca, sumado a los diferentes factores anteriormente mencionados que pueden traer consecuencias a futuro para esta especie, además es necesario desarrollar más investigaciones sobre su biología, ecología y aspectos relacionados con su explotación y conservación como recursos pesqueros de importancia comercial.

Es necesario resaltar la necesidad de utilizar herramientas como los loci microsatelitales, con el fin de establecer la relación genética intra e inter específica entre las poblaciones y utilizar otros marcadores con diferentes tasas de mutación y tipo de herencia. Así mismo, contar con un mayor rango de cobertura espacial y temporal, y mayor tamaño de muestra. Lo anterior, permitirá un acercamiento más completo y contundente sobre el estado y la estructura poblacional de *P. magdalenae*, que guiara a conclusiones más contundentes y a afianzar proyectos de manejo y conservación.

X. CONCLUSIONES

- En las cinco localidades estudiadas se confirma la presencia de *P. magdalenae* mediante la amplificación del COI del ADNmt, encontrando 22 sitios polimórficos (S), los cuales representaron 20 haplotipos (h).
- *Potamotrygon magdalenae* no está constituida por una población panmíctica en las localidades muestreadas, se detectaron estimaciones de diferenciación genética entre localidades, la cual está relacionada con un patrón geográfico complejo (el régimen hidrológico y orográfico) de la cuenca del río Magdalena.
- La población más divergente fue Guarinocito, la cual se aísla de las otras localidades, porque es una laguna semi-cerrada que se originó por un cauce del río Magdalena abandonado y donde sólo hay flujo en época de lluvia.
- No se detectó un aislamiento por distancia estadísticamente significativa, debido a la tasa asimétrica de migrantes entre localidades.
- Los análisis de demografía histórica con el gen COI indican una tendencia hacia la expansión espacial y demográfica. Los valores de flujo genético y tamaño efectivo poblacional fueron altos en la localidad de Ayapel y muy bajos en Guarinocito, concordando con los resultados obtenidos de estructura poblacional.

XII. BIBLIOGRAFIA

- Aguirre JC, Narváez JC y Castro LR. 2013. Mitochondrial DNA variation of the bocachico *Prochilodus magdalenae* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Magdalena River Basin, Colombia. *Aquat Conserv* 23:594-605.
- Albert, J. S., N. R. Lovejoy y W. G. R. Crampton. 2006. Miocene tectonism and the separation of cis-and trans-Andean river basins: evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences* 21: 14–27.
- Almeida, M. P. 2008. História natural das raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na ilha de Marajó (Pará-Brasil). Tesis Doctoral, Museu Paraense Emílio Goeldi, Universidade Federal do Pará, Belém. 64 pp.
- Araújo, M. L. G., Charvet-Almeida, P., Almeida, M. P., y Pereira, H. 2004. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document AC, 20, 1-6.
- Arbogast, B. S. y Kenagy, G. J. 2001, Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28: 819–825. doi:10.1046/j.1365-2699.2001.00594.x
- Arias, P. 1985. Las ciénagas de Colombia. *Revista Divulgación Pesquera Inderena* 22: 39-70.
- Aris-Brosou S. y L. Excoffier. 1996. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution*. 13:494-504. (reprint).
- Avise, J. 2008. *Clonality: the genetics, ecology, and evolution of sexual abstinence in vertebrate animals*. Oxford University Press.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., y Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 489-522.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Barragán de los Ríos, M. M. 2009. Datos preliminares de la sistemática molecular de la especie *Pseudoplatystoma Magdaleniatum* (Teleostei: Pimelodidae) del Rio Magdalena, Colombia (Bachelor's thesis).
- Berli, P. 2004. Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. *Molecular Ecology*, 13(4), 827-836.
- Berli, P., Y Felsenstein, J. 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, 152(2), 763-773.

Bellizzia, A., y Pimentel, N. 1994. Terreno Merida: Un Cinturon Aloctono Herciniano en la Cordillera de los Andes de Venezuela Mérida Terrane: An allochthonous Hercynian Belt in the Andes of Venezuela. *Biology and Fisheries*, 11, 301-319.

Bowen, W. y J. Avise. 1995. Conservation genetics of marine turtles. 190-237. En: Avise, J. y J. Hamrick (Eds.).

Brito, P. M., y Deynat, P. P. 2004. Freshwater stingrays from the Miocene of South America with comments on the rise of potamotrygonids (Batoidea, Myliobatiformes). Recent advances in the origin and early radiation of vertebrates. Dr. Friedrich Pfeil, Munich, 575-582.

Brooks, D. R., T. B. Thorson y M. A. Mayes. 1981. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae) and their helminth parasites: testing hypotheses of evolution and coevolution. Pp. 147–175. En: Funk, V. A. y D. R. Brooks (Eds.). *Advances in cladistics, Proceedings of the First Meeting of the Willi Hennig Society*. New York Botanical Garden, New York, USA.

Caldas, J.P., E. Castro-González, V. Puentes, M. Rueda, C. Lasso, L.O. Duarte, M. Grijalba-Bendeck, F. Gómez, A.F. Navia, P.A. Mejía-Falla, S. Bessudo, M.C. Diazgranados y L.A. Zapata Padilla (Eds.). 2010. Plan de Acción Nacional para la Conservación y Manejo de Tiburones, Rayas y Quimeras de Colombia (PAN-Tiburones Colombia). Instituto Colombiano Agropecuario, Secretaria Agricultura y Pesca San Andrés Isla, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras, Instituto Alexander Von Humboldt, Universidad del Magdalena, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Pontificia Universidad Javeriana, Fundación SQUALUS, Fundación Malpelo y otros Ecosistemas Marinos, Conservación Internacional, WWF Colombia. Editorial Produmedios, Bogotá. 60 p.

Carvalho, M. R. y N. R. Lovejoy. 2011. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa* 2776: 13-48.

Carvalho, M. R., J. G. Maisey y L. Grande. 2004. Freshwater stingrays of the Green River Formation of Wyoming (Early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 284: 1–136.

Castaño Uribe, C. 2003. El Río Grande La Magdalena. Banco de Occidente. <http://imeditores.com/banocc/rio/cap4.htm>

Castelblanco, N., V. Holguín y J. M. Zapata. 2005. Conservación y manejo del manatí en la ciénaga de Paredes (Santander). Pp. 105-113. En: MAVDT y Fundación Omacha. Programa nacional de manejo y conservación de manatíes en Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y Fundación Omacha. Bogotá, Colombia. 175 pp.

Castex, M. N. 1963. La Raya Fluvial - Notas Histórico-Geográficas. Santa Fé, Librería y Editorial Castellví S.A., 119p.

Charvet-Almeida, P. y M. Pinto. 2004. *Potamotrygon magdalenae*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. (www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/161385/0).

Compagno, L. J. V., y Cook, S. F. 1995. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences*[J. AQUARICULT. AQUAT. SCI.]. Conservation genetics: Case histories from nature. Columbia Univ. Press, Nueva York. 56 p

CORMAGDALENA. 2005. Manual del Río Magdalena, Bogotá.

Corporación Autónoma Regional del Atlántico. 2011. Formulario de información relacionada con el cobro de las tasas por utilización de agua y el estado de los recursos hídricos (TUA). Bogotá: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

Coyne, J. 1994. Mayr, Ernst and the origin of the species. *Evolution* 48:19-30 p.

Crisci, J. V. 2001. The voice of historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28(2), 157-168.

Cruickshank R. 2002. Molecular markers for phylogenetics of mites and ticks. *Systematic and Applied Acarology* 7: 3-14.

Cruz VP, Mendes NJ, Mendonça FF, Pardo BG, Vera M, Martinez P, Oliveira C y Foresti F. 2013. Development of microsatellite markers by high-throughput pyrosequencing in the freshwater stingray (*Potamotrygon motoro*) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Resources* 13(3): 546-549.

Dahl, G. 1971. Los peces del norte de Colombia. Ministerio de Agricultura, Instituto de Desarrollo de los Recursos Naturales Renovables (INDERENA). Talleres Litografía Arco. Bogotá D.C., Colombia. 391 pp.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., y Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772-772.

De Carvalho, M. R., N. Lovejoy y R. Rosa. 2003. Family Potamotrygonidae (River stingrays). Pp 22-28. En: Reis, R., S. Kullander y C. Ferraris (Eds). *Chek List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre.

De Carvalho, M. R., Sabaj Pérez, M. H., Lovejoy, N. R. 2011. *Potamotrygon tigrina*, a new species of freshwater stingray from the upper Amazon basin, closely related to *Potamotrygon schroederi* Fernandez-Yépez, 1958 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa* 2827: 1-30.

De Carvalho, M. R., y Lovejoy, N. R. 2011. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, (2776), 48.

Dingerkus, G. 1995. Relationships of potamotrygonin stingrays (Chondrichthyes: Batiformes: Myliobatidae). En: Oetinger, M. I. y G. D. Zorzi (Eds.). *The biology of freshwater elasmobranchs, a symposium to honor Thomas B. Thorson*. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences* 7: 32-37.

Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B. E. T. H., y Pybus, O. G. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution*, 22(5), 1185-1192.

Drummond, A. J., y Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 214.

Duméril, A. H. A. 1865. *Histoire naturelle des poissons: ou, Ichthyologie générale* (Vol. 1). Roret.

Duncan, K. M., Martin, A. P., Bowen, B. W., y De Couet, H. G. 2006. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular ecology*, 15(8), 2239-2251.

Dunn, K. A., J. D. McEachran y R. L. Honeycutt. 2003. Molecular phylogenetics of myliobatiform fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with comments on the effects of missing data on parsimony and likelihood. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27 (2): 259-270.

Dupanloup, I., Schneider, S., y Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12), 2571-2581.

- Eguiarte, E., Souza, V. y Aguirre, X. 2007. Ecología molecular. México, D.F.: SEMARNAT.
- Eguiarte, L. E., Larson-Guerra, J. O. R. G. E., Nuñez-Farfán, J. U. A. N., Martínez-Palacios, A., Del Prado, K. S., y Arita, H. T. 1999. Diversidad filogenética y conservación: ejemplos a diferentes escalas y una propuesta a nivel poblacional para *Agave victoriae-reginae* en el desierto de Chihuahua, México. *Revista Chilena de Historia Natural*, 72(4), 475-492.
- Excoffier L, Smouse P. and Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier, L., Foll, M., y Petit, R. J. 2009. Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 481-501.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Filipe, A. F., Lawrence, J. E., & Bonada, N. 2013. Vulnerability of stream biota to climate change in mediterranean climate regions: a synthesis of ecological responses and conservation challenges. *Hydrobiologia*, 719(1), 331-351.
- Frankham R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: A review. *Genetical Research*. 66:95-107.
- Frankham, R., Ballou, J. D., y Briscoe, D. A. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press.
- Frederico RG, Farias IP, Araújo MLG, Charvet-Almeida P, Alves-Gomes JA. 2012. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) Neotropical Ichthyology, 10(1): 71-80.
- Freeland, J. R., 2005. Molecular ecology. John Wiley y Sons, England.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- Galvis, G., Mojica, J. I., y Camargo, M. 1997. Peces del Catatumbo. Asociación Cravo Norte.
- Galvis, G., & Iván Mojica, J. 2007. The Magdalena River fresh water fishes and fisheries. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 10(2), 127-139.
- Garcia, G., G. Wlasiuk y E. Lessa. 2000. High levels of mitochondrial Cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 129: 93-110.
- Garcia, L. y E. Dister. 1990. La planicie de inundación del Medio-Bajo Magdalena: restauración y conservación de hábitats. *Interciencia* 15: 396-410.
- García-Villamil, D. 2012. Molecular systematics of the freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) of the Amazon, Orinoco, Magdalena, Essequibo, Caribe and Maracaibo basins (Colombia-Venezuela): evidence from mitochondrial genes. Tesis de Maestría, Universidad de los Andes, Bogotá. 32 p.
- Garman, S. 1877. On the pelvis and external sexual organs of selachians, with special reference to the new genera *Potamotrygon* and *Disceus*. In *Proceedings of the Boston Society of natural History*(Vol. 19, pp. 197-215).

- Garrone-Neto, D. & I. Sazima. 2009a. Stirring, charging, and picking: hunting tactics of potamotrygonid rays in the upper Paraná River. *Neotropical Ichthyology*, 7: 113-116.
- Garrone-Neto, D. & I. Sazima. 2009b. The more stirring the better: cichlid fishes associate with foraging potamotrygonid rays. *Neotropical Ichthyology*, 7: 499-501.
- Garrone-Neto, D. & V. Haddad Jr. 2010. Arraias em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43: 82-88.
- Garrone-Neto, D., Haddad Jr., V., Vilela, M.J.A. & Uieda, V.S. 2007. Occurrence record of two potamotrygonid species in the Upper Paraná River and some aspects about their biology. *Biota Neotrop.* vol. 7, no. 1. ISSN 1676- 0603.
- Garrone-Neto, D, Haddad Jr. y Bismarck Fazzano Gadig. 2014. Record of ascending passage of potamotrygonid stingrays through navigation locks: implications for the management of non-native species in the Upper Paraná River basin, Southeastern Brazil. *Management of Biological Invasions (2014) Volume 5, Issue 2: 113–119.*
- Gómez-Martínez, D., P. A. Mejía-Falla y E. Londoño-Cruz. 2014. Evaluación experimental de la tolerancia de la raya de río *Potamotrygon magdalenae* a altas temperaturas. Tesis de Biología, Universidad del Valle, Cali. 33 pp.
- Gracia L, Marrugo JL, Alvis EM. 2009. Contaminación por mercurio en humanos y peces en el municipio de Ayapel, Córdoba, Colombia. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* 2010; 28(2): 118-124.
- Grijalva-Chon, J. M., A. Kaichi, K. Numachi. 2003. Baja variabilidad genética en dos muestras de Tiburón angelito (*Squatina californica*) del pacífico. Reporte técnico. 1-17.
- Guillot, G., R. Leblois, A. Coulon y A. C. Frantz. 2009. Statistical methods in spatial genetics. *Molecular Ecology* 18:4734-4756.
- Guzmán, Héctor. 2005. "Aspectos históricos y técnicos del río Magdalena: una visión sobre experiencias en el río", *Hojas Universitarias*, N° 57, agosto 2005, pp. 35-44.
- Haddad Jr. V, Cardoso JL, Garrone-Neto D. 2013. Injuries by marine and freshwater stingrays: history, clinical aspects of the envenomations and current status of a neglected problema in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 19: 16.
- Haig, S. M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*. *Ecology*, v. 79, no. 2, p. 413-425. Catalog No: 86.
- Hamilton, M. 2009. *Population Genetics*. Hong Kong: wiley-Blackwell.
- Harrington, H. J. 1962. Paleogeographic development of South America. *AAPG Bulletin*, 46(10), 1773-1814.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1989. *Principles of population genetics*, second edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 682 p.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1), S96-S99.

Hedrick P.W. 2001. Conservation genetics: where are we now? Trends in Ecology & Evolution. 16:629-636.

Hedrick, P. W. 2012. What is the evidence for heterozygote advantage selection ?. Trends in ecology & evolution, 27(12), 698-704.

Hedrick, P. W., & Hurt, C. R. 2012. Conservation genetics and evolution in an endangered species: research in Sonoran topminnows. Evolutionary applications, 5(8), 806-819.

Heist, E. J. 2004. Genetics of sharks, skates and rays. Biology of Sharks and their Relatives, 471-485.

Hernandez, J. y Maritnez, D. 2011. Modelación Hidrodinámica Y De La Calidad Del Agua Para La Evaluación Ambiental De Vertimientos Generados A La Ciénaga Mesolandia, Atlántico - Colombia. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad de la Costa.

Holden, M. J. 1974. Problems in the rational exploitation of elasmobranch population and some suggested solutions. PP. 117-137. In: Harden-jones, F. R. (Ed). Sea Fisheries Research. Jhon Wiley y Sons, New York.

Hoorn C. 1994. An environmental reconstruction of the palaeo-Amazon river system (Middle to Late Miocene, NW Amazonia). Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 112: 187 – 238.

Hoorn C. 1994a. Miocene palynostratigraphy and paleoenvironments of northwestern Amazonia: evidence for marine incursions and the influence of Andean tectonics. Unpublished. Ph.D. Dissertation, Free University of Amsterdam.156.p.

Hoorn, C. 1994b. Fluvial palaeoenvironments in the intracratonic Amazon Basin (Early Miocene to early Middle Miocene, Colombia). Palaeogeogr. Palaeoclim., Palaeoecol., 109: 1-55.

Hoy M. 1994. Insect molecular genetics. Academic Press Inc. pp. 546.

Hubert N Y Renno Jf. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. J Biogeogr; 33(8):1414-1436.

Hubert N, Duponchelle F, Nuñez J, Garcíadávila C, Paugy D, Renno Jf. 2007a. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. Mol Ecol;16(10):2115-2136.

Hubert N, Duponchelle F, Nuñez J, Rivera R, Bonhomme F, Renno Jf. 2007b Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. Mol Ecol;16(12):2488-2503.

Incoder 2012. Estadísticas de exportación de especies de la familia Potamotrygonidae (2007-2011).

Jiménez-Segura, L. F., Carvajal-Quintero, J. D., & Aguirre, N. 2010. Las ciénagas como hábitat para los peces: estudio de caso en la ciénaga de ayapel (córdoba), Colombia/riverine floodplain lakes as habitat for freshwater fishes: a case study in the ayapel floodplain lake (córdoba), Colombia. Actualidades Biológicas, 32(92), 53.

Jiménez-Segura, L. F., R. Álvarez-León, F. Gutiérrez-Bonilla, S. Hernández, M. Valderrama- Barco y F. Villa-Navarro. 2011. La pesca y los recursos pesqueros en los embalses colombianos. Capítulo 7.2. Pp. 233-281. En: Lasso, C. A., F. de P. Gutiérrez, M. A. Morales-Betancourt, E. Agudelo, H. Ramírez-Gil y R. E. Ajiaco-Martínez (Eds.). II. Pesquerías continentales de Colombia: cuencas del Magdalena-Cauca, Sinú, Canalete, Atrato, Orinoco, Amazonas y vertiente del Pacífico. Serie

Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia.

Jiménez-Segura, L. F., Restrepo-Santamaría, D., López-Casas, S., Delgado, J., Valderrama, M., Álvarez, J., & Gómez, D. 2014. Ictiofauna y desarrollo del sector hidroeléctrico en la cuenca del río Magdalena-Cauca, Colombia. *Biota Colombiana*, 15(2), 3-25.

Kambhampati, S y Smith P.T. 1995. PCR primers for the application of four insect mitochondrial gene fragments. *Insec Molecular Biology*. 4 (4), 233-236.

Kelly, R. P., & Palumbi, S. R. 2010. Genetic structure among 50 species of the northeastern Pacific rocky intertidal community. *PLoS One*, 5(1), e8594.

Knowles, L. L., & Maddison, W. P. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*, 11(12), 2623-2635.

Knutsen, H., Jorde, P. E., André, C., & Stenseth, N. C. H. R. 2003. Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Molecular ecology*, 12(2), 385-394.

Laikre, L., Palm, S., & Ryman, N. 2005. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 34(2), 111-119.

Lanteri, A. A., & Confalonieri, V. A. 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía, 185-194.

Lasso, C. A. 1985. Las rayas de agua dulce. *Natura* 77: 6-9.

Lasso, C. A., E. Agudelo Córdoba, L. F. Jiménez-Segura, H. Ramírez-Gil, M. Morales-Betancourt, R. E. Ajiaco- Martínez, F. de Paula Gutiérrez, J. S. Usma Oviedo, S. E. Muñoz Torres y A. I. Sanabria Ochoa (Eds.). 2011. I. Catálogo de los recursos pesqueros continentales de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia, 715 p.

Lasso, C. A., R. S. Rosa, P. Sánchez-Duarte, M. A. Morales-Betancourt y E. Agudelo-Córdoba (Editores). 2013. IX. Rayas de agua dulce (*Potamotrygonidae*) de Suramérica. Parte I. Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam y Guayana Francesa: diversidad, bioecología, uso y conservación. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia. 368 p.

Lasso, C., Mesa-Salazar, L., Sanchez-Duarte, P., Usma, S. & Villa-Navarro, F. 2016. *Potamotrygon magdalenae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T161385A61472512. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016.RLTS.T161385A61472512.en>. *Revisado 28 September 2017*.

Last, P.R., Naylor, G.J.P. & Manjaji-Matsumoto, B.M. (2016) A revised classification of the family Dasyatidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes) based on new morphological and molecular insights. *Zootaxa*, 4139 (3), 345–368. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4139.3.2>.

Lovejoy Nr, Albert Ja, Crampton Wgr. 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *J S Am Earth Sci*. 21(1-2):5-13.

- Lovejoy, N. R. 1997. Stingrays, parasites, and neotropical biogeography: a closer look at Brooks et al.'s hypotheses concerning the origins of neotropical freshwater rays (Potamotrygonidae). *Systematic Biology*, 46(1), 218-230.
- Lovejoy, N. R. 1996. Systematics of myliobatoid elasmobranches: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of Neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society* 117: 207- 257.
- Lovejoy, N.R., Birmingham, E. & Martin, A.P. 1998. South American rays came in with the sea. *Nature*, 396, 421-422.
- Lundberg J. G. 1997. Fishes of the La Venta fauna: additional taxa, biotic and paleoenvironmental implications. pp. 67 -91. En R. F. Kay et al. (eds.). *Vertebrate paleontology in the Neotropics: The Miocene fauna of La Venta Colombia*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 592 p.
- Lundberg J. G. y B. Chernoff. 1992. A Miocene fossil of the Amazonian fish *Arapaima* (Teleostei, Arapaimidae) from the Magdalena river region of Colombia: Biogeographic and evolutionary implications. *Biotropica*, 24 (1): 2 - 14.
- Lundberg J. G., A. Machado-Allison y R. F. Kay. 1986. Miocene characid fishes from Colombia: Evolutionary stasis and extirpation. *Science*, 234: 208 - 209.
- Lundberg Jc, Marshall Lg, Guerrero J, Horton B, Malabarba Mc Wesseling F. 1998. The stage for neotropical fish diversification: A history of Tropical South American rivers. En: Malabarba L, Reis R, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CA, editors. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre EDIPUCRS; p. 13-48.
- Maldonado-Ocampo, J. A., F. A. Villa-Navarro, A. Ortega-Lara, S. Prada-Pedrerros, U. Jaramillo-Villa, A. Claro, J. S. Usma, T. S. Rivas, W. Chaverra, J. F. Cuesta y J. E. Gracia-Melo. 2006. Peces del río Atrato, zona hidrográfica del Caribe, Colombia. *Biota Colombiana* 7: 143-154.
- Maldonado-Ocampo, J.A.; Ortega-Lara, A.; Usma O., J.S.; Galvis V., G.; Villa-Navarro, F.A.; Vásquez G., L.; Prada-Pedrerros, S. y Ardila R., C. 2005. Peces de los Andes de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos «Alexander von Humboldt». Bogotá, D.C. - Colombia. 346 p.
- Maniglia T. C. 2010. Caracterización molecular de especies de *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) de la planicie de inundación del alto río Paraná, Brasil: variabilidad y diferenciación genética, hibridación y filogeografía. Tesis de maestría.
- Manni, F., Guerard, E., & Heyer, E. 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human biology*, 76(2), 173-190.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, 27(2 Part 1), 209-220.
- Marques, F. 2000. Evolution of Neotropical freshwater stingrays and their parasites: taking into account space and time. Tesis Doctoral, University of Toronto, Toronto. 322 p.
- Martin, A. P. 1999. Substitution rates of organelle and nuclear genes in sharks: implicating metabolic rate (again). *Molecular Biology and Evolution*, 16(7), 996-1002.
- Martin, A. P., & Palumbi, S. R. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(9), 4087-4091.

Martin, A.P., G.J.P. Naylor y S.R. Palumbi.1992. Rate of mitochondrial DNA evolution is slow in sharks compared to mammals. *Nature* 357: 153–155.

McCusker, M. R., & Bentzen, P. 2010. Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes. *Molecular Ecology*, 19(22), 4852-4862.

McEachran, J. D., K. A. Dunn y T. Miyake. 1996. Interrelationships of the batoid fishes (Chondrichthyes: Batoidea). Pp. 63-82. En: Stiassny, M. L. J., L. R. Parenti y G. D. Johnson (Eds.). *Interrelationships of Fishes*. Academic Press, London, England.

Megard, F. 1989. The evolution of the Pacific Ocean margin in South America north of Arica elbow (18 S). *The Evolution of the Pacific Ocean Margin*, Oxford. Monogr. Geol. Geophys, 8, 208-230.

Mejía-Falla Paola Andrea, Muñoz-Osorio Luis Augusto y Gutiérrez Mónica Andrea. 2011. Familia: Potamotrygonidae. En: Guía para la identificación de especies de tiburones, rayas y quimeras de Colombia. Bogotá, D.C.: Colombia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible; Corporación para el Desarrollo Sostenible del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina – CORALINA; Gobernación de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, Fundación SQUALUS, 2011. p. 268 -269.

Mejía-Falla, P. A, J. G. Pérez-Rojas, Gómez-Martínez, D, L. A. Muñoz-Osorio, Galindo E., J. López- García, Pedreros, T, G. Fernández y Navia, A. F. 2016. Avances en el conocimiento de *Potamotrygon magdalenae* (Duméril, 1865), raya dulceacuícola endémica de Colombia. pp. 305-323. En: Lasso, C. A., R. S. Rosa, M. A. Morales-Betancourt, Domingos Garrone-Neto y Marcelo Carvalho (Eds.). 2016. XV. Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia.

Mejía-Falla, P. A., A. Ramirez, J. S. Usma, L. A. Muñoz, J. Maldonado-Ocampo, A. I. Sanabria y J. C. Alonso. 2009. Estado del conocimiento de las rayas dulceacuícolas de Colombia. Pp. 197-245. En: Puentes, V., A. F. Navia, P. A. Mejía-Falla, J. P. Caldas, M. C. Diazgranados y L. A. Zapata (Eds.). *Avances en el conocimiento de tiburones, rayas y quimeras de Colombia*. Fundación SQUALUS, Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, Instituto Colombiano Agropecuario, COLCIENCIAS, Conservación Internacional, WWF.

Mejía-Falla, P. A., L. A. Muñoz-Osorio, E. Galindo, J. López, J. G. Pérez-Rojas y A.F. Navia. 2014. Evaluación de la dinámica pesquera y la distribución de *Potamotrygon magdalenae* en la cuenca del Magdalena y aportes a su historia de vida. Informe técnico Fundación SQUALUS. 58 pp.

Miyake, T. 1988. The systematics of the stingray genus *Urotrygon* with comments on the interrelationships within Urolophidae (Chondrichthyes, Myliobatiformes). Tesis Doctoral, Texas A&M University, College Station.

Mojica, J., C. Castellanos, J. Usma y R. Álvarez. 2002. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Inst. Cienc. Nat., Univ. Nac. Col., Min. Medio Amb. Serie Libros Rojos Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá, 134 p.

Mojica, J., G. Galvis, F. Arbeláez, M. Santos, S. Vejarano, E. Prieto-Piraquive, M. Arce, P. Sánchez-Duarte, C. Castellanos, A. Gutiérrez, S. Duque, J. Lobón-Cerviá, J. y C. Granado-Lorenzo. 2005. Peces de la cuenca del río Amazonas en Colombia: Región de Leticia. *Biota Colombiana* 6 (2): 191-210.

Mojica, J., G. Galvis, P. Sánchez-Duarte, C. Castellanos y F. Villa. 2006. Peces del Valle Medio del río Magdalena, Colombia. *Biota Colombiana* 7 (1): 23 – 38.

Monmonier, M. 1973. Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis*, 3: 245-261.

Mora, C., & Ospina, A. 2001. Tolerance to high temperatures and potential impact of sea warming on reef fishes of Gorgona Island (tropical eastern Pacific). *Marine Biology*, 139(4), 765-769.

Nishida, K. 1990. Phylogeny of the suborder Myliobatidoidei. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University* 37:1–108.

Perdomo-Nuñez, J. M. 2005. Rayas de agua dulce del género *Potamotrygon* utilizadas como ornamentales en Colombia. ACOLPECES. Bogotá D. C. Informe técnico 15 pp.

Plan de Acción Inmediato. 2008. Cuenca del Río Guarino y Charca de Guarinocito. CORPOCALDAS.

Posadas, P. y E. Ortiz-Jaureguizar. 2010. Evolução da região andina da América do Sul. Pp. 175-188. En: Carvalho, C. J. B y E. A. B. Almeida (Eds.). *Biogeografia da América do Sul* Editora Roca, São Paulo, Brasil.

Posadas, P., Crisci, J. V., & Katinas, L. 2006. Historical biogeography: a review of its basic concepts and critical issues. *Journal of Arid Environments*, 66(3), 389-403.

Puckridge, M., Andreakis, N., Appleyard, S. A., & Ward, R. D. 2013. Cryptic diversity in flathead fishes (Scorpaeniformes: Platycephalidae) across the Indo-West Pacific uncovered by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 13(1), 32-42.

Quijada, C. C. D. 2003. Relações filogenéticas intergenéricas de raias neotropicais de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Tesis de Maestría, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 84 p.

Ramos H.A.C. 2009. Exploration and commerce of freshwater stingrays in Brazil. Report to the Regional Workshop on South American Freshwater Stingrays, Geneva, 15–17.

Ramos-Socha, H. 2010. Algunos aspectos biológicos de la raya de agua dulce *Potamotrygon magdalenae* (Duméril, 1865) (Chondrichthyes: Myliobatiformes) en la Ciénaga de Sabayo, Guaimaral, Magdalena- Colombia. Trabajo de Grado, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias Naturales, Programa de Biología Marina, Santa Marta. 80 p.

Ramos-Socha, H. y M. Grijalba-Bendeck. 2011. Bioecología de la raya de agua dulce *Potamotrygon magdalenae* (Duméril, 1865) (Myliobatiformes) en la ciénaga de Sabayo, Guaimaral, Colombia. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica* 14 (2): 109 – 118.

Rangel, O. 2007. Informe final de actividades. Estudio de inventario de fauna, flora, descripción biofísica y socioeconómica y línea de base ambiental Ciénaga de Zapatosa, Corpocesar-Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, p. 378.

Ricardo Lombo T. 2006. Estabilizar cuencas hidrográficas, una tarea indispensable. Sociedad Geográfica de Colombia y Academia de Ciencias Geográficas. Bogotá.

Rogers, A. R., & Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*, 9(3), 552-569.

Ronquist, F. 1997. Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology*, 46(1), 195-203.

Rosa, R. S. 1985. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Tesis Doctoral, College of William and Mary, Williamsburg, Virginia. 523 pp.

Rosa, R. S., H. P. Castello y T. B. Thorson. 1987. *Plesiotrygon iwamae*, a new genus and species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Copeia* 2: 447-458.

Rosa, R. S., P. Charvet-Almeida y C. C. D. Quijada. 2010. Biology of the South American potamotrygonid stingrays. Pp. 241- 286 En: Carrier, J. C., J. A. Musick y M. R. Heithaus (Eds.). *Sharks and their relatives II: Biodiversity, adaptive physiology and conservation*. Taylor y Francis Group, New York, USA.

Salinas H. 2010. Identificación de haplotipos de *Spodoptera frugiperda* en algunas poblaciones de Colombia para el estudio del comportamiento migratorio de la especie. Tesis. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, pp. 93.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sandoval-Castillo, J., & Rocha-Olivares, A. (2011). Deep mitochondrial divergence in Baja California populations of an aquilopelagic elasmobranch: the golden cownose ray. *Journal of Heredity*, 102(3), 269-274.

Sandoval-Castillo, J., Rocha-Olivares, A., Villavicencio-Garayzar, C., & Balart, E. 2004. Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 145(5), 983-988.

Sinclair, M. 1988. *Marine populations: An essay on population regulation and speciation*. University of Washington. Seattle. 252 p.

Sivasundar, A., Bermingham, E., & Orti, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10(2), 407-417.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585- 595.

Templeton, A. R. (1998). Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7(4), 381-397.

Teshima, K. y K. Takeshita. 1992. Reproduction of the freshwater stingray, *Potamotrygon magdalenae* taken from the Magdalena River system in Colombia, South America. *Bulletin Seikai National Fisheries Research Institute* 70: 11-27.

Thorson, T. B., D. R. Brooks y M. A. Mayes. 1983. The evolution of freshwater adaptation in stingrays. *National Geographic Research Reports* 15: 663–694.

Toffoli, D. (2006). História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica. Unpublished M. Sc. Dissertation, Convênio Universidade Federal do Amazonas e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brazil, 114p.

Toffoli, O., T. Hrbek, M. L. G. Araujo, M. P. Almeida, P. Charvet-Almeida y I. P. Farras. 2008. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae: Myliobatiformes). *Genetic Molecular Biology*, 31 (1): 324-336.

Turbay, S., 2000.- *La Fauna de la Depresión Momposina*. Medellín: Editorial Lealon.

- Turner TF, McPhee MV, Campbell P, Winemiller KO. 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology* 64: 186–201.
- Valderrama, M., & Zárate, M. 1989. Some ecological aspects and present state of the fishery of the Magdalena River basin, Colombia, South America. *Canadian special publication of fisheries and aquatic sciences/Publication speciale canadienne des sciences halieutiques et aquatiques*.
- Valsecchi, E., Pasolini, P., Bertozzi, M., Garoia, F., Ungaro, N., Vacchi, M., & Tinti, F. 2005. Rapid Miocene–Pliocene dispersal and evolution of Mediterranean rajid fauna as inferred by mitochondrial gene variation. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(2), 436-446.
- Vargas-Zapata, M. A., Martínez-Hernandez, N. J., Gutiérrez-Moreno, L. C., Prince-Chacon, S., Herrera-Colon, V., & Torres-Periñan, L. F. 2011. Riqueza y abundancia de Hesperioidea y Papilionoidea (Lepidóptera) en la Reserva Natural Las Delicias, Santa Marta, Magdalena, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 16(1), 43-60.
- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. La ecología molecular de plantas y animales, 441-466.
- Villa-Navarro, F. A., P. T. Zúñiga-Upegui, D. Castro-Roa, J. E. García-Melo. M. E. García-Melo y M. E. Herrada-Yara. 2006. Peces del alto Magdalena, cuenca del río Magdalena, Colombia. *Biota Colombiana* 7: 3-22.
- Viloria, J. (2008). Economía extractiva y pobreza en la ciénaga de Zapatosa. *Guía de las ciénagas del caribe colom*, 54.
- Wang, S., Hard, J.J., Utter, F. 2002. Salmonid inbreeding: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 11, 301-319.
- Waples R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Heredity* 89:438-450.
- Ward, R. D., M. Woodwark, Y D.O.F. Skibinski. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J. Fish Biol.* 44:213-232.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P.D. N. (2005) Barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans.R Soc. B.* 360, 1847–1857.
- Weigmann, S. 2016. Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. *Journal of Fish Biology*, 88(3), 837-1037.
- Zhu, D., B. G. M. Jamieson, A. Hugall y C. Moritz. 1994. Sequence evolution and phylogenetic signal in control-region and Cytochrome b sequences of rainbow fishes (Melanotaeniidae). *Molecular Biology and Evolution* 11: 672–683.
- Zink R. M. Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. *Integr Comp Biol.* 2002; 42(5):953–959.