

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA**  
**UNAN-LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS y TECNOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**  
*“Edgar Munguía Álvarez”*



**Filogenética Molecular de Peces del Complejo Midas Cichlidae que habitan lagos y lagunas de Nicaragua utilizando el gen COI**

**Autor:**

**Bra. Lucía Páiz Medina**

**Tesis para optar al título de Licenciada en Biología**

**TUTORA:**

**Verónica Díaz Vargas Ph.D**

**Asesor:**

**Prof. Jorge Huete-Pérez Ph.D**

**León, Junio 2011**



*“Nada tiene sentido en Biología  
sí no es a la luz de la Evolución” Theodosius Dobzhansky*

*"No es el más fuerte de las especies el que sobrevive,  
tampoco es el más inteligente el que sobrevive.  
Es aquel que es más adaptable al cambio."  
Charles Darwin*



## **Dedicatoria**

A la juventud científica nicaragüense, porque si se puede investigar en nuestro país.

A los científicos que han dedicado su vida a investigar la ictiofauna de Nicaragua, a pesar de las dificultades.

A Lucía Medina.

Al Centro de Biología Molecular.



## **Agradecimientos**

Al Dr. Jorge Huete, por su apoyo incondicional y ser un ejemplo a seguir, por ser inspiración para la vida científica y por haber hecho posible esta investigación.

A la Dra. Verónica Díaz, por su apoyo y asesoría, por acompañarme en este largo camino y no dejarme desistir, y por ser ejemplo de mujer investigadora y docente.

A Matthias Geiger, Jeffrey McCrary y Lorenzo López, por su ayuda en la colección de muestras y compartir sus conocimientos.

A Carlos, Julio, Raquel, Yasica, Inti y Ana, mis colegas del Centro de Biología Molecular, por su invaluable apoyo y por animarme en los momentos difíciles.

A mis profesores del Departamento de Biología, por ser un ejemplo a seguir y formarme no solo a nivel profesional, sino también personal, especialmente a: Prof. Verónica Díaz, Vilma Solís, Lourdes Callejas, y Rolando Martínez quienes dejaron una huella en mi vida.

A mi mamá, Lucía Medina, por ser el ejemplo de justicia, perseverancia y responsabilidad.

A Luis Carlos Chávez, por su apoyo incondicional y por darme ánimos siempre.

A New England Biolabs y Centro de Biología Molecular-UCA por apoyar con el financiamiento de esta investigación.



## Resumen

En Nicaragua existe un grupo de peces que habitan lagos y lagunas cratéricas, pertenecientes a la familia Cichlidae, que desde los primeros intentos de clasificación han sido objeto de discusión, debido a que algunos son muy parecidos morfológicamente y no fue posible diferenciarlos y clasificarlos. Es necesario comprender las relaciones filogenéticas y las causas posibles del proceso de especiación de estas especies para su conservación.

En este estudio se utilizó como marcador el gen COI (Citocromo C oxidasa subunidad I) para determinar las relaciones filogenéticas entre los peces del Complejo. Los peces se colectaron en lagos y lagunas cratéricas utilizando redes de agalla o arpón. El ADN se extrajo de tejido de la aleta pectoral, utilizando protocolo de extracción orgánica y un kit comercial. Para la PCR se utilizaron dos enzimas: Taq polimerasa y Phire® Hot Start II. La secuenciación se llevo a cabo en un analizador genético ABI 3130 y para realizar el análisis de las secuencias y árboles filogenéticos se utilizó el programa *MEGA-5b*.

Se colectaron un total de 239 muestras en las siguientes localidades: Apoyo, Xiloá, Apoyeque, Asososca León, Monte Galán, Tiscapa, Moyúa, Lago de Nicaragua, Lago de Managua y Río San Juan. Se secuenciaron 70 muestras en las que se incluyó a todas las localidades y se elaboraron 4 árboles filogenéticos, en los que se presentan las relaciones entre los peces de lagos y lagunas. Con los árboles se concluye principalmente que: el gen COI discrimina entre especies de diferentes lagunas, se confirma que las relaciones entre las especies Midas Cichlidae son complejas y es necesario más de un gen para obtener resultados concluyentes, las especies fundadoras de las lagunas cratéricas provienen del lago de Nicaragua, en las lagunas habitan más de una especie del Complejo Midas Cichlidae y se infiere que la especiación simpátrica es el mecanismo evolutivo que ha conducido a la creación de estas especies.

Esta tesis se enmarca dentro de una Investigación que se realiza en el Centro de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana y se logró además, la creación de un proyecto en línea, en la Base de Datos del Código de barras de la vida, que contiene secuencias, imágenes e información taxonómica sobre las especies del Complejo.



## Índice

<b>I.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>3</b>
<b>III.</b>	<b>Marco Teórico.....</b>	<b>4</b>
	3.1 Biodiversidad.....	4
	3.2 Origen de los grandes lagos.....	5
	3.3 Peces de las Lagunas.....	7
	3.4 Familia Cichlidae.....	11
	3.4.1 Descripción morfológica	
	3.4.2 Reproducción	
	3.4.3 Alimentación	
	3.4.4 Importancia	
	3.4.5 Clasificación taxonómica	
	3.5 Complejo Midas Cichlidae.....	13
	3.6 Especiación.....	23
	3.7 Marcadores Moleculares.....	27
	3.8 Código de Barras genético (DNA Barcoding).....	28
	3.9 Técnicas Biología Molecular.....	31
	3.9.1 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).	
	3.9.2 Secuenciación	
	3.9.3 Alineamiento de secuencias	
	3.9.4 Elaboración de los árboles filogenéticos	
<b>IV.</b>	<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>38</b>
	4.1 Recolección de Muestras.....	38
	4.2 Análisis de laboratorio.....	40
	4.2.1 Extracción de ADN	
	4.2.2 Amplificación por PCR	
	4.2.3 Secuenciación	

4.3	Análisis de las secuencias.....	43
4.3.1	Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	
4.3.2	Edición y alineamiento de las secuencias	
4.3.3	Elaboración de los árboles filogenéticos	
V.	Resultados y Análisis.....	46
5.1	Recolección de muestras.....	46
5.2	Extracción de ADN.....	46
5.3	Amplificación por PCR.....	47
5.4	Secuenciación.....	48
5.5	Análisis de las secuencias del gen COI.....	48
5.5.1	BLAST.	
5.5.2	Alineamientos.	
5.5.3	Elaboración de árboles filogenéticos.	
VI.	Conclusiones.....	62
VII.	Recomendaciones.....	64
VIII.	Bibliografía.....	65
IX.	Anexos.....	71



## Lista de Tablas, Cuadros y fotografías

<b>Cuadro1. Especies de peces endémicas en Nicaragua.....</b>	<b>4</b>
<b>Cuadro 2. Historia Natural y características biológicas de los lagos y lagunas cratéricas de Nicaragua dónde habitan especies del Complejo Midas Cichlidae.....</b>	<b>9</b>
<b>Tabla 2. No de secuencias por localidad.....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 1. Muestras colectadas en Lagos y Lagunas de Nicaragua.....</b>	<b>46</b>
<b>Foto 1. Gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio, ADN genómico aislado de tejido de aleta pectoral.....</b>	<b>47</b>
<b>Foto 2. Gel de agarosa 1.4 % teñido con bromuro de etidio, Amplificación gen COI.....</b>	<b>47</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1. <i>Amphilophus citrinellus</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 2. <i>Amphilophus labiatus</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 3. <i>Amphilophus zaliosus</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 4. <i>Amphilophus amarillo</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 5. <i>Amphilophus xiloaensis</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 6. <i>Amphilophus sagittae</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 7. <i>Amphilophus chancho</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 8. <i>Amphilophus flaveolus</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 9. <i>Amphilophus astorquii</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 10. <i>Amphilophus supercilius</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 11. <i>Amphilophus globosus</i>.....</b>	<b>23</b>



**Figura 12. A. Lagunas muestreadas B. Sitios muestreados en el Lago de Nicaragua, Managua y Río San Juan. ....39**

**Figura 13. BLAST de secuencia para conocer si se estaba secuenciando el segmento adecuado de COI.....49**

**Figura 14. Alineamiento de las secuencias utilizando el programa *MEGA-5b* , algoritmo *ClustalW*.....50**

**Figura 15. Árbol Neighbor-Joining basado en el gen Citocromo C oxidasa subunidad I (región mitocondrial).....54**

**Figura 16. Árbol Neighbor-Joining de las lagunas Xiloá y Apoyo basado en el gen Citocromo C oxidasa sub unidad I (región mitocondrial).....56**

**Figura 17. Árbol Neighbor-Joining de las lagunas Monte Galán, Tiscapa, Apoyeque, Asososca León y Lago de Managua basado en el gen Citocromo C oxidasa sub unidad I (región mitocondrial).....58**

**Figura 18. Árbol Neighbor-Joining del Lago de Nicaragua y Río San Juan basado en el gen Citocromo C oxidasa sub unidad I (región mitocondrial).....60**

**Figura 19. Ejemplo de una página del Proyecto “*DNA Barcode of Midas Cichlidae species complex inhabiting lakes and lagoons of Nicaragua*”.....61**



## I. Introducción

En Nicaragua existe un grupo de peces que habitan lagos y lagunas cratéricas, pertenecientes a la familia Cichlidae, que desde los primeros intentos de clasificación han sido objeto de discusión, debido a que algunos son muy parecidos morfológicamente y no fue posible diferenciarlos y clasificarlos, pues se pensaba que solamente existía una especie y que esta presentaba diferentes formas, probablemente este polimorfismo de la “mojarra común” se deba a que son diferentes especie presentes en nuestro país.

Las lagunas cratéricas de Nicaragua son laboratorios naturales de evolución que poseen la ventaja de su pequeño tamaño, al contrario de los grandes lagos africanos, y permiten coleccionar muestras en prácticamente todas las localidades, aun con la dificultad de acceso en algunas zonas, haciendo de esta forma las investigaciones más accesibles. En cada una de estas lagunas se encuentran diferentes especies endémicas, lo que permite estudiar los procesos de especiación de una forma única, la velocidad y fuerzas con las que el aislamiento geográfico, la selección natural y sexual provocan la diversificación fenotípica y especiación (Elmer et al 2010b).

La especiación es un tema amplio y complejo y la especiación simpátrica, ha sido la más debatida porque hasta hace unos pocos años es la que era menos sustentada por evidencia, pero en los últimos años se ha fortalecido con el uso de marcadores de ADN.

En este estudio se utilizó como marcador el gen COI, propuesto como Código de Barras genético en el 2003 por investigadores de la Universidad Guelph en Ontario, Canada. Es una técnica que ya ha sido estandarizada para animales, y en peces se encuentran varios estudios en los que se ha podido identificar especies e inferir sobre la relación filogenética. Esta tesis es parte de una investigación más grande que se enmarca en el Proyecto “DNA Barcoding de especies del Complejo Midas Cichlidae que habitan lagos y lagunas de Nicaragua” y se realiza en el Centro de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana.



Comprender las relaciones filogenéticas y las causas posibles del proceso de especiación de estas especies, es importante para la conservación de las mismas, dado que siendo únicas, se encuentran amenazadas por la introducción de especies exóticas como la tilapia y la intensa actividad antropogénica.

Con este estudio se espera contribuir a responder las interrogantes planteadas por los primeros investigadores y la comunidad científica acerca de la correcta clasificación de la mojarra y el número de especies que existen en estos hábitats. Actualmente no hay investigadores nacionales trabajando en este tipo de estudios, por lo que con este trabajo se promueve la investigación en el país, utilizando técnicas modernas y abordando temas de actualidad y de importancia para Nicaragua.



## II. Objetivos

### *Objetivo General*

Establecer las relaciones filogenéticas de especies de peces del Complejo Midas Cichlidae que habitan lagos y lagunas cratéricas de Nicaragua utilizando el gen COI.

### *Objetivos específicos*

1. Optimizar protocolos de extracción, amplificación y secuenciación en peces del complejo Midas Cichlidae.
2. Identificar utilizando el gen COI las especies que habitan en estos lagos y lagunas.
3. Determinar la relación filogenética que existe entre los individuos que conviven en las mismas lagunas y en lagunas distintas.
4. Inferir acerca del proceso de especiación de las especies del Complejo.



### III. Marco teórico

#### 3.1 Biodiversidad

El término biodiversidad es una simple contracción de “diversidad biológica”, y a primera vista el concepto es simple también: biodiversidad es la suma total de toda la variación biótica desde el nivel de genes hasta ecosistemas. (Purvis y Héctor, 2000).

En Nicaragua existen aproximadamente 640 especies de peces agrupados en 125 familias y 299 géneros. De estos 584 son peces marinos, agrupados en 109 familias y 261 géneros, mientras que 56 son peces de agua dulce, representados por 16 familias y 38 géneros. Sin embargo, según los registros del ICLARM (Internacional Center for Living Aquatic Resources Management) se cuenta con aproximadamente 772 especies de peces marinos y 52 de agua dulce. Las familias de peces más abundantes y comúnmente distribuidas en Nicaragua son: Cichlidae (guapotes y mojarra); *Characidae* (sabalotes y machacas); y *Poeciliidae* (perezcas). Se reportan 15 especies endémicas, es decir peces que son exclusivos para Nicaragua (Cuadro 1), además, en los últimos 8 años se han reportado 6 especies más pertenecientes al género *Amphilophus*. (Rueda, 2007).

**Cuadro 1.** Especies de peces endémicas en Nicaragua (Adaptado de Rueda; 2007).

Nombre Científico
<i>Dorosoma chavesii</i>
<i>Hypsophrys nicaraguensis</i>
<i>Astyanax nasatus</i>



<i>Amphilophus labiatus</i>
<i>Pomadasys grandis</i>
<i>Rhamdia nicaraguensis</i>
<i>Amphilophus rostratus</i>
<i>Amphilophus amarillo</i>
<i>Amphilophus sagittae</i>
<i>Amphilophus xiloaensis</i>
<i>Amphilophus zaliosus</i>
<i>Amphilophus astorquii</i>
<i>Amphilophus chancho</i>
<i>Amphilophus globosus</i>
<i>Amphilophus superciliosus</i>

### 3.2 Origen de los grandes lagos

La teoría más antigua supone que los Grandes Lagos eran un golfo o bahía del litoral del océano pacífico que debido a la actividad volcánica del Pleistoceno superior fue aislada del mar, y las especies atrapadas en los recién formados lagos fueron adaptándose al agua cuya salinidad disminuía debido a las lluvias. Al llenarse los lagos, debido a las continuas lluvias, se derramaban hacia el Pacífico, pero al continuar la actividad tectónica, continuó elevándose la separación, hasta que se interrumpió el drenaje al Pacífico, entonces las aguas alcanzaron un nivel de aproximadamente 15 metros, mayor que el actual, rebalsándose hacia el Atlántico, formando el Río San Juan, esta teoría fue propuesta por Hayes en el siglo XIX. Otra teoría supone que los lagos se formaron gracias a una depresión tectónica, durante el Terciario superior o el



Cuaternario, y que nunca estuvieron conectados con los océanos, que la depresión se llenó de agua proveniente de lluvias y ríos. (Astorqui, 1971).

Sin embargo, Jaime Villa (1982) propuso una tercera teoría, que es una síntesis de las teorías anteriores y señala que, la llamada Depresión Nicaragüense, se originó debido al hundimiento o desplome tectónico extenso, que llegaba hasta el Golfo de Fonseca, el extremo norte se cerró gracias al vulcanismo y la depresión se fue llenando de agua de lluvias, la cual fue diluyendo el agua salada atrapada. Los ríos también contribuían con agua al lago primitivo (el Gran Lago Nicaragüense), aportando también algunas especies de peces (algunos sabaletes y mojarras) que evolucionaron allí formando nuevas especies autóctonas. El nivel del Gran Lago fue ascendiendo progresivamente por lo largo de los años y al exceder la altura de los diques que lo contenían, se rebalsó principalmente hacia el Atlántico, produciendo el Río San Juan. Además, parece ser que al menos en una ocasión se rebalsó también hacia el Pacífico. El flujo hacia el Caribe fue progresivamente erosionando el lecho del Río San Juan, con lo cual el antiguo nivel del lago fue decreciendo, y el flujo fue declinando hasta permitir la entrada de especies de más amplia distribución, provenientes de la vertiente Atlántica, estas residieron en la cuenca pero no formaron especies endémicas.

De acuerdo con el mismo autor, durante todo este tiempo el Gran Lago Nicaragüense incluía ambos lagos (Cocibolca y Xolotlán), al igual que varias lagunas actuales (Acahualinca, Ñocarime, Xiloá). Al ir declinando el nivel del antiguo lago, y tal vez también por un levantamiento orogénico en la región de Tipitapa, el Gran Lago se dividió en dos masas desiguales de agua: los actuales lagos Managua y Nicaragua. El lago de Managua, estando más alto que el de Nicaragua, drena sus aguas en éste por medio del Río Tipitapa, el flujo subterráneo es prácticamente continuo, aunque el terrestre sea intermitente. La región de Tipitapa, ha servido como una barrera, para los peces provenientes del Caribe. Las especies de origen marino que aún dependían del



mar para su reproducción se extinguieron del lago de Managua al no poder salir hacia el mar, o bien su entrada al Lago de Nicaragua fue posterior a la interrupción del paso de Tipitapa. Hasta el tiempo presente la barrera ha impedido la colonización del lago de Managua de partes de varias especies invasoras de la vertiente del Atlántico, esto explica la diferencia en la composición de la ictiofauna de los Grandes Lagos.

### **3.3 Peces de las Lagunas**

Según el Padre Ignacio Astorqui (1971), algunas lagunas de origen volcánico que nunca han tenido conexión, con los lagos (como Xilosa) están pobladas de peces. Con la excepción de la laguna de Masaya, la ictiofauna de estas lagunas volcánicas es muy pobre en número de especies y el origen de estos peces es muy difícil de explicar.

Astorqui propuso que en la laguna de Masaya fueron introducidas por los indígenas en tiempos remotos, con fines alimenticios. La base para esta aseveración está en una cita del historiador Gonzalo Fernández de Oviedo. Sin embargo, esta teoría no es aplicable a todas las especies encontradas en las lagunas volcánicas.

Aún cuando la introducción voluntaria por parte de nuestros aborígenes podría explicar la introducción de algunas especies, no lo puede hacer de otras, ya que existe al menos una laguna en la que no había razón para introducir peces, por ejemplo la laguna Apoyeque, que es de muy difícil acceso y probablemente nunca tuvo una población indígena importante. El agua es sumamente sulfurosa y salobre, lo que la hacía im potable, esto no sólo habría impedido que se estableciera en sus orillas una población, sino, también habría impedido la introducción de los peces ya que estos morirían debido a las diferencias de salinidad. Sin embargo, es necesario asumir que la composición de las aguas de Apoyeque hace 4,000-5,000 años era esencialmente la misma que la actual, aunque posiblemente, debido a la evaporación y el continuo efecto de las fuentes termales, la proporción de sólidos disueltos era menor que ahora. Pero



es posible que no haya sido así, tal vez al principio el agua fue dulce o casi dulce por las lluvias y al pasar el tiempo, debido al efecto de las fuentes termales, se fue haciendo cada vez más concentrada. Si fue así, podría haber existido una población indígena y los peces podrían haber sido introducido, al irse lentamente concentrando los sólidos disueltos, los peces se habrían aclimatado. (Barlow, 1976a).

La laguna de Apoyo, cuyas aguas son también actualmente algo salobres, tienen una ictiofauna empobrecida. En esta laguna existen especies endémicas, con lo que se comprueba el proceso de especiación, y se desecha la posibilidad de que hayan sido introducidas por aborígenes, ya que se asume que son necesarios al menos varios miles de años para que una especie origine a otra. Por lo tanto el origen de estas poblaciones de peces locales, se debe situar antes de la presencia del hombre en Nicaragua. (Astorqui 1971).

Al ponerse en duda la única teoría (introducción por poblaciones aborígenes) propuesta para explicar la presencia de peces en estas lagunas, resulta difícil proponer otras teorías. Generalmente se acepta que los peces de lagunas aisladas han llegado, por uno de dos medios distintos. Por ejemplo, se cree, que las aves acuáticas que visitan estas lagunas pueden llevar entre sus patas o plumaje, lodo, plantas y huevos de peces. Otro medio sería, la ocurrencia de tifones o tormentas, donde literalmente llueven peces y otros animales provenientes de una masa de agua vecina. Si bien por los efectos de la tormenta muchos de estos peces llegan muertos o muy débiles, es suficiente que tan sólo unos cuantos individuos sean los suficientemente resistentes para llegar vivos, y al caer, sean capaces de colonizar las lagunas. (Villa, 1982).

**Cuadro 2.** Historia Natural y características biológicas de los lagos y lagunas cratéricas de Nicaragua dónde habitan especies del Complejo Midas Cichlidae. (Tomado de Elmer et al, 2010).

		Edad			
--	--	------	--	--	--



Lago/Laguna	Historia Natural	Máxima (años antes del presente)	Área de la superficie (Km <sup>2</sup> )	Especies del complejo Midas Cichlidae	Otras especies
Apoyeque	El nombre "Apoyeque" en lengua Náhuatl significa agua salada, nombrada así por la gran cantidad de minerales que contiene, característico de las lagunas cratéricas. Estudios recientes indican que aquí habitan 2 formas ecológicas de peces del Complejo Midas Cichlidae, hay investigadores que piensan son especies distintas.	1900	2.50	<i>A. citrinellus</i>	2
Apoyo	Es la más grande y antigua de las lagunas cratéricas, además la que contiene mayor diversidad de peces del Complejo Midas Cichlidae. Se ha demostrado que en esta laguna ha ocurrido especiación simpátrica. Apoyo está bajo continua presión por la construcción alrededor de la laguna e introducción y cultivo de especies de peces exóticos.	23,890	21.10	<i>A. astorquii</i> , <i>A. chancho</i> , <i>A. flaveolus</i> , <i>A. zaliosus</i> , <i>A. superciliosus</i> , <i>A. globosus</i>	5
Asososca León	Se sabe poco acerca de esta pequeña laguna cratérica. Aquí habitan una población grande de tilapias africanas introducidas.	4500	0.81	<i>A. citrinellus</i>	3
Asososca Managua	Esta laguna es la fuente de agua potable de la ciudad de Managua. Es la laguna de origen más reciente. Se encuentran petroglifos, indicando que en el pasado era un sitio sagrado.	1245	0.74	<i>A. citrinellus</i>	3
Masaya	Esta laguna es donde el experto en el Complejo Midas Cichlidae, George Barlow, colectó la mayoría de los especímenes de su laboratorio. Se originó aproximadamente hace 6000	6000	8.38	<i>A. citrinellus</i>	9



	años con la erupción del San Antonio. Hace 2120-1800 años hubo una erupción en una de las orillas de la laguna, no se sabe si los peces que la habitaban en ese momento sobrevivieron o no.				
Monte Galán	Es probablemente una laguna de origen reciente, formada por la actividad volcánica reciente del Momotombo.	?	0.79	<i>A. citrinellus</i>	8
Tiscapa	Localizada en la ciudad de Managua, esta pequeña laguna está rodeada por un parque turístico. Está contaminada por aguas residuales y desechos.	?	0.13	<i>A. citrinellus</i>	2
Xilosa	Está localizada por encima del Lago de Managua y al lado de la laguna de Apoyeque. El nivel del agua del Lago de Managua histórica y periódicamente crece, (9 m arriba en la última erupción) resultando de esta forma en una conexión entre la laguna de Xilosa y el Lago de Managua.	6100	3.75	<i>A. amarillo,</i> <i>A. sagittae,</i> <i>A. xiloaensis</i>	14
Managua (Xolotlán)	El lago drena intermitentemente en el Lago de Nicaragua a través del Río Tipitapa.	Pleistoceno temprano	1053	<i>A. citrinellus,</i> <i>A. labiatus</i>	27
Nicaragua (Cocibolca)	Es el lago más grande en el hemisferio occidental norte. Se conecta con el Mar Caribe a través del Río san Juan.	Pleistoceno temprano	8143	<i>A. citrinellus,</i> <i>A. labiatus</i>	45

### 3.4 Familia Cichlidae

Los peces de la familia Cichlidae representan la familia con mayor riqueza en el número de especies entre los vertebrados. Existen más de 3,000 especies de



cíclidos y se distribuyen desde Centro América hasta América del sur, a lo largo de África, hasta Madagascar y el sur de India. (Kocher, 2004).

De acuerdo a Villa (1982), se señalan las características morfológicas y ecológicas más relevantes de los peces de la familia Cichlidae:

**3.4.1 Descripción morfológica.** Se reconocen por tener la línea lateral interrumpida y una sola fosa nasal a cada lado de la cara. Los cíclidos son peces dulceacuícolas secundarios de gran importancia en lagos, lagunas y ríos nicaragüenses.

Las características de la familia son: cuerpo alto, generalmente comprimido, a veces algo grueso y alargado, con escamas cicloides grandes, línea lateral interrumpida, terminando generalmente a la altura del final de la base de la aleta dorsal y continuándose más abajo, llegando hasta la base de la caudal, en algunos casos se continúa en la caudal; boca terminal o subterminal, con dientes variados, ausentes en los palatinos y el vómer, premaxilas protáctiles, maxila terminando bajo el preorbital, huesos faríngeos fundidos formando una placa triangular con una sutura medianera, vejiga gaseosa presente, aberturas nasales simples, una a cada lado de la cara, 4 arcos branquiales, sin pseudobranquias, membranas branquiales separadas, pero frecuentemente unidas, una aleta dorsal, larga, anteriormente espinosa, posteriormente radiada, anal con 3 o más espinas, y radios numerosos.

**3.4.2 Reproducción.** En la mayoría de las especies de la familia, los padres (o al menos uno de ellos) cuidan de los huevos y las crías. Los huevos son puestos en las rocas o la vegetación acuática, y los padres se turnan protegiéndolos contra otros peces, abanicándolos con sus aletas para asegurar una oxigenación adecuada y comiéndose los que mueren para evitar la putrefacción. Los recién nacidos, aún con el saco vitelino visible, también son protegidos por los padres, en algunas especies, el cuidado de los recién nacidos, llega a extremos, pues los huevos y las crías son llevados en la boca de uno de los padres, a la que entran para



protegerse y salen para nadar y comer, hasta alcanzar cierto tamaño. El adulto deja de comer durante este período, que puede durar de una a dos semanas.

**3.4.3 Alimentación.** Es variada, hay especies esencialmente herbívoras o carnívoras, aunque la tendencia general, al menos en las especies que habitan Nicaragua es oportunamente omnívora.

**3.4.4 Importancia.** Son una importante fuente de alimento en nuestro país, principalmente como subsistencia en la dieta de las poblaciones humanas alrededor de los lagos y lagunas.

#### **3.4.5 Clasificación taxonómica**

Reino: *Animalia*  
Phylum: *Chordata*  
Clase: *Actinopterygii*  
Infraclass: *Teleostei*  
Superorden: *Acanthopterygii*  
Orden: *Perciformes*  
Sub-orden: *Labroidei*  
Familia: *Cichlidae*  
Sub familia: *Cichlasomatinae*  
Tribu; *Heroine*  
Género: *Amphilophus*

### **3.5 Complejo Midas Cichlidae**



El complejo Midas cichlidae se compone de especies hermanas, previamente llamadas UES (Unidad evolutiva significativa) del género *Amphilophus*, que difieren en morfología, color, hábitos alimenticios, comportamiento, ecología y en sus sitios de reproducción. (Barluenga et al, 2006).

### **Especies del complejo: Descripción morfológica y Ecología.**

*Amphilophus citrinellus* (Günther). Su color más frecuente es verdoso, con varias barras anchas verticales negras, pero son comunes los ejemplares totalmente rojos, anaranjados o amarillos. (Villa, 1982).



**Figura 1. *Amphilophus citrinellus***

*Amphilophus labiatus* (Günther). Tiene el cuerpo alargado, el hocico puntiagudo, compresión lateral y, por supuesto, la mayoría presenta drásticamente labios hipertrofiados en comparación con *A. citrinellus* (Klingenberg et al, 2003).



**Figura 2. *Amphilophus labiatus***

*Amphilophus zaliosus* (Barlow). Endémico de la laguna de Apoyo. Aleta dorsal XV-XIX espinas, aleta anal V-VIII espinas y 7-8 rayos; aleta pectoral 16 rayos, hilera de 28-33 escama laterales. Cuerpo delgado, la altura es de 32 a 41% de la longitud estándar, el rostro no es alto, la cabeza es corta de 34 a 38% de la longitud estándar, las aletas pares son cortas y las aletas medias son bajas. Los dientes en una sola fila externa, cónicos y marrones en las puntas, más grandes y curvos hacia el frente, disminuyendo rápidamente en tamaño y cada vez más rectos hacia el lado de la mandíbula. Dentro de esta fila muchos dientes cónicos pequeños con puntas sin color. La lengua está libre y es puntiaguda,

El cuerpo de especímenes con vida es color azulado o gris verdoso, con marcas negras. Cuando están en período reproductivo, presentan siete barras negras verticales sobre un cuerpo pálido, cada barra tiene forma levemente como de un reloj de arena. Se ha adaptado a la vida en la región de agua abierta de la laguna. Presenta un comportamiento característico, cuando un buzo se acerca, huye nadando hacia arriba, desde el fondo hacia aguas abiertas. (Barlow y Munsey, 1976).



**Figura 3. *Amphilophus zaliosus***

*Amphilophus amarillo* (Stauffer & McKaye). Endémico de la laguna de Xiloá. Aleta dorsal XVI-XVII espinas y 11-12 rayos, aleta anal VI-VII espinas y 7-9 rayos; aleta pélvica 5 rayos, aleta pectoral 15-16 rayos, hilera de 30-32 escama laterales. Los machos y las hembras presentan patrones de coloración similares, cabeza con fondo verde y reflejos amarillos, debajo de la mejilla la cabeza es amarilla, la región anterior de la porción gular es amarilla, la región posterior es roja-anaranjada. La región inter-orbital es verde con dos barras verdes-oscuras, pre-opérculo verde, la porción posterior del opérculo es roja/amarilla/anaranjada. Dorsalmente, desde la parte superior de la línea lateral es verde con reflejos amarillos, con 6-8 barras negras que aparecen como una extensión de puntos medios negros, las barras anteriores se extienden hasta la aleta dorsal, la mancha caudal negra se extiende sobre la aleta caudal. El vientre es verde-amarillo, con reflejos negros. La aleta dorsal es gris-negra, los rayos posteriores son anaranjados en algunos individuos. La aleta caudal con rayos grises y membrana transparente con reflejos anaranjados. La porción distal de la aleta anal con espinas negras, con membrana gris-verde, la porción posterior anaranjada. Las aletas pélvicas son gris-verde con el primer rayo negro. Las aletas pectorales con membrana transparente y rayos con marcas amarillo claro. Su temporada de apareamiento es durante el mes de noviembre. *A. amarillo* tiene un área de anidación ampliamente distribuida a lo largo de lechos de vegetación, apareándose en aguas de aproximadamente 13.5 m de



profundidad. Las especies se alimentan de conchas y presentan mandíbulas faríngeas del tipo molariforme. (Stauffer y McKaye, 2002).



**Figura 4. *Amphilophus amarillo***

*Amphilophus xiloaensis* (Stauffer & McKaye). Endémico de la laguna de Xiloá. Aleta dorsal XVI-XVII espinas y 11-12 rayos, aleta anal VI-VII espinas y 8-9 rayos; aleta pélvica 5 rayos, aleta pectoral 15-17 rayos, hilera de 30-32 escama laterales. Los machos y las hembras presentan patrones de coloración similares, y hay formas doradas en ambos sexos. Algunas formas tienen una cabeza gris-verde con una sola barra negra interorbital y porción gular roja. Lateralmente, fondo de color gris, con 6 barras negras verticales y la mancha caudal se extiende sobre la aleta caudal, el vientre es blanco. Las aletas dorsal, caudal y anal son grises concón manchas claras. Las aletas pélvicas son grises con borde negro sobresaliente, las aletas pectorales son transparentes. Otras formas tienen coloración distinta, con la cabeza amarilla, y mejilla blanca. Opérculo blanco con reflejos verdes/amarillos, y placa gular blanca con manchas rojas. Lateralmente anaranjado brillante. La aleta dorsal es anaranjada con parches blancos. La aleta caudal es anaranjada con bordes blancos. La aleta anal es anaranjada con lóbulos blancos. Las aletas pectorales anaranjadas con parte posterior blanca, las aletas pélvicas son anaranjadas con la espina I y el 1er rayo blanco y el 2do rayo rojo. Otros individuos son mayormente blancos con manchas anaranjadas. *A. xiloaensis* es la especie dominante en la laguna, y su temporada de apareamiento es durante el mes de noviembre, su sitio de anidación es principalmente en arrecifes pedregosos, apareándose en aguas



profundas, aproximadamente, 16.5 m. Las especies se alimentan de conchas y presentan mandíbulas faríngeas del tipo molariforme. (Stauffer y McKaye, 2002).



**Figura 5. *Amphilophus xiloaensis***

*Amphilophus sagittae* (Stauffer & McKaye). Endémico de la laguna de Xiloá. Aleta dorsal XVI-XVII espinas y 11-12 rayos, aleta anal VI-VII espinas y 8-10 rayos; aleta pélvica 5 rayos, aleta pectoral 14-17 rayos, hilera de 30-35 escama laterales. Los machos y las hembras presentan patrones de coloración similares, la cabeza es negra/verde dorsalmente, negra lateralmente y la placa gular también es negra, en algunos especímenes, roja. Lateralmente es negro con reflejos verdes, y con 5 barras verticales negras. Ventralmente, anterior a la aleta pélvica es negro, y blanco, posterior a P2. Las aletas pélvicas, dorsal, anal y caudal son negras. Las aletas pectorales con rayos negros y membranas transparentes. Su temporada de apareamiento es durante el mes de noviembre, y sus nidos se encuentran en rocas con vegetación y áreas arenosas, apareándose en aguas poco profundas, aproximadamente 7.5 m. Las especies se alimentan de alevines, huevos de peces y presas suaves, presenta mandíbulas faríngeas del tipo papiliforme. (Stauffer y McKaye, 2002).



**Figura 6. *Amphilophus sagittae***

*Amphilophus chancho* (Stauffer, McCrary & Black). Endémico de la laguna de Apoyo. Aleta dorsal XVI-XVII espinas y 10-12 rayos, aleta anal VI-VIII espinas y 8-10 rayos; aleta pélvica 5 rayos, aleta pectoral 15-17 rayos, hilera de 28-31 escama laterales. Los machos y las hembras presentan patrones de coloración similares, los individuos en reproducción son de color verde dorsalmente, gris claro lateralmente, con cinco barras verticales negras. La aleta pectoral tiene reflejos amarillo-claro, se distingue la mancha caudal. La cabeza es verde/amarilla, la región interorbital, la mejilla, la porción dorsal del opérculo, el pre-opérculo y el pre-orbital son de color gris-verde. La región ventral de opérculo y la garganta son de color verde brillante, el opérculo presenta una barra negra vertical.

Los individuos que no están en reproducción, presentan barras verticales tenues sobre un fondo amarillo/verde brillante, con manchas oscuras en la porción dorsal. Parches blancos en el vientre y con una mancha caudal negra. El iris es verde-amarillo con una barra oscura vertical. Parches blancos en la mandíbula inferior. El período de reproducción es durante la transición de la estación lluviosa a la seca, desde noviembre a enero, el cuidado de la cría es biparental. *A. chancho* anida a profundidades de 2-25 m, en cuevas o huecos preexistentes en áreas rocosas. (Stauffer, McCrary y Black, 2008).



**Figura 7. *Amphilophus chancho***

*Amphilophus flaveolus* (Stauffer, McCrary & Black). Endémico de la laguna de Apoyo. Aleta dorsal XVI-XVII espinas y 11-12 rayos, aleta anal VI-VII espinas y 8-9 rayos; aleta pélvica 5 rayos, aleta pectoral 15-17 rayos, hilera de 29-32 escama laterales. Los machos y las hembras presentan patrones de coloración similares, los individuos en reproducción tiene seis o siete barras verticales sobre un fondo color verde-amarillo dorsalmente tornándose amarillo ventralmente, el pecho y amarillo-blanco en el pecho. El iris es color dorado oscuro. La mancha caudal es prominente y no se extiende sobre la aleta caudal. Las aletas son grises con reflejos verdes. El período de reproducción es durante la transición de la estación lluviosa a la seca, desde noviembre a enero, el cuidado de la cría es biparental. *A. flaveolus* anida a profundidades menores de 2 m, en sustratos arenosos-lodosos. (Stauffer, McCrary y Black, 2008).



**Figura 8. *Amphilophus flaveolus***

*Amphilophus astorquii* (Stauffer, McCrarr & Black). Endémico de la laguna de Apoyo. Aleta dorsal XVI-XVIII espinas y 10-12 rayos, aleta anal VI-VII espinas y 8-9 rayos; aleta pélvica 5 rayos, aleta pectoral 15-17 rayos, hilera de 26-31 escama laterales. Los machos y las hembras presentan patrones de coloración similares, los individuos en reproducción tienen un fondo verde-negro con cinco barras verticales oscuras, debajo de la aleta dorsal, además de una barra anterior a la aleta dorsal y una barra posterior, en el pedúnculo caudal. Las aletas son grises, con barras oscuras sobre la aleta dorsal. El iris es dorado, con una barra vertical oscura. Los individuos que no están en reproducción, presentan un fondo verde-gris claro, tienen mancha dorsal y caudal, y tres o cuatro pequeñas manchas oscuras adicionales a lo largo de la línea lateral. El vientre y pecho son de color gris claro. Las aletas son transparentes. El período de reproducción es durante la transición de la estación lluviosa a la seca, desde noviembre a enero, el cuidado de la cría es biparental. *A. astorquii* anida a profundidades de 2-25 m, en cuevas o huecos preexistentes en áreas rocosas tendiendo a hacer madrigueras más pequeñas. (Stauffer, McCrary y Black, 2008).



**Figura 9. *Amphilophus astorquii***

*Amphilophus supercilius* (Stauffer, Geiger & McCrary). Endémico de la laguna de Apoyo. Aleta dorsal XVI-XVII espinas y 10-11 rayos, aleta anal VI-VII espinas y 7-8 rayos; aleta pélvica 5 rayos, aleta pectoral 14-15 rayos, hilera de 27-33 escama laterales. Los machos y las hembras presentan patrones de coloración similares, los individuos en reproducción son de color verde oscuro dorsalmente, gris oscuro a negro lateralmente con cinco barras verticales negras debajo de la aleta dorsal, tiene además una barra vertical adicional que se extiende pre-dorsalmente hasta antes de la aleta pectoral, y otra barra prominente en el pedúnculo caudal, con una mancha negra en la base de la aleta caudal. El vientre y el pecho son oscuros con brillos violetas. La aleta pectoral con rayos amarillos-dorados y membrana transparente. Las aletas dorsal, anal y pélvicas son transparentes oscuras con reflejos verdosos. La aleta caudal con una membrana anteriormente de color negro hollín que se desvanece posteriormente hacia un color rojo-violeta claro. El iris tiene un borde dorado. Se reproduce durante los meses de septiembre a marzo, correspondientes a la estación seca, teniendo picos en Octubre y Febrero. Las parejas en reproducción se encuentran a profundidades entre 1.5 y 20 m, sus sitios de anidación son entre rocas disponibles en cuevas y madrigueras. Presenta una dieta generalista, en sus contenidos estomacales se puede encontrar: restos y huevos de peces, moluscos y *Chara*. (Stauffer, Geiger y McCrary, 2010).



**Figura 10. *Amphilophus superciliosus***

*Amphilophus globosus* (Stauffer, Geiger & McCrary). Endémico de la laguna de Apoyo. Aleta dorsal XVII-XVIII espinas y 10-11 rayos, aleta anal VI-VIII espinas y 7-8 rayos; aleta pélvica 5 rayos, aleta pectoral 13-15 rayos, hilera de 28-35 escama laterales. Los machos y las hembras presentan patrones de coloración similares, los individuos en reproducción son de color amarillo verdoso dorsalmente y la cabeza, amarillos en el abdomen y la región ventral, tiene siete barras verticales oscuras y una mancha caudal negra. Las aleta pectorales son transparentes, un poco amarillentas, las otras aletas, son oscuras. Los individuos que no están en reproducción tienen barras verticales muy tenues, usualmente imperceptibles en el campo, presentan un fondo color amarillo verdoso dorsalmente, amarillo lateralmente con una mancha característica negra, usualmente sobre la tercera barra vertical bajo la aleta dorsal, además de otra mancha negra en la base de la aleta caudal. La cabeza es verde-amarilla, el vientre y el pecho son amarillo-verde brillante, la placa gular es color blanco cremoso. La aleta pectoral con rayos y membrana transparente. Las aletas pélvicas dorsal y anal con membrana transparente y reflejos anaranjados-amarillos. La aleta caudal con membrana transparente o amarillenta. El iris es color dorado-anaranjado en el borde con una barra vertical oscura. No se conocen mayores detalles sobre su ecología de reproducción, pero se ha observado el apareamiento de individuos sobre vegetación de *Chara* a profundidades entre 4 a 8 m durante marzo y enero. (Stauffer, Geiger y McCrary 2010).



**Figura 11. *Amphilophus globosus***

### 3.6 Especiación

La especiación es el proceso evolutivo que conduce al origen de nuevas especies a partir de especies ancestrales (Otte y Endler, 1989). Los principales mecanismos de especiación en función de la presencia o no de barreras geográficas son:

*Especiación alopátrica*, en las que las poblaciones aisladas por una barrera geográfica gradualmente llegan a diferenciarse genéticamente (subespecies) e inicialmente con mecanismos de aislamiento reproductivo incompleto (semi especies) los que posteriormente se refuerzan y completan por la divergencia genética de las poblaciones sometidas a presiones selectivas diferentes. Se considera la alopátrica el modo prevalente de especiación. La especiación peripátrica, se considera un tipo particular de especiación alopátrica que se puede originar a partir de unos pocos individuos fundadores o cuando una población pasa por un cuello de botella (reducción del tamaño poblacional) e incluye factores estocásticos (azar) que llevan a una rápida especiación, puesto que los individuos contienen sólo una parte de la diversidad genética de la población original, que los conduce a una rápida divergencia, a como ha ocurrido en numerosas especies terrestres que exitosamente han colonizado archipiélagos oceánicos.(Templenton, 1980).



*Especiación parapátrica*, en este tipo de especiación las nuevas especies evolucionan de poblaciones contiguas y cuando hay un cline o gradiente ambiental, se restringe el flujo de genes entre las poblaciones, lo que conduce a semi especies que posteriormente divergen hasta formar especies distintas. En este caso no existen barreras geográficas que separen las poblaciones. Ejemplo de este tipo de especiación se da cuando se extinguen poblaciones intermedias, quedando reproductivamente aisladas las poblaciones extremas. (Templenton, 1980).

*Especiación simpátrica*, este tipo ocurre entre poblaciones que ocupan la misma área geográfica. La divergencia en las poblaciones se favorece por el aislamiento de hábitat (microalopatría). En poblaciones que presentan polimorfismo genético la selección sexual y de hábitat conduce a que se fijen mutaciones o recombinaciones génicas lo que ocasiona aislamiento reproductivo precigótico (barreras biológicas,) entre los grupos en distintos biotopos en una misma área geográfica (Maynard-Smith, 1966).

Como los cíclidos dentro de los lagos no están aislados completamente del flujo genético por barreras físicas, otros factores deben estar involucrados en la diferenciación de nuevas especies. Kocher (2004) considera al menos tres principales fuerzas de selección que pueden haber contribuido a la divergencia de los peces cíclidos: *selección en rasgos ecológicos, selección sexual y conflictos genéticos*.

- *Selección ecológica*. En un período evolutivo notablemente corto, los cíclidos han producido una impresionante variedad morfológica de mandíbulas y dientes que se adaptan a diferentes formas de alimentación. En algunos casos, en las lagunas cratéricas, estas diferencias han surgido en absoluta simpatria. El clásico modelo de un solo gen, predice que la especiación ecológica simpátrica puede ocurrir entre poblaciones que están conectadas por el flujo de genes, solo si hay un fuerte vínculo de genes para una característica ecológica y selección de pareja; la especiación puede ocurrir muy rápidamente una vez que la correlación genética entre el vigor (fitness) y los rasgos de la selección de pareja alcancen un umbral crítico. Pero, aunque está claro que la selección ecológica



ha tenido un papel importante en la radiación de estos peces, aún está por verse si es un factor importante en la especiación de los linajes más reciente, que en general muestran una menor divergencia en la morfología trófica.

- *Selección sexual.* Las hembras de los cíclidos ponen poca cantidad de huevos relativamente grandes, y cuidan a sus crías durante varias semanas hasta que la yema es absorbida. Muchos de las hembras de los cíclidos recogen los huevos inmediatamente después de ponerlos y los incuban en sus bocas por varias semanas. En algunas especies el cuidado materno continúa durante varias semanas después de que el juvenil es liberado. Por el contrario, los machos de la mayoría de las especies no contribuyen en nada más que en los genes que transfieren a su descendencia. Esta inversión parental asimétrica conlleva a una selección sexual muy fuerte, dimorfismo sexual y representa consecuencias para la historia de vida y dispersión de los cíclidos.

La diversidad en los patrones de coloración del macho entre los nidos rocosos llevó a la especulación de que la selección sexual estaba involucrada en el proceso de especiación. Se han llevado a cabo algunos estudios basados en un modelo de divergencia por selección sexual (Modelo de Lande), en el que los rasgos del macho evolucionan como respuesta a las preferencias de pareja de la hembra. Este modelo predice una rápida co-evolución de las características del macho y las preferencias de la hembra, especialmente si las preferencias de la hembra no tienen límites.

Teorías más recientes indican que la selección sexual también puede conducir a la especiación simpátrica. Se han identificado condiciones bajo las cuales un alelo para revertir las preferencias de la hembra puede invadir y causar rápida especiación simpátrica dentro de poblaciones pequeñas.

El dimorfismo sexual notable y los varios patrones de coloración de los machos son a primera vista evidencia de que la selección sexual es una fuerza fuerte en la evolución de estos grupos de especies.



- *Conflictos genéticos.* Varios mecanismos moleculares permiten que los genes compitan dentro del genoma, en algunos casos hasta causar la pérdida del vigor del organismo. Los conflictos entre diferentes elementos del genoma son una fuerza evolutiva poderosa. Los genes que están en conflicto más a menudo son aquellos que residen en diferentes compartimientos celulares o los que se heredan asimétricamente, también existen conflictos entre genomas, por ejemplo genomas maternos versus paternos. Los conflictos intersexuales, o antagonismo sexual, se cree es el responsable de la evolución rápida de las proteínas presentes en el tracto sexual y por lo tanto causa infertilidad híbrida pre y post cigótica entre especies estrechamente relacionadas, sin embargo, este conflicto, probablemente no tiene un rol importante en la evolución de los cíclidos ya que sus huevos se fertilizan externamente y el micrópilo limita la oportunidad para conflictos derivados por la posible entrada de diferentes tipos de espermatozoides dentro del huevo.

Sin embargo los conflictos intra-genómicos sobre la proporción de los sexos pueden causar evolución rápida de los mecanismos de determinación del sexo, lo que puede contribuir a la especiación.

Bajo algunas circunstancias, como endogamia, la proporción óptima del sexo para las madres y su descendencia puede diferir, lo que resulta en una competencia co-evolutiva sobre el mecanismo de determinación del sexo.

Algunos modelos proponen la incorporación de polimorfismo en el color ligado al sexo, lo que se convierte en la base de la selección sexual y el apareamiento selectivo entre especies que evolucionaron recientemente. Una “máquina de especiación” que es guiada por ciclos repetitivos de conflictos genéticos sobre la proporción del sexo puede contribuir a la especiación de poblaciones bien estructuradas de cíclidos.

De lo anterior sobresalen dos características claves que hacen suponer que fuerzas de selección natural pueden haber derivado a la especiación simpátrica de las especies neo tropicales del complejo Midas Cichlidae: apareamiento selectivo en base a polimorfismo en el color en conjunto con diferenciación trófica y ecológica derivada del



polimorfismo de sus mandíbulas faríngeas; se cree que el apareamiento selectivo basado en el color contribuye con más fuerza o más temprano durante la especiación en simpatría, por lo tanto se tiene la hipótesis que si el aislamiento reproductivo es fuerte y los polimorfismos tróficos generalmente aumentan el aislamiento reproductivo debido a diferenciación ecológica, esto resulta en un decrecimiento del flujo genético, posiblemente conduciendo hacia la simpatría. (Wilson et al, 2000).

Muchas especies de cíclidos hibridan en el laboratorio, este hecho, no debería causar confusión, porque hay especies jóvenes que no han acumulado un gran número de incompatibilidades genéticas desde que compartieron por última vez un ancestro común. (Kocher, 2004).

### **3.7 Marcadores Moleculares**

Los marcadores moleculares son herramientas útiles en muchos campos de las ciencias biológicas que realizan estudios de biodiversidad, evolución, ecología, entre otras, donde tienen numerosas aplicaciones como determinar cantidad y distribución de la diversidad genética en poblaciones naturales, estructura de poblaciones, detectar y aislar genes de interés, genotipificar individuos, entre otros. Por ejemplo, los aspectos más modernos de la sistemática biológica incluyen el empleo de la información que brindan las secuencias de ADN para reconocer especies y realizar inferencias de parentesco entre linajes evolutivos.

Existen numerosas definiciones para los marcadores moleculares basados en el ADN, que generalizando se pueden considerar como una señal o señales en una región del ADN que puede estar o no asociado a una región codificante. (Azofeifa-Delgado, 2006). Los diferentes tipos de marcadores de ADN, se diferencian en su capacidad de detectar polimorfismo, si son basados o no en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y si son de naturaleza dominante o codominante.

Existen marcadores como los RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) y los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) que detectan polimorfismo en varios loci (marcadores multilocus) y los que detectan en un único locus como los microsatélites. Los basados en la PCR (automatizados) como los microsatélites, RAPD y AFLPs, y no basado en la PCR como los RFLP (Restricción Fragment Length



polymorphisms). Existen marcadores capaces de diferenciar homocigotos de heterocigotos y son llamados codominantes como los RFLP y microsatélites y los dominantes que no permiten hacer esta diferencia como los RAPD y AFLP.

### 3.8 Código de Barras genético (DNA Barcoding)

En el 2003 investigadores de la Universidad Guelph en Ontario, Canada, propusieron el Código de barras genético, “DNA Barcode” como una técnica para identificar especies. Un Barcode se puede considerar como una secuencia corta de ADN, de una localidad uniforme del genoma usada para identificar especies.

La región de gen que está siendo utilizada como barcode estándar para casi todos los grupos de animales es una región de 648 pares de base del gen mitocondrial citocromo c oxidasa sub unidad 1 (COI). Está probado que COI es altamente efectivo en la identificación de aves, peces, mariposas y muchos otros grupos de animales. (CBOL, [www.barcoding.si.edu/whatis.html](http://www.barcoding.si.edu/whatis.html)).

Se escogió un gen mitocondrial debido a algunas de sus características:

1. Una célula posee más copias de ADN mitocondrial que de ADN nuclear, lo que permite recuperar el ADN con más éxito en muestras pequeñas o degradadas.
2. Mayor diferencia en la secuencia de ADN entre especies diferentes
3. Poca diferencia en la secuencia de ADN de ejemplares de la misma especie. La variación intraespecífica en el ADN mitocondrial es baja en la mayoría de las especies animales. Por ejemplo, en 260 especies de pájaros norteamericanos estudiados, las diferencias entre especies estrechamente relacionadas tuvieron un promedio 18 veces mayor que las diferencias dentro de los especímenes de la misma especie.
4. Ausencia de intrones, que son ADN no codificante. En animales, los genes mitocondriales raramente contienen intrones. El ADN mitocondrial es generalmente transcrito directamente, en cambio, la amplificación de las regiones codificantes de genes nucleares es limitada a menudo por los intrones, que pueden ser muy largos. (Ausubel, Stoeckle y Waggoner; 2005).



Uno de los principales objetivos de DNA Barcode es la estandarización, es decir que esta técnica pueda ser utilizada para la identificación de especies, por muchos investigadores, lo que permitirá acelerar la construcción de una biblioteca de secuencias de ADN que sea accesible y consistente, de manera que cualquier investigador -aún cuando no sea un especialista en taxonomía- en cualquier parte del mundo sea capaz de identificar rápidamente de una forma confiable a qué especie pertenece un espécimen dado. (Ausubel, Stoeckle y Waggoner; 2005).

DNA Barcode es una iniciativa internacional, por lo que cuenta con una red de repositorios en la web con información general sobre la técnica, además de trabajos realizados, protocolos y contactos. Cada uno de ellos ha tratado de abarcar diferentes áreas en las cuales se está realizando investigación implementando la técnica. Aunque se reconocen algunas dificultades, los investigadores están tratando de mejorar errores para conseguir el objetivo principal que es la estandarización y confiabilidad de la técnica.

Los proyectos que emplean la técnica DNA Barcode, toman en consideración los siguientes aspectos:

1. El espécimen. Este puede encontrarse en museos de historia natural, herbarios, zoológicos, acuarios, colecciones de tejidos congelados, bancos de semilla, y otros reservorios de material biológico.
2. El análisis de laboratorio. Protocolos de DNA Barcode pueden ser utilizados para obtener secuencias DNA Barcode de los especímenes a estudiar.
3. La Base de datos: es uno de los componentes más importantes de la Iniciativa de Barcode, pues representa una biblioteca pública de referencia de las especies ya identificadas, donde se pueden encontrar las secuencias de los DNA Barcodes, y comparar especímenes no identificados, con los que ya han sido identificados. La Base de Datos de Barcode de la vida (Barcode of life Database, BOLD) fue creada y es mantenida por la Universidad de Guelph en Ontario; que ofrece a los investigadores una manera de coleccionar, manejar y analizar los datos de los DNA Barcodes.



4. El análisis de los datos. Los especímenes son identificados encontrando la pareja más cercana en el record de la base de Datos.

Ventajas de DNA Barcode (Ausubel, Stoeckle y Waggoner; 2005).

- Acceso Global
- Demuestra el valor de las colecciones
- Permitirá Enciclopedia de la Vida
- Funciona para varias formas de vida: desde huevos y semillas, hasta organismos adultos
- Funciona con pequeños Fragmentos. No es necesario utilizar grandes cantidades de tejido.
- Distingue entre especies muy parecidas
- Facilita el reconocimiento de nuevas especies

Principales limitantes al utilizar DNA Barcode

1. Hay desconocimiento de las partes no descritas de la biodiversidad. Esto es una dificultad porque se considera que DNA Barcode es una herramienta cuya utilidad principal es corroborar la identificación de especies antes descritas, cuya taxonomía es bien comprendida, y la parte “no descrita” puede ser un problema para DNA Barcode.
2. Riesgos inherentes debido a la herencia de los genes mitocondriales. Debido a que el ADN mitocondrial es heredado por vía materna, el uso de loci mitocondrial puede conducir a sobreestimar la divergencia de la muestra y llegar a conclusiones imprecisas acerca del estatus de la especie. Además, la herencia mitocondrial entre individuos de la misma especie puede ser confundida como infección simbiótica (cuando un individuo infecta a otro es capaz de introducir segmentos de ADN), y estas hibridaciones interespecíficas e infecciones endosimbióticas pueden generar transferencia de genes mitocondriales fuera de cada grupo evolutivo.
3. Confusión por copias nucleares del gen COI (NUMTs). Se refiere a copias nucleares de secuencias de ADN mitocondrial que han sido traslocadas dentro



del genoma nuclear. Es posible equivocarse y secuenciar ADN nuclear en vez de ADN mitocondrial.

4. Dificultad con especies que divergieron hace poco tiempo. En organismos cercanamente emparentados, que hace poco tiempo fueron reconocidos como especies diferentes, es posible que el DNA barcode de estas especies presenta poca variabilidad y no sean identificadas como especies diferentes. (Frézal y Leblois, 2008).

### 3.9 Técnicas Biología Molecular

**3.9.1 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).** La reacción en cadena de la polimerasa o PCR se ha convertido en la técnica clave de la Biología Molecular puesto que permite copiar, (replicar, amplificar) fragmentos específicos de ADN en un tubo de ensayo (in vitro) a partir de cantidades mínimas de ADN. La amplificación la realiza una enzima termoestable generalmente la Taq polimerasa extraída de *Thermus aquaticus* y el proceso se realiza en un aparato denominado termociclador.

Esta técnica requiere los componentes básicos que la célula in vivo utiliza para replicar el ADN como:

- El ADN de interés a estudiar (llamado ADN molde)
- Dos cebadores (primers), pequeña secuencia de oligonucleótidos sintéticos con un extremo 3'OH libre, a partir de los cuales la taq polimerasa incorporará los nucleótidos durante la síntesis del fragmento de ADN.
- El buffer o tampón que confiere el pH óptimo para la polimerasa, y contiene sales, (como cloruro de magnesio) que aportan la fuerza iónica necesaria para potenciar la actividad de la enzima
- Un extra de cloruro de magnesio, que se ajusta para cada estudio en particular, con el propósito de optimizar la actividad de la polimerasa.
- dNTP's (ATP, CTP, GTP Y TTP), fuente de nucleótidos con los que se sintetiza el nuevo fragmento de ADN.



- La Taq polimerasa que realiza el proceso de amplificación incorporando uno a uno los nucleótidos correspondientes
- Agua, en la cantidad necesaria para que los componentes queden a una determinada concentración en la mezcla de reacción

El proceso de la amplificación ocurre en el termociclador, el cual se programa con los tiempos y temperaturas necesarias. Un programa de amplificación comprende una desnaturalización inicial del ADN a una temperatura superior a los 90°C (92-95), seguidos de un determinado número de ciclos (25-40) que comprende: desnaturalización del ADN molde, hibridación del cebador con las secuencias complementarias en el ADN molde, y el crecimiento o elongación del fragmento que se sintetiza. (Huertas, 2004).

Los fragmentos amplificados se pueden separar y visualizar por electroforesis en geles de agarosa, se tiñen con bromuro de etidio y se visualizan sobre una lámpara UV. La PCR tiene innumerables aplicaciones como el diagnóstico genético, identificación de agentes patógenos, clonación de genes, secuenciación de ADN. También se han derivado una serie de marcadores moleculares basados en la PCR.

**3.9.2 Secuenciación.** Consiste en determinar el orden y cantidad de nucleótidos en una muestra de ADN, por lo que es el análisis o comparación más detallada entre muestras de ADN en estudios de diferenciación genética.

Una de las técnicas de secuenciación de ADN moderna está basada en el “método de terminación de cadena” desarrollado por Fred Sanger en 1977 en Cambridge, Inglaterra. El método de Sanger se basa en dos principios de la síntesis de ADN. El primero es que en la presencia de los cuatro deoxinucleótidos (dNTPs), la ADN polimerasa iniciará la síntesis de una nueva cadena de ADN cuando un primer se hibrida (en un sitio específico) a una sola cadena de ADN (desnaturalizado). El segundo es que si se incluyen en la reacción dideoxinucleósido trifosfatos (ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) la elongación del ADN se detendrá cuando se incorpore un



ddNTP; esto debido a que los ddNTPs carecen de grupo hidróxilo 3' (-OH), que es necesario para la formación del enlace fosfodiéster que une a los nucleótidos adyacentes.

En el protocolo de cycle sequencing (secuenciación de dideoxinucleótidos), se preparan cuatro tubos de reacción (A, T, C, G). Cada una de las reacciones contiene ADN patrón, un primer de secuenciación, ADN polimerasa y los cuatro deoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP,), a las reacciones se añade un solo tipo de ddNTP. La ADN polimerasa agrega al azar dNTPS o ddNTPS que sean complementarios con el ADN patrón. Es necesario que la proporción de los dNTPs con los ddNTPs sea ajustada, de esta forma, se agrega a la cadena 1 ddNTP cada 100 nucleótidos, cada vez que se incorpora un ddNTP la síntesis de ADN se detiene y se genera una cadena de ADN de un tamaño discreto. Luego de las replicaciones, se producen millones de copias del ADN patrón. Cuando se han completado los ciclos de las reacciones se agrega formamida para desnaturalizar las recién sintetizadas cadenas de ADN. (Miklos, Freyer y Crotty, 2003).

Las primeras secuenciaciones se hicieron en geles de poliacrilamida utilizando nucleótidos marcados radioactivamente y exponiéndolos a rayos X. Actualmente se realiza la secuenciación automatizada, utilizando el principio de Sanger pero se cambió los marcadores radioactivos por marcadores fluorescentes que se adhieren a los ddNTPs, cada segmento de ADN termina en uno de los 4 ddNTPs y son detectados por un laser, cuando son interceptados por el laser, cada terminador marcado emite una luz de color de una característica longitud de onda, que luego se interpreta por un software de computadora de la siguiente forma: A verde, T rojo, C azul y G amarillo.

La secuenciación automatizada se lleva a cabo en un equipo llamado Analizador Genético y los resultados de la secuenciación se presentan como cromatogramas, que muestra picos de colores correspondientes a cada posición de los nucleótidos en una cadena de ADN. (Hillis, Moritz y Mable, 1996).



**3.9.3 Alineamiento de secuencias.** El alineamiento es el proceso de comparar dos o más secuencias para conseguir niveles máximos de identidad, con el propósito de evaluar el grado de similitud y posibilidad de homología. Un par de secuencias pueden alinearse colocando una sobre la otra maximizando el número de nucleótidos que coinciden introduciendo *gaps* (*espacios*) en una o la otra secuencia. Biológicamente se asume que esos espacios representan inserciones o deleciones que ocurrieron cuando las secuencias divergieron de un ancestro común. Es necesario restringir el número de espacios para que el alineamiento resultante tenga un sentido biológico, pues si se permite introducir tantos espacios como se quiera, se podría alinear secuencias no relacionadas, por eso se usa un sistema de puntuación para que las coincidencias de los nucleótidos tengan un tipo de puntuación numérica positiva y los espacios una puntuación negativa o *gap penalty*. Para el alineamiento de los ácidos nucleicos las coincidencias tiene un valor de 1 y las diferencias 0. Sin embargo la asignación de los *gap penalties* es un poco más difícil, pues se trata de crear un alineamiento en el que los espacios representen las inserciones o deleciones reales, que ocurrieron durante la divergencia de la secuencia. En muchas ocasiones se utiliza el gap penalty que tiene por defecto el programa, pero se debe tener en cuenta que lo que se busca es minimizar el número y tamaño de los espacios y maximizar la extensión de los bloques conservados, que son regiones en las cuales los nucleótidos se mantiene similares o idénticos en la mayoría de las secuencias. Al disminuir el valor los *gap penalties* permitirá la introducción de más espacios y por ende producirá menores diferencias en el alineamiento, pero esto puede tener como resultado falsas coincidencias que no reflejan homología real. Aumentar el valor tiene un efecto contrario, pues esto puede resultar en la pérdida de diferencias que reflejan homología real. (Hall, 2001).

**3.9.4 Elaboración de los árboles filogenéticos.** Un árbol filogenético es un gráfico o diagrama que representa la historia evolutiva de los grupos bajo estudio. Tradicionalmente los árboles filogenéticos se usan para representar las relaciones históricas entre grupos de organismos, generalmente, especies, y cada grupo se llama taxón. Hace aproximadamente 25 años, las relaciones estaban basadas principalmente en datos sobre caracteres morfológicos, de taxa existente y registros fósiles. Con la



llegada de la secuenciación molecular una increíble cantidad de nueva información está disponible. Un árbol es un objeto que consiste de dos elementos: nodos y ramas. Una rama es una línea que conecta dos nodos, la longitud de las ramas es proporcional a la cantidad de cambio acumulado. Los nodos pueden ser externos, que son las puntas de árbol y representan a los taxa que están siendo analizados e internos, que son puntos que representan ancestros comunes entre dos nodos. Otro término importante a considerar sobre los árboles filogenéticos, son los clados. Todos los descendientes de un ancestro común representados en un solo nodo pertenecen a un mismo clado, definido por ese nodo. También a estos descendientes se les llama Grupos monofiléticos. (Hall, 2001).

Para elaborar árboles filogenéticos, los programas se basan en métodos de distancia, que calculan las distancias por parejas (pairwise distance) entre secuencias moleculares. Esta distancia es el número de sustituciones de ácidos nucleicos que han ocurrido a lo largo de una rama. Para generar un árbol, se crea una matriz de distancias por pareja para todas las secuencias alineadas. El objetivo es crear un árbol, en el que el tamaño de las ramas corresponda lo más cercano posible a las distancias observadas.

En este estudio se utilizó el método de distancias Neighbor joining (NJ), que tiene significado aritmético y es computacionalmente rápido y útil para analizar un gran número de secuencias. (Pevsner, 2009). NJ trabaja con matrices, primero calcula para cada taxón su divergencia neta de todos los otros taxones, que es la suma de las distancias individuales de los taxones. Luego, usa la divergencia neta para calcular una matriz de distancias corregida. Posteriormente, NJ encuentra al par de taxa con la distancia corregida más baja, y calcula la distancia hacia el nodo que los une, para cada uno de esos taxa (la distancia de esos dos taxa hacia el nodo debe ser idéntica). De esta forma se crea una nueva matriz en la que el nuevo nodo se sustituye por esos dos taxa.



Los métodos de distancia, y los análisis filogenéticos en sí están basados en modelos de sustitución de ácidos nucleicos. Para métodos basados en distancias (NJ), se emplean modelos estadísticos para estimar el número de cambios en el ADN que ocurrieron en una serie de comparaciones por pares de secuencias. El modelo *Kimura 2 parameter* ajusta la proporción de transiciones y transversiones, asignando mayor valor a las transversiones para señalar su probabilidad de causar cambios no-sinónimos, en una región codificante. En cualquier región del ADN (incluyendo regiones no codificantes), la proporción transición/transversión corrige el umbral biofísico creando un par purina-purina, pirimidina-pirimidina en la doble hélice. (Pevsner, 2009).

Aún cuando se realiza un árbol filogenético con métodos y modelos estadísticos y se tiene una idea sobre la topología (el orden en el que las secuencias divergen), no se tiene una idea de cuán confiables son las agrupaciones en el árbol. Para tener un mayor grado de confianza, se usa el método *Bootstrapping* que consiste en tomar una sub-muestra de sitios en un alineamiento y crear un árbol basado en esa sub-muestra. El proceso es iterado muchas veces (el número deseado es 100) y los resultados se compilan para permitir un estimado de la confiabilidad del árbol de un grupo en particular. (Hall, 2001).



#### **IV. Materiales y Métodos**

La investigación se realizó en dos etapas principales: La recolección de muestras en lagos y lagunas de Nicaragua, y los procedimientos experimentales en el Centro de Biología Molecular, de la Universidad Centroamericana.

##### **4.1 Recolección de Muestras**

Las muestras de peces se colectaron en el período Enero-Marzo 2008, con la colaboración de Matthias Geiger (*Zoologische Staatssammlung München*) y Jeffrey McCrary (*FUNDECI-GAIA*), se muestrearon un total de 14 sitios entre lagunas, lagos y ríos. (ver Figura 12 A, B). Esta colaboración consistió en apoyo logístico para colectar las muestras.





**Figura 12.** A. Lagunas muestreadas B. Sitios muestreados en el Lago de Nicaragua, Managua y Río San Juan. (Tomado de Google Earth 2011)

Para la captura de los peces se utilizaron redes de agalla y arpón. Los peces se sacrificaron utilizando anestesia comercial, y se tomó como muestra una aleta pectoral que se colocó en tubos con etanol 100%, para luego conservarse en refrigeración a -20° C. Cada espécimen fue debidamente fotografiado y se anotaron datos de campo como código (siendo 519 la muestra No.1 y 820 la muestra No.239), familia, localidad, coordenadas geográficas. Cuando fue posible se les identificó de acuerdo a las descripciones más recientes de especies del Complejo; en caso contrario, se rotuló a los individuos como *A. sp* o *A. citrinellus*. Las muestras de aleta se encuentran preservadas en el Centro de Biología Molecular de la UCA, debidamente rotuladas y los individuos colectados están almacenados permanentemente en la Bavarian State Collection en Munich, Alemania.

## 4.2 Análisis de laboratorio

**4.2.1 Extracción de ADN.** El ADN genómico se extrajo a partir de tejido de la aleta pectoral. Se utilizaron dos diferentes métodos: Extracción orgánica y kit comercial.

*Extracción orgánica: Protocolo modificado de Lopera-Barrero et al, 2008 adaptado a tejido de aleta pectoral de peces del complejo Midas Cichlidae.*

En un microtubo se colocó aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup> de tejido y se añadió 550µl de Tampón de Lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl), SDS 1% y 7 µl de Proteinasa K 70µg/ml. Se mezcló e incubó en baño María a 60°C durante 1 hora, homogenizando las muestras cada 15 minutos. Posteriormente se adicionó a cada tubo 600 µl de NaCl 5 M, y se centrifugó durante 10 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a microtubos nuevos y se les



adicionó igual volumen de Fenol-cloroformo-alcohol isoamil (25:24:1) se homogenizó y centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a microtubos nuevos y se agregó 1 volumen de isopropanol más 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M.

Para la precipitación del ADN primeramente se incubó a -20°C por 2 horas y posteriormente se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el sedimento o pellet y se le agregó 700 µl de etanol al 70%, se centrifugó en las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante. El ADN se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 80 µl de TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). Finalmente, para eliminar el ARN, las muestras fueron tratadas con 3 µl de ARNasa, dejándolas en baño María a 37° C por 40 min.

Para comprobar la condición del ADN obtenido se realizó electroforesis en geles de agarosa al 0.8% utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M). El ADN se tiñó con bromuro de etidio (10mg/ml). Como referencia se usó un marcador de peso molecular de 1Kb (New England Biolabs). El ADN se visualizó bajo luz ultravioleta (UV) en un transluminador y se fotografió utilizando una cámara Canon modelo SD1200 IS de 10.0 mega pixeles.

#### *Extracción con Kit comercial Phire® Animal Tissue Direct PCR*

Es un kit diseñado para realizar la PCR directamente de tejido animal que no ha tenido previamente un proceso de extracción de ADN. Su uso es adecuado al utilizar tejidos de ratón, pez y Drosophila. El Kit utiliza una polimerasa especial llamada Phire® Hot Start II diseñada con un sitio de unión que mejora la actividad de la enzima. Además, Phire® Hot Start II presenta alta resistencia a muchos inhibidores de la PCR que se encuentran en el tejido animal. El fabricante recomienda dos protocolos, uno directo que consiste en agregar el tejido animal directamente a la reacción de PCR y un protocolo diluido, que se utilizó en este estudio y consiste en cortar tejido de la aleta con una ponchadora



(incluida en el kit, 0.5mm) y colocarlo en 20µl de solución de dilución, luego incubar en baño maría a 98° C por durante 2 minutos y almacenar a -20° C hasta ser utilizado. (<http://www.neb.com/nebecomm/ManualFiles/manualF-140.pdf>).

**4.2.2 Amplificación por PCR.** El gen COI se amplificó utilizando el *kit Taq PCR* (New England BioLabs) con las siguientes modificaciones, cada reacción contiene: buffer de reacción estándar de Taq (1X), 0.05mM dNTP's, 0.5 uM cada primer (IDT, FishF1-5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3', FishR1-5'TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA 3'), y 0.025 U/µl de enzima Taq polimerasa en un volumen final de 50 µL. Se utilizó un termociclador ABI 2720 programado para desnaturalización inicial del ADN a 94° C por 2 min, 35 ciclos que comprenden:

- a. Desnaturalización a 94 ° C por 30 segundos.
- b. Hibridación a 55° C por 40 segundos.
- c. Elongación a 72° C por 1 min, con una extensión final de 72° C por 10 min.

Para amplificar las muestras directamente del tejido, se utilizó la enzima Phire Hot Start II siguiendo las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones: 2X Phusion Phire Animal Tissue PCR Buffer (incluye dNTP's y MgCl<sub>2</sub>), 0.25 uM cada primer (IDT, FishF1-5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3', FishR1-5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA 3'), y 0.8 U de Phire Hot Start II en un volumen final de 20 µL. Se utilizó un termociclador ABI 2720 bajo las siguientes condiciones: primer ciclo de desnaturalización de ADN a 98° C por 30seg, 25 ciclos de desnaturalización a 98 ° C por 5 seg, hibridación a 62° C por 40 s, y elongación a 72° C por 20 seg, con una extensión final de 72° C por 5 min.

Los productos de PCR migraron en geles de agarosa al 1.4 % en una cámara de electroforesis utilizando buffer TAE 1X y luego se tiñeron con bromuro de etidio (10mg/ml). Como referencia se usó un marcador de peso molecular de 100pb (New England Biolabs). El ADN se visualizó bajo luz ultravioleta (UV) en un transluminador. Se tomaron fotografías de los geles utilizando una cámara Canon modelo SD1200 IS de 10.0 mega pixeles.



**4.2.3 Secuenciación.** Las muestras se secuenciaron directamente usando el Big Dye Terminator Kit (ABI). A las muestras producto de la PCR convencional se les realiza cycle sequencing siguiendo las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones: 1  $\mu$ l Big Dye Terminator (mezcla de polimerasa y dideoxinucleótidos fluorescentes), 2  $\mu$ l de buffer Big Dye Terminator, 40 mM Primer, 2.5  $\mu$ l de producto de PCR y 3.7  $\mu$ l de agua destilada, luego se realizó cycle sequencing utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial 96°C por 1 min, 25 ciclos de desnaturalización a 96°C por 10 seg, hibridación a 50°C por 5 seg y elongación a 60°C por 4 min, a una temperatura de almacenaje de 4°C.

Las reacciones producto del cyclesequencing se purificaron utilizando un protocolo estándar Etanol/Acetato de Amonio que consiste en añadir al producto 10  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 60  $\mu$ l Acetato de Amonio 7.5 M con Etanol 100%. Se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm y se descartó con cuidado el sobrenadante al que se le añadió 500  $\mu$ l de etanol 70%. Se centrifugó durante 2 min a 12000rpm, y nuevamente se descartó el sobrenadante, y se dejó secar completamente. Luego el ADN se resuspendió en 10  $\mu$ l de formamida y se colocó en una placa de secuenciación. Se desnaturalizó por 5 min, para posteriormente ser analizados en un Analizador genético ABI 3130 siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Debido a que la secuenciación es una técnica en la que se invierten reactivos de alto costo, se decidió secuenciar únicamente 70 muestras del total, además, este estudio es parte de un proyecto cuyos objetivos son utilizar las muestras que se conservan en el Centro de Biología Molecular en análisis posteriores en los que se incluirán el total de las muestras

Las 70 muestras secuenciadas se escogieron de tal forma que se abarcaran todas las localidades (Tabla 1).

**Tabla 1.** No de secuencias por localidad

Localidad	Secuencias
Tiscapa	3
Apoyeque	6



Xiloá	18
Apoyo	13
Asososca León	4
Monte Galán	3
L. Nicaragua	12
L. Managua	6
Río San Juan	5
Total=	70

#### 4.3 Análisis de las secuencias

**4.3.1 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).** Los resultados de secuenciación se obtienen en forma de cromatogramas y diferentes tipos de archivos que se leen en distintos programas para su análisis. Para conocer si la secuencia que se obtuvo es del gen de interés se utilizó la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponible en el sitio web de el National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El BLAST encuentra las regiones de similitudes entre las secuencias locales. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas en estudio con secuencias existentes en bases de datos y calcula estadísticamente la significancia de estas similitudes. De esta comparación se obtuvieron todas aquellas secuencias que son similares a la que se sometió al análisis, y algunos valores importantes para cada secuencia como el *Bit score* que se calcula asignando una puntuación de 1 para cada coincidencia y 0 para las que no coinciden. A medida que el *Bit score* es mayor, la secuencia está relacionada más cercanamente con la que se sometió al análisis. Otro valor es el *E value*, que es el número de coincidencias con la base de datos de secuencias actuales no redundantes que se espera por azar. Mientras el *E value* es menor, se espera que la similitud de las secuencias es real y no por azar, es decir, que las similitudes reflejan descendencia común. (Hall, 2001).

**4.3.2 Edición y alineamiento de las secuencias.** Luego de corroborar que se tuvo la secuencia del gen deseado, se procedió a realizar la edición de las secuencias utilizando el programa BioEdit (TA Hall, 1999), que consistió en hacer una revisión visual de los cromatogramas y corregir los nucleótidos que aparean superpuestos.



Posteriormente se concatenaron las secuencias en un archivo fasta que facilita el posterior alineamiento y análisis filogenético. Además se eliminaron aquellas secuencias menores a los 500 pares de bases. Por último, se cambió los nombres de las secuencias, para facilitar la interpretación de los resultados, se nombraron de la siguiente forma: Número de muestra, localidad y nombre científico, por ejemplo 767-LMgua-A labiatus.

Para hacer los alineamientos, se concatenaron todos los archivos AB1 en un archivo fasta, que es el tipo que reconoce el programa. Los alineamientos se hicieron en el programa *MEGA-5b*, utilizando el algoritmo *ClustalW1.6* (Larkin et al, 2007) con los valores de procesamiento estándar (Gap opening penalty = 15, Gap extensión penalti = 6.6).

**4.3.3 Elaboración de los árboles filogenéticos.** Se utilizó el programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis *MEGA-5b* (Kumar et al; 2008), con el método de distancia *Neighborjoining* y el modelo de sustitución *Kimura 2 parameter (K2P)*. Se hizo prueba de bootstrapping con mil réplicas.

#### **4.4 Aporte al Proyecto Código de Barras Genético**

Una parte importante es la creación de un Proyecto en línea en BOLD Systems (Barcoding of life Data System <http://www.boldsystems.org/views/projectmenu.php?&>), si bien en los objetivos no se planteo la realización del proyecto, es importante señalar este logro, ya que es el primero de este tipo para Nicaragua.

El proyecto consiste en un biorrepositorio de material genético (ADN), tejido, secuencias del gen COI, fotografías, información, taxonómica y de colecta para todos los individuos colectados. Esto se almacena en BOLD Systems, de forma accesible, ordenada y fácil de localizar.



## V. Resultados y Análisis

### 5.1 Recolección de muestras

Se colectaron un total de 239 muestras, provenientes de 7 lagunas, lagos Cocibolca y Xolotlán y Río San Juan (Tabla 2). De cada espécimen colectado se conserva: aleta pectoral (Centro de Biología Molecular) individuo completo (Bavarian State Collection) fotografías y hojas de campo (ver Anexo 1).

**Tabla 2.** Muestras colectadas en de Lagos y Lagunas de Nicaragua.

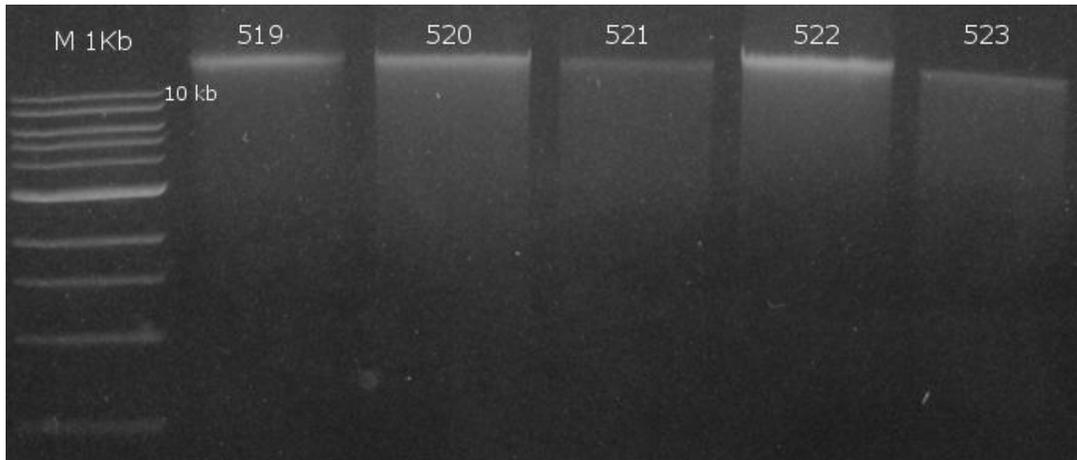
Lagunas	Muestras colectadas
Tiscapa	7
Apoyeque	18
Xiloá	52
Apoyo	26
Asososca León	16
Moyuá	4
Monte Galán	6
Lagos	
Cocibolca	
San Miguelito	16
San Carlos	17
Isletas de Granada	21
Puerto Díaz	25
Xolotlán	
Mateare	12
Río San Juan	
A 10 km de San Carlos	19
Total = 239	

### 5.2 Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico de 239 muestras, utilizando dos diferentes métodos: la extracción orgánica y kit comercial. Con la extracción orgánica se obtuvo ADN genómico del total de las muestras (239) se almacenaron aproximadamente 50µl, que puede ser utilizado en análisis posteriores. Con el kit comercial se extrajo un total de 70 muestras, de las que se conservó 20 µl. El ADN obtenido por la extracción orgánica resulto de buena calidad, ya que fue de alto peso molecular y las bandas se apreciaron bien definidas (Foto 1). Sin embargo hubo algunas muestras en las que se pudo apreciar un barrido debido a la degradación del ADN y durante el proceso de



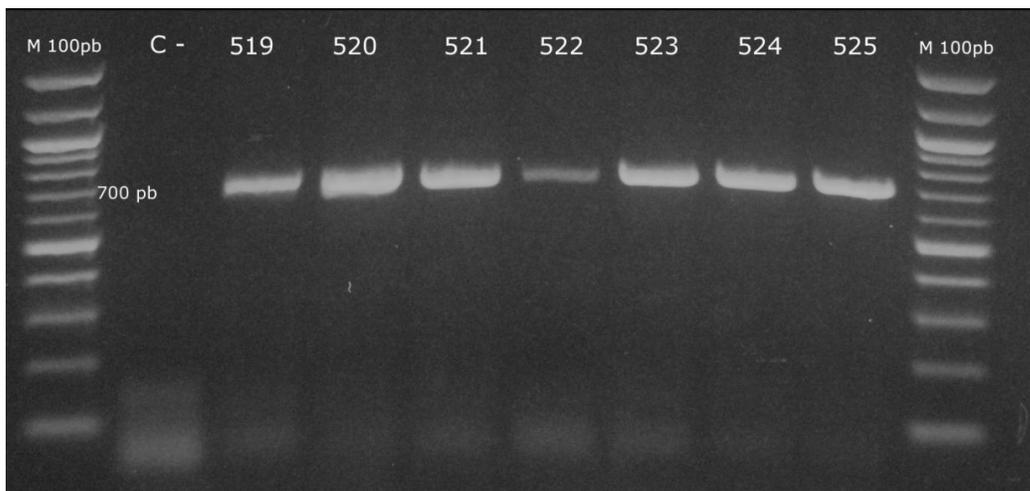
extracción o por contaminación con proteínas que no fueron eliminadas adecuadamente. El ADN producto del kit, no se verificó en geles de agarosa, debido al poco volumen final (20 $\mu$ l), y al cargar en un gel 2  $\mu$ l diluidos en agua, no fue posible apreciar la banda, debido a la baja concentración de ADN.



**Foto 1.** Gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio, ADN genómico aislado de tejido de aleta pectoral.

### 5.3 Amplificación por PCR

Se realizó PCR utilizando la enzima Taq y el kit Phire® Animal Tissue Direct PCR. Con ambos métodos se obtiene un producto aproximadamente de 700 pb, y únicamente bandas específicas. (Foto 2)



**Foto 2.** Gel de agarosa 1.4 % teñido con bromuro de etidio, Amplificación gen COI (fragmento aprox 700 pb)

### 5.4 Secuenciación



Para secuenciar el segmento del gen COI se hicieron ensayos, con 10 muestras, tomadas al azar con el fin de optimizar la metodología. El primer ensayo se realizó con las muestras producto de la amplificación con la enzima Taq. El resultado de este ensayo fueron cromatogramas con mucha inespecificidad en la asignación de los nucleótidos o incluso cromatogramas en los que no se obtuvo ningún resultado (ver Anexo 2A). Esto debido posiblemente a inespecificidades de la enzima al momento de asignar las bases nitrogenadas o por inhibidores de la PCR durante el cyclesequencing, por lo que se decidió hacer pruebas con las muestras producto de la amplificación con la enzima Phire® Hot Start II, utilizando kit Phire® Animal Tissue Direct PCR ya que el ADN que se obtiene es más puro, y el kit ofrece resistencia a muchos inhibidores de la PCR, la enzima que se utiliza presenta una mejor actividad y es más fidedigna al asignar las bases adecuadas. Los cromatogramas por lo tanto, no presentaron gran cantidad de inespecificidad ni background (ver Anexo 2B).

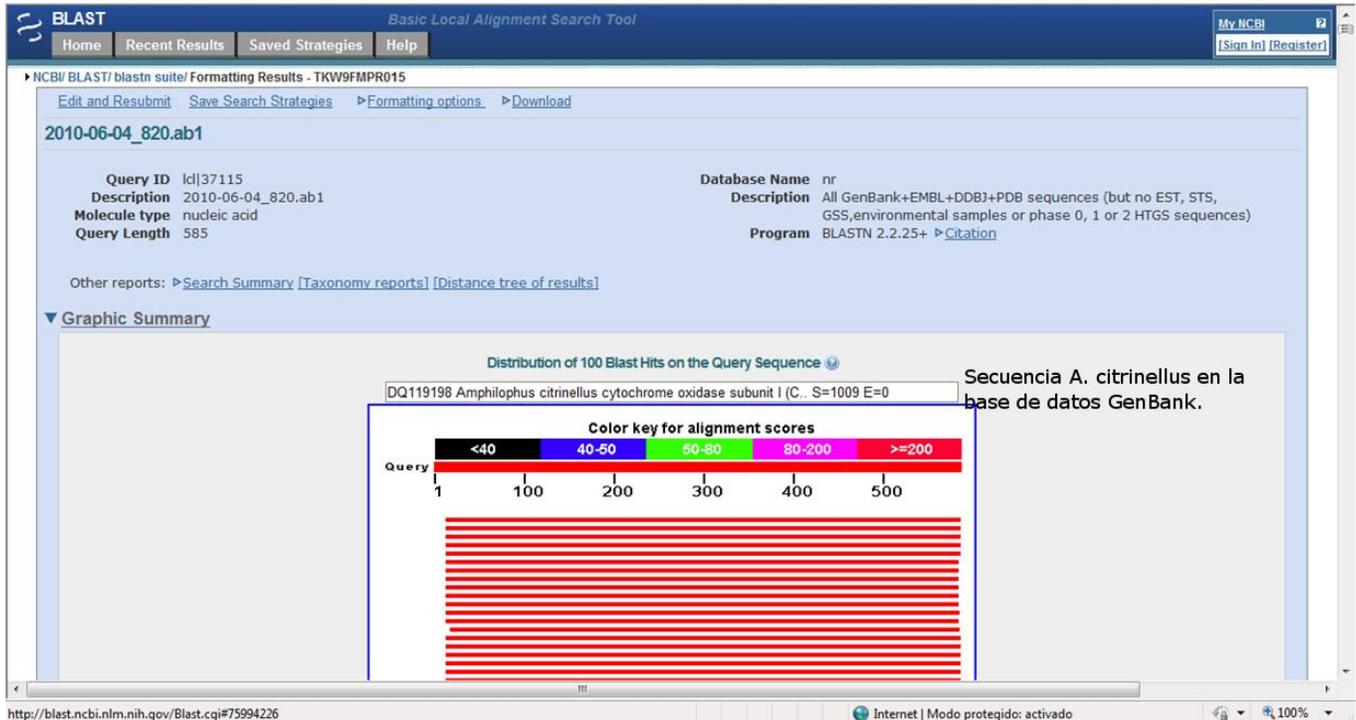
Luego de la secuenciación, el Analizador Genético ABI3130 emite los resultados en archivos de tres diferentes tipos de formatos: archivo AB1, .phd, y archivo SEQ. Las secuencias tuvieron una longitud entre 500 a 800 pb. Los archivos AB1, se visualizaron en forma de cromatogramas utilizando el programa *BioEdit*, de esta manera, se pudo ver la calidad de las secuencias, y editarlas visualmente, además de cambiar los nombres.

## 5.5 Análisis de las secuencias del gen COI

**5.5.1 BLAST.** De cada una de las secuencias se hizo BLAST, para tener seguridad de que se estaba secuenciando el segmento adecuado del gen COI. La mayoría de las muestras coincidió con secuencias reportadas para especies del género *Amphilophus* o especies de la familia Cichlidae, específicamente la primera opción de coincidencia fue una secuencia de *Amphilophus citrinellus* proveniente de un estudio sobre cíclidos en las Antillas (Chakrabarty, 2006, con valores de *Bit score* altos que indican relación de cercanía y *E-values* bajos que indica el número de coincidencias. (Ver Figura 13).



Cuando al realizar el BLAST las muestras no coincidían con secuencias reportadas del gen COI para especies del género, se repetía nuevamente la secuenciación, como por ejemplo en la muestra 810, (ver Anexo 3), ya que si se incluye en el análisis filogenético una muestra no homologa a las demás, se dan errores en el alineamiento y en la constitución del árbol filogenético.

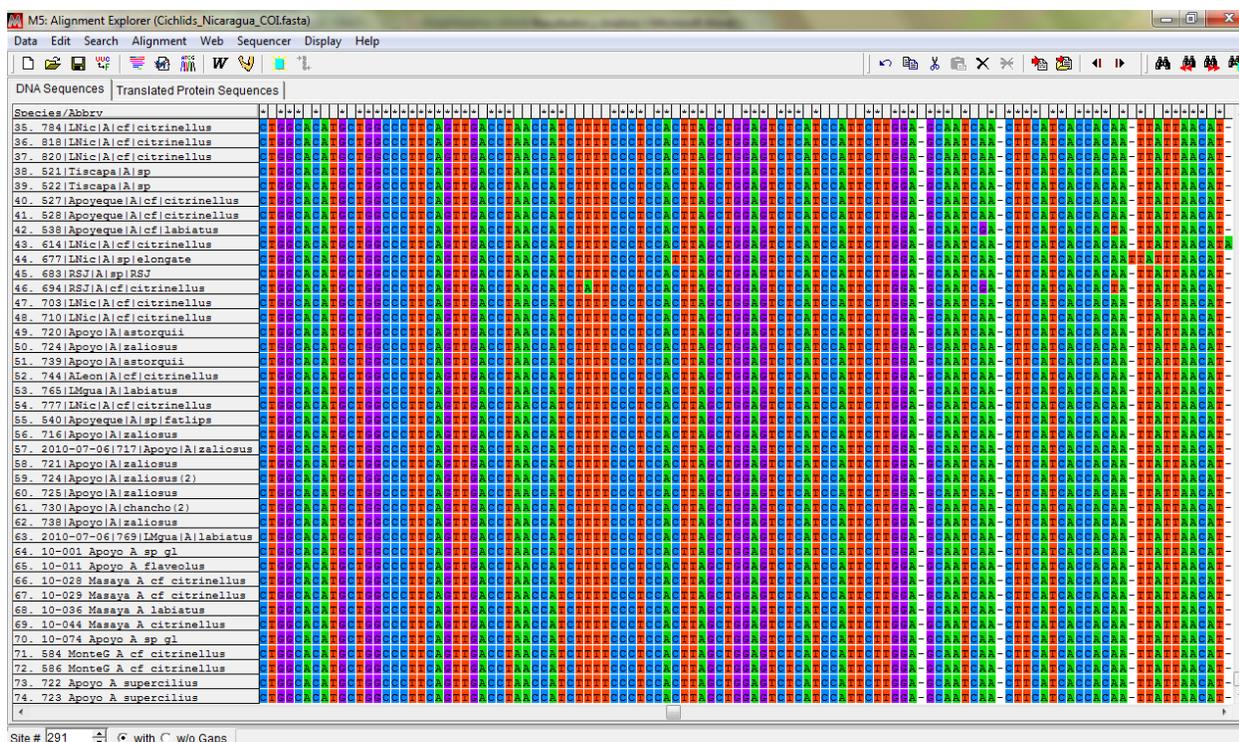


**Figura 13.** BLAST de secuencia para conocer si se estaba secuenciando el segmento adecuado de COI.

**5.5.2 Alineamientos.** Luego de hacer el BLAST de las secuencias, se procedió con los alineamientos. Los alineamientos se repitieron varias veces, dado que se debieron recortar aproximadamente los primeros 80 y últimos 100 pares de bases, ya que en estas posiciones hay muchas variaciones debido a errores de secuenciación (Anexos 4), cada vez que se realizaba edición en las secuencias, se tenía que repetir el alineamiento. Como resultado final se obtuvo un alineamiento (ver Figura 14), en el que no se incluyeron secuencias que diferían del cohorte, y que por lo tanto provocaban la



presencia de *gaps* muy frecuentes o extensos, que pudiesen resultar en “falsos grupos” al momento de elaborar el árbol filogenético.



**Figura 14.** Alineamiento de las secuencias utilizando el programa *MEGA-5b*, algoritmo *ClustalW*.

**5.5.3 Elaboración de árboles filogenéticos.** Primeramente se realizó un árbol, en el que se incluyó a las muestras de todas las localidades (ver Figura 15), además, de un grupo externo (*Oreochromis niloticus*), esto para lograr tener una idea general de las relaciones entre las especies.

Es necesario tomar en consideración que este grupo de peces desde los primeros intentos de clasificación han sido objeto de discusión, debido a que algunos son muy parecidos morfológicamente y no fue posible diferenciarlos y clasificarlos bajo ese criterio, considerándose que solamente existía una especie y que esta presentaba diferentes formas. (Mckaye y Stauffer, 2002). En los últimos 10 años se han reportado 8 nuevas especies endémicas y se piensan que son muchas más. El proceso de



especiación ha sido muy debatido, ya que estas especies tienen que haber evolucionado en un corto período de tiempo en espacios reducidos, compartiendo sitios de apareamiento y alimentación (Stauffer, McCrary y Black, 2008), por lo tanto una de las teorías más aceptadas, basada en evidencias geológicas, filogeográficas y de genética poblacional, es que las poblaciones más antiguas se encontraron en el lago de Nicaragua, y a partir de estas se originaron las poblaciones de las lagunas, primero hubo especiación alopátrica cuando los peces colonizaron las diferentes lagunas y dejaron el lago, posiblemente por fenómenos naturales como huracanes o aves piscívoras o por introducciones humanas, seguido de diversificación temprana dentro de las lagunas y especiación simpátrica causada por adaptaciones sexuales y ecológicas (Elmer et al, 2010a).

La reciente evolución de estas especies, y la posibilidad de que algunas todavía estén atravesando un proceso de especiación (Elmer et al, 2010b), además, que ha sido demostrado que más del 50% de las especies de las diferentes lagunas comparten haplotipos (Barluenga y Meyer, 2004), ocasiona que el gen COI no logre diferenciar a nivel de especie los diferentes grupos. Un ejemplo claro de esto es la proliferación de peces cíclidos en el lago africano Victoria, alrededor de 200 especies endémicas se encuentran ahí a pesar que el lago es reciente, menos de 1 millón de años. A estas especies se les hizo un análisis genético utilizando marcadores mitocondriales y el resultado determinó secuencias casi idénticas, por lo que se interpreta que el complejo de especies en este lago evolucionó en unos cuantos miles de años, un período de tiempo corto en relación a la diversificación dentro de otros grupos de especies de vertebrados. (Avice, 2000).

La diferenciación ecológica es evidente y las especies tienen un mecanismo de aislamiento precigótico muy fuerte, hay algunas que se aparean en espacios cercanos (McKaye, 1980). Además, ha sido demostrado que la especiación ecológica puede ocurrir mucho más rápido que la evolución de los marcadores genéticos neutros, que no logran detectar estas variaciones, sin embargo la ausencia de diferenciación genética no refuta la especiación ecológica (Elmer et al, 2010b). Los científicos concuerdan en



que las relaciones entre los miembros de Midas Cichlidae son complejas (Wilson et al, 2000), y aún cuando se han realizado estudios ecológicos y genéticos, utilizando diferentes marcadores nucleares y mitocondriales, muchas veces la información filogenética de estos no conduce a resultados congruentes. Hay factores relacionados con el muestreo que pueden afectar la investigación como el período de colecta de las muestras, las técnicas que se utilizan para colectarlas y los sitios de muestreo, es necesario tener conocimiento de lo antes mencionado, ya que es posible que se colecte muestras en un sitio dónde solamente habita una especie, o utilizando artes de pesca inadecuados y no colectar todas las posibles especies de una laguna.

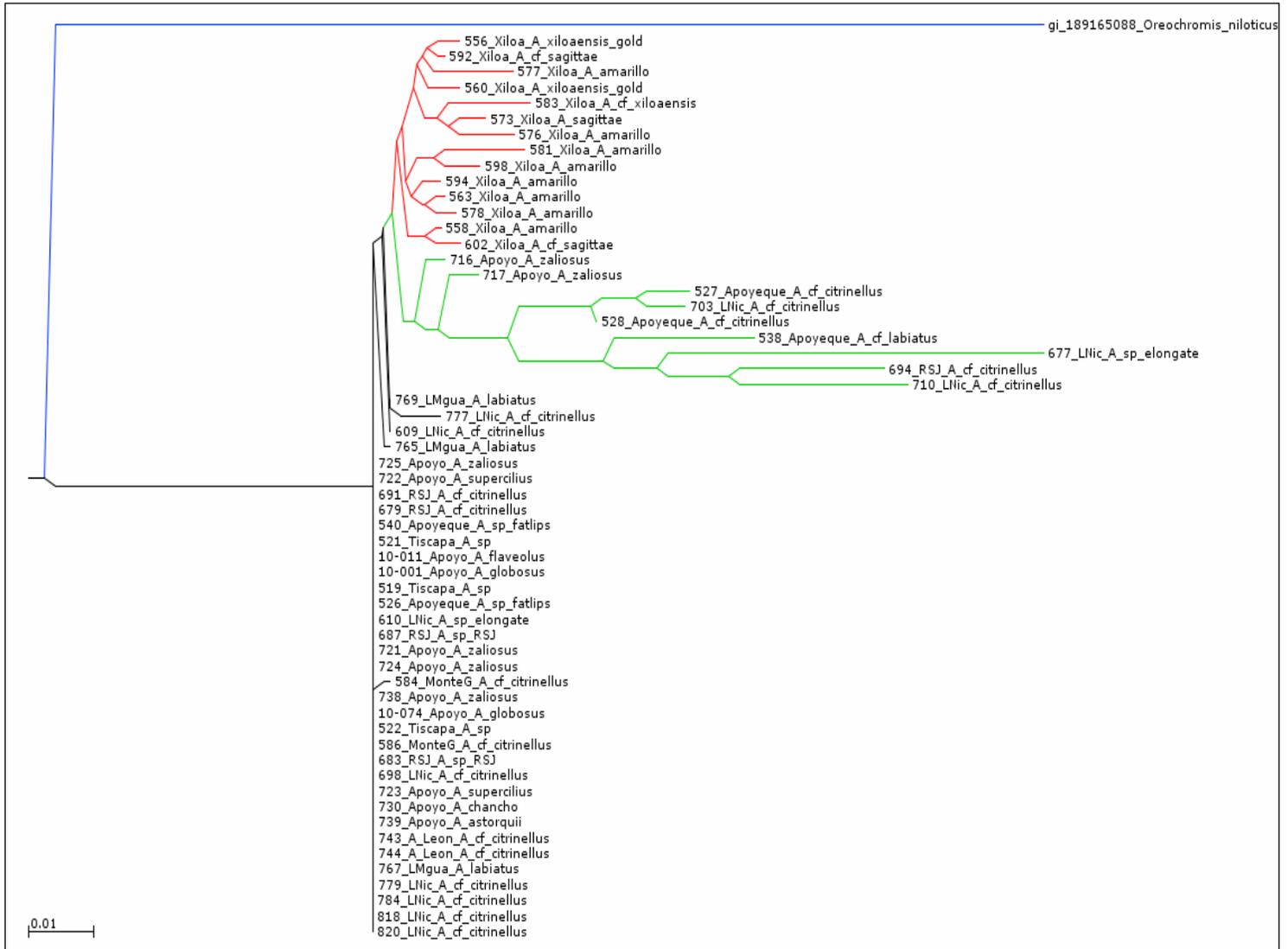
Debido a los motivos antes señalados, en la figura 15 se observa que los especímenes en el árbol, no están agrupados siguiendo patrones de localidad o especie, exceptuando a los individuos de Xiloá. Los especímenes de la laguna de Xiloá forman un clado distinto, aunque no se logran agrupar por especie. Ha sido demostrado que la laguna de Xiloá contiene la mayor variación y riqueza alélica, (Vivas y Mckaye, 2001) además está comprobado que las especies son más parecidas entre sí genéticamente dentro de las lagunas que entre lagunas, por lo tanto se explica que las especies del Xiloá formen un clado separado.

Se debe tomar en cuenta que algunos estudios proponen la especiación basándose en colores en la laguna de Xiloá, ya que hay evidencia que la especies *Amphilophus xiloaensis* y *A. sagittae* (genéticamente distintos utilizando marcadores neutros) que presentan forma “normal” y “dorada”, se aparean de acuerdo al color, lo que podría llevar en un futuro a que se convirtieran en especies distintas (Elmer et al, 2009).

Es notable que las especie de Apoyo, *A. zaliosus*, aparece como la más cercana al grupo de especies de Xiloá, lo que se explica debido a que ecológica y genéticamente (Waid et al, 1999) estas lagunas son las más parecidas, además, *A. zaliosus* es la especie más diferenciada (morfológica y genéticamente) en el grupo de Apoyo, por lo que es probable que se separe de los otros grupos de su localidad.



Como se observará en los árboles posteriores, el conjunto de especies del lago de Nicaragua, no forma un grupo monofilético, no se agrupa de acuerdo a su identidad geográfica o taxonómica, además, no se sabe con exactitud cuántas especies del complejo conviven en el lago. Los especímenes del lago de Managua (769, 765) se agrupan con algunos del Lago de Nicaragua (777, 609) algo que se espera debido a la antigua conexión entre estos lagos (Villa, 1976). Además, que las especies que lo habitan son *A. citrinellus* y *A. labiatus*, y ha sido demostrados que la diferenciación genética entre estas especies es leve ya que comparten múltiples haplotipos. (Elmer et al 2010b). Otra observación importante, es el grupo que forman especímenes del lago de Nicaragua, Río San Juan y laguna de Apoyeque, La relación entre el lago de Nicaragua y Río San Juan se explica a razón del fluctuación genética que pueda ocurrir entre las especies de estos sitios debido a su conexión. La relación con la laguna de Apoyeque es posiblemente debido a que en los individuos que ahí habitan, se ha encontrado solamente el haplotipo más común, procedente de las especies fundadoras del Lago de Nicaragua, y a que la colonización es reciente por lo tanto no ha habido diferenciación de sus ancestros, lo que se soporta debido a que la laguna se formó por una erupción que ocurrió hace tan sólo 1900 años. (Geiger, McCrary y Schiliewen, 2010).



**Figura 15.** Árbol Neighbor-Joining basado en el gen Citocromo C oxidasa subunidad I (región mitocondrial). Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método Kimura 2 parameter y son unidades expresadas en el número de sustitución de bases por sitio.

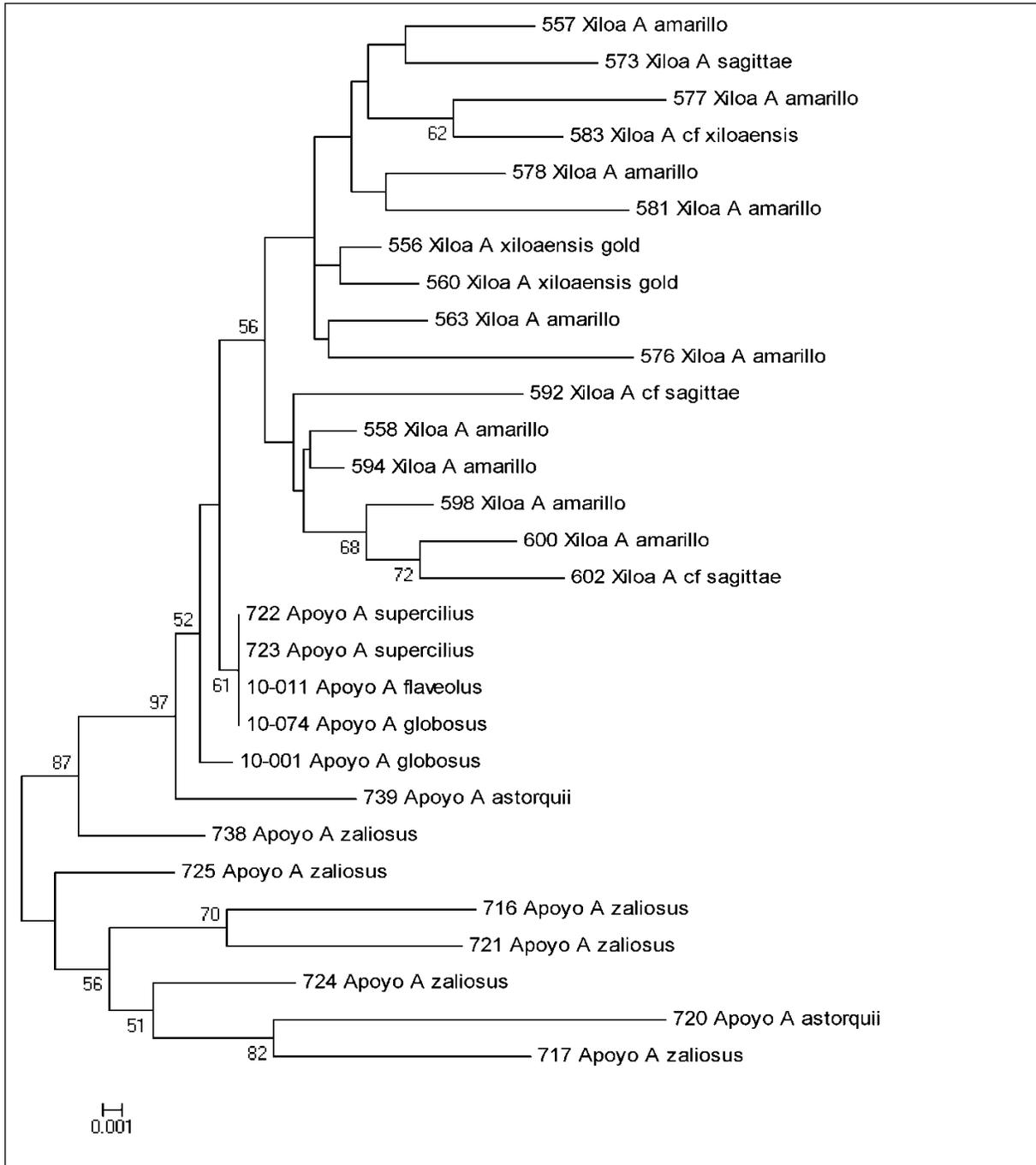
Este estudio se realizó utilizando el gen COI con el fin de implementar la iniciativa internacional Código de Barras Genético, a como se mencionó anteriormente, el gen no ha sido capaz de discriminar a los miembros del complejo a nivel de especie. En África, se realizaron estudios pilotos con el fin de conocer la utilidad de los “Barcodes” en la identificación de especies de cíclidos, pero los resultados no fueron concluyentes. En un estudio de Código de barras en peces Mexicanos de agua dulce (Valdez et al, 2009),



en el cual se contó con algunas muestras de peces del complejo, se concluyó que para este caso particular (Midas Cichlidae), el uso de un solo gen (COI) no es suficiente para la identificación de las especies. Sin embargo, en este estudio se demuestra (ver Figura 16), que el gen COI permite discriminar entre especies de diferentes localidades, como es el caso de la laguna de Apoyo y Xiloá. Tomando en cuenta el principio de que las especies están más relacionadas entre sí, que entre especies de diferentes lagunas, se elaboró un árbol con las especies de estas localidades.

Se ha demostrado que la ecología y especies que habitan en Xiloá y Apoyo son muy similares, además, que en otros estudios donde se han utilizado marcadores mitocondriales y nucleares, las especies de ambas lagunas aparecen formando un grupo. (Geiger, McCrary y, Schilliewen, 2010).

Los cíclidos habitan también lagos africanos, en dónde se presenta especiación simpátrica en condiciones similares a las de nuestros lagos. Un aspecto importante de estas similitudes es la evolución convergente que ha ocurrido en el Lago Malawi y Tanganica (ver anexo 5), se piensa que las especies, limnéticas *A. zaliosus* de Apoyo y *A. sagittae*, que son elongadas, ambas con mandíbulas faríngeas papiliformes, han tenido procesos de evolución paralela guiados por fuerzas ecológicas similares. Aunque en el árbol filogenético, no se logra apreciar esta relación, es importante señalar que a como estas especies están siendo guiadas por fuerzas evolutivas semejantes, puede ser que genes co-específicos estén envueltos en estos procesos y sean compartidos por ambos grupos de especies en Apoyo y Xiloá.



**Figura 16.** Árbol Neighbour-Joining de las lagunas Xiloá y Apoyo basado en el gen Citocromo C oxidasa sub unidad I (región mitocondrial). En las ramas se muestra el porcentaje de replicas en las que los taxa se agruparon en el test de bootstrap (1000 replicas). Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método P-distancia y son unidades expresadas en el número de sustitución de bases por sitio.



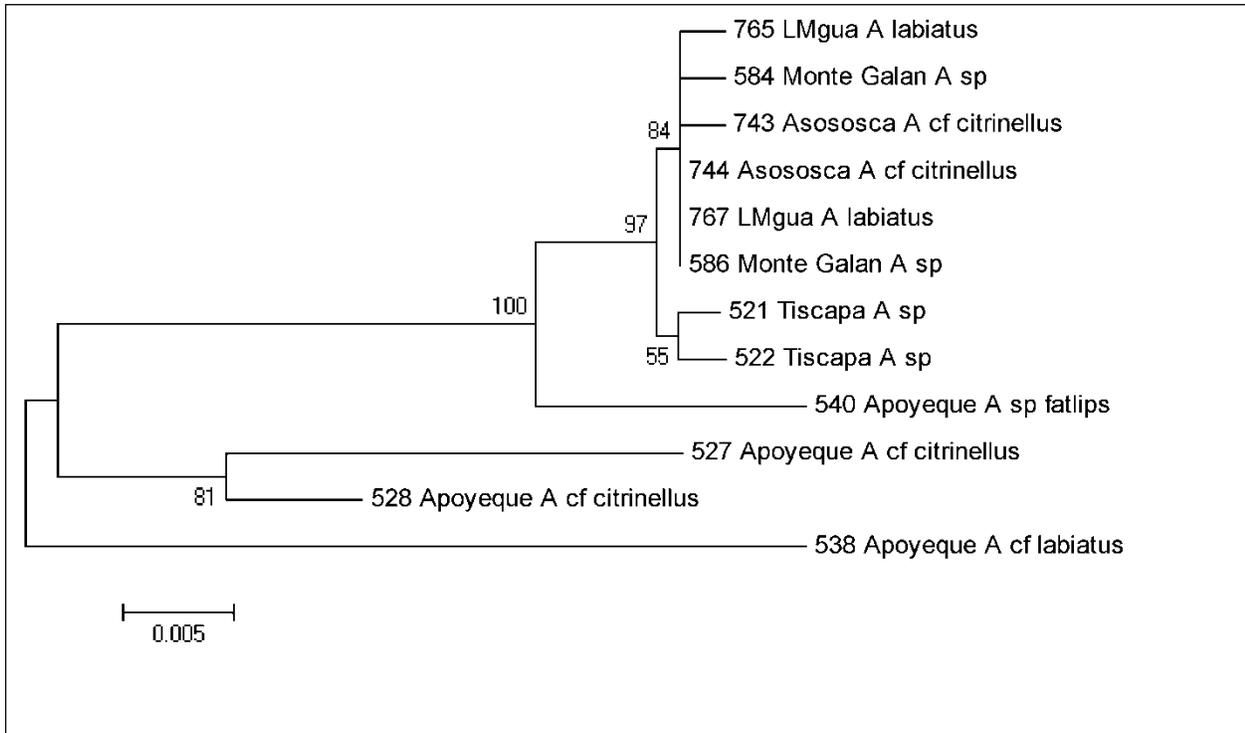
Son muchos los estudios que se han realizando a las especies del Complejo, incluyendo ecología, comportamiento y genéticos. Los estudios filogenéticos son concluyentes en cuanto a utilizar diferentes marcadores para el análisis de las relaciones entre los individuos que habitan las lagunas y a la vez entre los que habitan diferentes lagunas. En la figura 17, se presenta un árbol de las especies de Asosca León, Apoyeque, Tiscapa, Monte Galán y Lago de Managua, se agruparon de esta forma ya que se sabe que todas fueron colonizadas por especies provenientes del Lago de Nicaragua, y que dichas especies, por la cercanía geográfica de estas lagunas, compartan información genética.

Las especies de Apoyeque forman un grupo aparte, y por las distancias (largo de las ramas) se puede asumir que son especies diferenciadas, es decir que pueden ser diferentes especies del complejo habitando en la laguna. Se observa que hay tipo 'normal' y tipo 'labiatus', y estos forman claramente grupos distintos, este hallazgo es muy importante, pero se necesita demostrar mediante otros estudios la presencia de nuevas especies, principalmente porque esta laguna ha sido poco estudiada. Estos resultados indican que hay especiación en una laguna de origen reciente (1900 años), que puedan estar conviviendo al menos dos especies del complejo.

En estudios recientes de filogenética (Elmer et al, 2010b y Geiger, McCrary y, Schiliewen, 2010), se ha demostrado la relación cercana entre especies de Asosca León y y Monte Galán, además que morfológicamente son las más similares entre sí y similares a la media del compeljo. Estas relaciones se ven reflejadas en el árbol, E (ver Figura 17), y se piensa que debido a sus afinidades geográficas, las especies se encuentran formando un grupo con el Lago de Managua. En el pasado el lago de Managua estuvo conectado con el lago de Nicaragua, luego se separaron y cada uno tiene su propia ictiofauna. Está claro que el lago de Nicaragua contiene a las especies fundadoras del complejo, sin embargo, se piensa que aunque se diferenciaron después de la separación, aun comparten informción genética y morfología. Se presume que las especies fundadoras de las lagunas Tiscapa, Monte Galán y Asosca



León, provenieron del lago de Managua. Las especies de la laguna de Tiscapa aparecen como grupo hermano de las anteriormente mencionadas.



**Figura 17.** Árbol Neighbor-Joining de las lagunas Monte Galán, Tiscapa, Apoyeque, Asososca León y Lago de Managua basado en el gen Citocromo C oxidasa sub unidad I (región mitocondrial). En las ramas se muestra el porcentaje de replicas en las que los taxa se agruparon en el test de bootstrap (1000 replicas). Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método P-distancia y son unidades expresadas en el número de sustitución de bases por sitio.

Finalmente, se elaboró un árbol que contiene a las especies del Lago de Nicaragua y Río san Juan, de antemano se sabe que es muy probable el intercambio genético entre estas especies, ya que no hay una barrera geográfica que los separe y el flujo es constante.

Se piensa que dado la extensión del lago, es muy probable que aquí se encuentren más de dos especies del complejo, que ocupan distintos nichos y hallan evolucionado

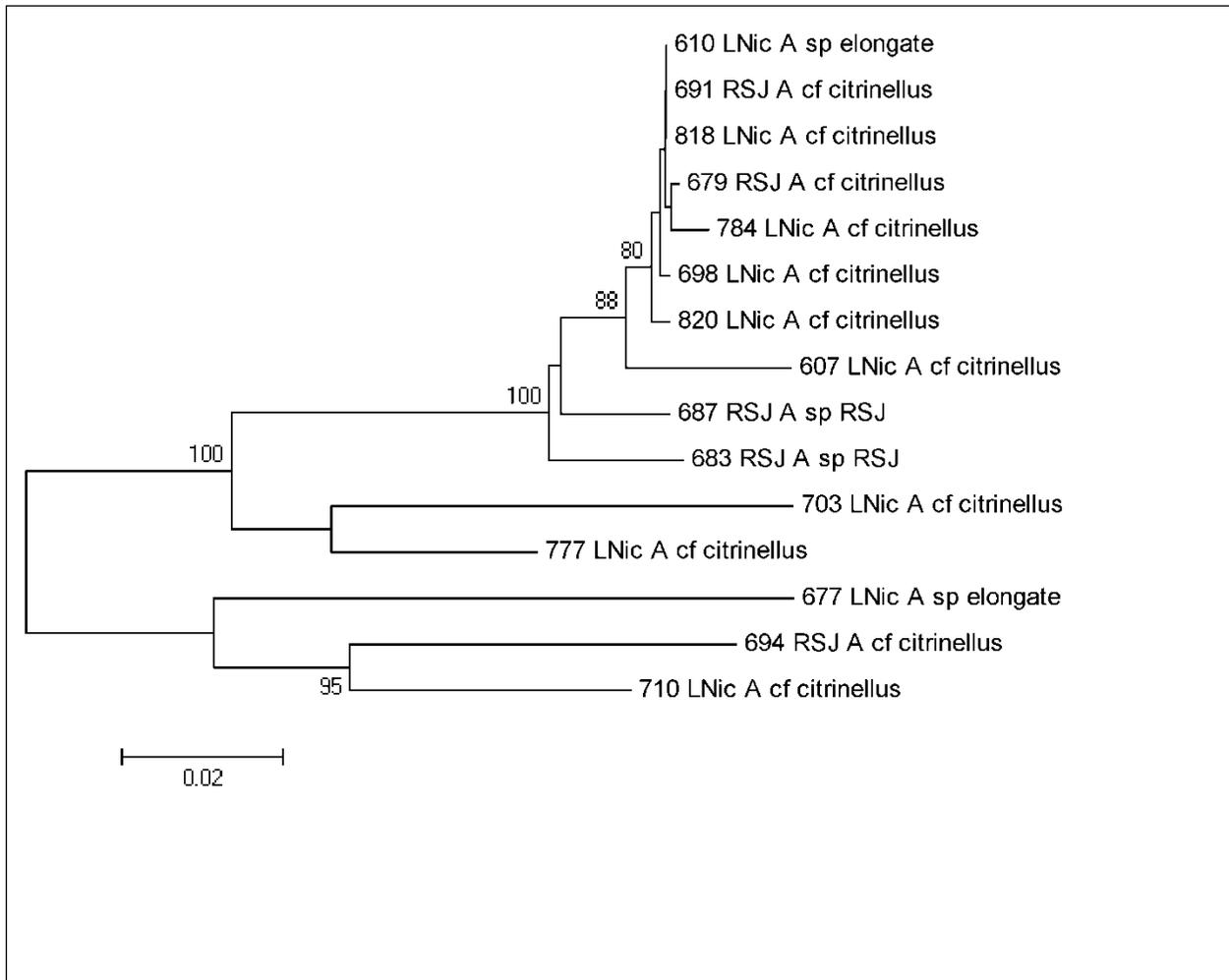


paralelamente, sin embargo, esto no se puede asegurar, como en las lagunas, ya que en el lago habitan otras 46 especies, que compiten ecológicamente con las especies del complejo, y esto puede haber impedido la proliferación de las especies Midas Cichlidae.

Debido al área de la superficie del lago, es difícil el muestro, por lo que en ningún estudio se ha podido abarcar todos los sitios en su totalidad, ya que es posible, por ejemplo que las especies de la orilla norte sean distintas a las especies de la orilla sur, y esto impide que se pueda concluir algo concreto en relación a la situación de las especies del complejo.

Sin embargo, es posible hacer algunas observaciones. En el Río San Juan hay posiblemente dos especies, lo que se refleja en el árbol ya que los especímenes 687 y 683 denominados A. sp 'RSJ', forman un grupo aparte. Este grupo aparece como hermano de un grupo combinado de especies del Río San Juan y lago de Nicaragua.

En el árbol (ver Figura 18) se ven muy bien diferenciados dos grandes grupos, que aunque combinados, puede indicar que ya hay una separación clara entre las especies de ambos sitios.



**Figura 18.** Árbol Neighbor-Joining del Lago de Nicaragua y Río San Juan basado en el gen Citocromo C oxidasa sub unidad I (región mitocondrial). En las ramas se muestra el porcentaje de replicas en las que los taxa se agruparon en el test de bootstrap (1000 replicas). Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método P-distancia y son unidades expresadas en el número de sustitución de bases por sitio.



## 5.6 Aporte al Proyecto Código de Barras Genético

Para cada espécimen se crearon 3 páginas principales para manejar la información: Página de información taxonómica y colecta, Página de información genética y una Página que ubica al espécimen filogenéticamente y presenta estadísticas por taxa. El proyecto además de ser de gran utilidad para almacenar información completa de las especies, permite relacionar a nuestros especímenes con otros a nivel mundial, y situar a la Biodiversidad de nuestro país en el mapa de la investigación científica. (Ver Figura 19).

www.boldsystems.org/views/specimenrecord.php?&

**DNA Barcode of Midas Cichlidae species complex inhabiting lakes and lagoons of Nicaragua. [DBMCN]**

**Specimen Identifiers** [Edit Specimen](#)

Sample ID: CBM-723      Museum ID: ZSM37348  
Isolate / Field Num: CBM-723      Collection Code:  
Deposited In: Zoological State Collection, Munich

**Taxonomy**

Identifier:	Matthias F. Geiger
phylum:	Chordata
class:	Actinopterygii
order:	Perciformes
family:	Cichlidae
subfamily:	Cichlasomatinae
genus:	Amphilophus

Taxonomy Note:

**Specimen Details**

Voucher Type: Whole organism  
Tissue Type:  
Extra Info:  
Sex:  
Reproduction:  
Life Stage:  
Note:

**Collection Data**

Collectors:	L. Lopez & M. Geiger
Date Collected:	11-Feb-2008
Country:	Nicaragua
State/Province:	Masaya
Region/County:	Masaya
Sector:	L. Apoyo
Exact Site:	Los Hongos
Latitude:	11.9058
Longitude:	-86.0293
Coord. Source :	
Coord.Accuracy:	
Elevation:	
Elevation Accuracy:	
Depth:	
Depth Accuracy:	

[Expand map](#)

**Photographs** [IMPROVED QUALITY](#)

**Figura 19.** Ejemplo de una página del Proyecto “DNA Barcode of Midas Cichlidae species complex inhabiting lakes and lagoons of Nicaragua”



## VI. Conclusiones

El presente trabajo de investigación constituye el primer estudio de filogenética molecular utilizando el gen COI y realizado en su totalidad en el país. Se ha logrado confirmar hipótesis planteadas por otros autores y aportar nuevas sobre la compleja situación de los peces cíclidos en Nicaragua.

1. Se logró optimizar un protocolo de extracción orgánica de ADN genómico para aleta pectoral de especies del Complejo Midas Cichlidae, asimismo, protocolos y programas de amplificación y secuenciación.
2. EL gen COI permitió diferenciar en algunos casos especies de diferentes lagunas, como es en Xiloá-Apoyo-Apoyeque. Se encontraron dificultades en diferenciar especies del Lago Managua, Monte Galán y Asososca León, debido a sus afinidades geográficas y la posibilidad de que la especie fundadora de estas lagunas proviene del Lago Managua. Las especies de la laguna de Tiscapa aparece como grupo hermano de las lagunas anteriormente mencionadas.
3. Las relaciones entre los peces del complejo Midas Cichlidae son complejas y aún utilizando marcadores moleculares y estudios morfométricos y ecológicos no siempre se obtiene resultados congruentes. El gen COI no permitió identificar los especímenes a nivel de especies.
4. De acuerdo a los análisis realizados, la laguna de Apoyeque puede contener dos especies del complejo: una forma 'normal' y una 'labiatus' (labios pronunciados). Lo mismo sucede en el Río San Juan, donde se identifica especies parecidas a 'citrinellus' y otra posible especie de cuerpo alto y redondeado.



5. En el lago de Nicaragua conviven varias especies, estrechamente relacionadas con las especies del Río San Juan, ya que todavía hay un flujo genético entre ambas localidades.
  
6. Por la dificultad del gen de diferenciar a nivel de especie, la falta de agrupamiento en los árboles filogenéticos obedeciendo a localidades o grupos de especies, y tomando en cuenta la reciente creación de las lagunas y su tamaño reducido sin presentar barreras geográficas, se presume que se llevó y está llevando a cabo un proceso de especiación simpátrica acompañado en algunos casos por evolución paralela convergente.



## VII. Recomendaciones

1. Debido al difícil acceso a algunas de las lagunas (Apoyeque, Asososca León, Monte Galán y Tiscapa) no se han colectado un número de muestras considerables que pueda conllevar resultados más congruentes. Es necesario profundizar con estudios que incluyan el muestro extenso de estas lagunas.
2. Debido a la extensión de los grandes lagos Nicaragua y Managua, el muestreo no representa a todas las posibles poblaciones de especies del complejo que aquí habitan, es necesario realizar muestreos que incluyan varios sitios, ya que se ha demostrado que de una localidad a otra varía la información genética de estas especies.
3. Los estudios genéticos, deben ir siempre acompañados por estudios de ecología y morfología para tener una información completa y poder elaborar hipótesis más precisas y congruentes.
4. Realizar un estudio dirigido meramente a encontrar genes que interviene directamente en el proceso de especiación, por ejemplo aquellos que intervienen en la visión de los peces y hacen que prefieran aparearse con individuos de un color específico.
5. Debido a la evolución paralela que ocurre en las lagunas, y con los recursos emergentes como la secuenciación del genoma de los cíclidos, se puede realizar estudios dirigidos a la inferencia de las bases genómicas en la variación fenotípica y ecológica como la morfología y selección de sitios de alimentación y reproducción.



### VIII. Bibliografía

1. Astorqui, I. (1971) Peces de la cuenca de los grandes lagos de Nicaragua. Rev. Biol. Trop. 19, 7–57.
2. Ausubel, J; Stoeckle, M & Waggoner, P. (2005). Barcoding Life, Illustrated. Disponible en sitio web de la Universidad Rockefeller: <http://phe.rockefeller.edu>.
3. Avise, J. (2000). *Phylogeography*. Harvard University Press. Cambridge, USA.
4. Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas, aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. 17(2): 221-242
5. Chakrabarty, P. (2006). Systematics and historical biogeography of Greater Antillean Cichlidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39 (3), 619-627
6. Barluenga, M. & Meyer, A. (2004). The Midas cichlid species complex: incipient sympatric speciation in Nicaraguan cichlid fishes. *Mol. Ecol.* 13, 2061–2076.
7. Barluenga, M & Meyer, A. (2010). Phylogeography, colonization and population history of the Midas cichlid species complex (*Amphilophus* spp.) in the Nicaraguan crater lakes. *BMC Evolutionary Biology* 10:326
8. Barlow, G. W. (1976a). The Midas cichlid in Nicaragua. In *Investigations of the ichthyology of Nicaraguan lakes* (ed.T. B. Thorson), pp. 333–358. Lincoln, NE: University of Nebraska Press.
9. Barlow, G.W & Munsey, J.W. (1976). The red devil-Midas-arrow cichlid species complex in Nicaragua. In: Thorsen, T.B. (Ed.), *Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan Lakes*. University of Nebraska Press, Lincoln, NB, pp. 359–369.



10. Barluenga, M; Stolting, K; Salzburger, W; Muschik, M & Meyer, A. (2006). Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. *Nature* 439, 719–723.
11. Basic Local Alignment Search Tool. Disponible en sitio web: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
12. Consortium for the Barcode of life (CBOL). Disponible en sitio web: <http://www.barcoding.si.edu/whatis.html>
13. Edgar, R. (2004), MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97.
14. Elmer, K; Lehtonen, T; & Meyer, A. (2009). Color assortative mating contributes to sympatric divergence of Neotropical cichlid fishes. *Evolution* 63, 2750–2757.
15. Elmer, K; Fan, S; Gunter, H; Jones, J; Boekhoff, S; Kuraku, S & Meyer, A. (2010a). Rapid evolution and selection inferred from the transcriptomes of sympatric crater lake cichlid fishes. *Mol. Ecol.* 19(Suppl.1), 197–211
16. Elmer, K; Kusche, H; Lehtonen, T & Meyer, A. (2010b). Local variation and parallel evolution: morphological and genetic diversity across a species complex of neotropical crater lake cichlid fishes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 1763–1782.
17. Frézal, L & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects, *Infect. Genet. Evol.*



18. Geiger, M; McCrary, J & Schiliewen, U. (2010). Not a simple case - A first comprehensive phylogenetic hypothesis for the Midas cichlid complex in Nicaragua (Teleostei: Cichlidae: Amphilophus) *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56 (3), pp. 1011-1024.
  
19. Hall, B. (2001). *Phylogenetic Trees Made Easy*. Sinauer Associates, Inc.
  
20. Hall, TA. (1999) *Nucleic Acids Symposium Series*, Vol. 41 pp. 95-98.
  
21. Hillis, D; Mortiz, C & Mable, B. (Editores). (1996). *Molecular Systematics*. Second Edition, Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA.
  
22. Huertas, M. (2004). *Curso sobre técnicas en Biotecnología*. CNU, UNAN-León. Nicaragua.
  
23. Klingenberg, C; Barluenga, M. & Meyer, A. (2003). Body shape variation in cichlid fishes of the *Amphilophus citrinellus* species complex. *Biol. J. Linn. Soc.* 80, 397–408.
  
24. Kocher, T. (2004). Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nat. Rev. Genet.* 5, 288–298.
  
25. Kress, J; Wurdack, K; Zimmer, E; Weigt, L & Jansen, D. (2005). *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8369-8374
  
26. Lahaye, R et al. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *PNAS*. 105 (8) 2923-2928.



27. Larkin, M; Blackshields, G; Brown, N; Chenna, R; McGettigan, P; McWilliam, H; Valentin, F; Wallace, I; Wilm, A; Lopez, R; Thompson, J; Gibson, T; & Higgins D. (2007). ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948)
28. Lopera-Barrero, N; Povh, J; Ribeiro, R; Gomes, P; Jacometo, C & da Silva, T. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cien. Inv. Agr.* 35(1): 77-86.
29. Kumar, S et al (2008). MEGA: A biologist -centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief in Bioinformatics* 9: 299 – 306.
30. Maynard-Smith, J. (1966) Sympatric speciation. *American Naturalist.* 100: 637-650
31. McKaye, K.R. (1980). Seasonality in habitat selection by the gold color morph of *Cichlasoma citrinellum* and its relevance to sympatric speciation in the family Cichlidae. *ENVIRON. Biol. Fishes* 5, 75–78.
32. McKaye, K, Stauffer, Jr. J ; van den Berghe, E; Vivas, R; Lopez-Perez, L; McCrary, J; Waid, R; Konings, A; Lee, W & Kocher, T. (2002). Behavioral, morphological and genetic evidence of divergence of the Midas cichlid species complex in two Nicaraguan crater lakes. *Cuadernos de Investigación de la UCA* 12, 19–47.
33. Meyer, A. (1990b). Morphometrics and allometry in the trophically polymorphic cichlid fish, *Cichlasoma citrinellum*: alternative adaptations and ontogenetic changes in shape. *J. Zool.* 221, 237–260.
34. Miklos, D; Freyer, G & Crotty, D. (2003). DNA sequencing en *DNA Science: A first course*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press



35. New England Biolabs. Manual Files Kit Phire® Animal Tissue Direct PCR  
Disponible en sitio web: <http://www.neb.com/nebecomm/ManualFiles/manualF-140.pdf>
  
36. Otte, D. & Endler, J.A. eds. (1989). Speciation and its consequences. Sinauer Ass., Sunderland, Mass.
  
37. Pevsner, J. (2010). Multiple Sequence Alignment en Bioinformatics and Functional Genomics. Second Edition. Wiley Interscience Press.
  
38. Purvis, Andy & Hector, Andy. (2000). Getting the measure of biodiversity. Nature: vol 405:212.219
  
39. Rueda, R. (2007). Recopilación de la información sobre la biodiversidad de Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. Norwegian Ministry of Foreign Affairs. Inbio- Costa Rica.
  
40. Stauffer, Jr. J & McKaye, K. (2002). Description of Three New Species of Cichlid Fishes (Teleostei: Cichlidae) from Lake Xiloá, Nicaragua. Cuadernos de Investigacion de la U.C.A. 12, 1–18.
  
41. Stauffer Jr. J; McCrary, J & Black, K. (2008). Three new species of cichlid fish (Teleostei: Cichlidae) in Lake Apoyo, Nicaragua. P. Biol. Soc. Wash. 121, 117–129.
  
42. Stauffer Jr. J; Geiger, M; & McCrary, J. (2010). Description of two new species of the Midas cichlid complex Teleostei: Cichlidae) from Lake Apoyo, Nicaragua. Proc. Biol. Soc. Wash. 123(2): 159-173.



43. Templeton, A.P. (1980). The theory of speciation via the founder principle. *Genetics* 94: 1011-138
44. Valdez-Moreno, M; Ivanova, N; Elias-Gutierrez, M; Contreras-Balderas & Hebert, P. (2009). Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology* 74, 377–402
45. Villa, J. (1976). Ichthyology of the lakes of Nicaragua: historical perspective. In *Investigations of the ichthyology of Nicaraguan lakes* (ed. T. B. Thorson), pp. 101–113. Lincoln, NE: University of Nebraska Press.
46. Villa, J. (1982). Peces Nicaragüenses de agua dulce. Colección Cultural. Serie Geografía y Naturaleza.
47. Vivas, R. & McKaye, K. (2001). Habitat selection, feeding ecology, and fry survivorship in the *Amphilophus citrinellus* species complex in Lake Xiloá. *J. Aquacult. Aq. Sci.* IX, 32–48.
48. Waid, R; Raesly, R; McKaye, K & McCrary, J. (1999). Zoogeografía ictica de lagunas cratéricas de Nicaragua. *Encuentro* 51, 65–80.
49. Wilson, A; Noack-Kunmann, K & Meyer, A. (2000). Incipient speciation in sympatric Nicaraguan crater lake cichlid fishes: sexual selection versus ecological diversification. *Proc. R. Soc. Lond.* 267, 2133–2141.



## *IX. Anexos*

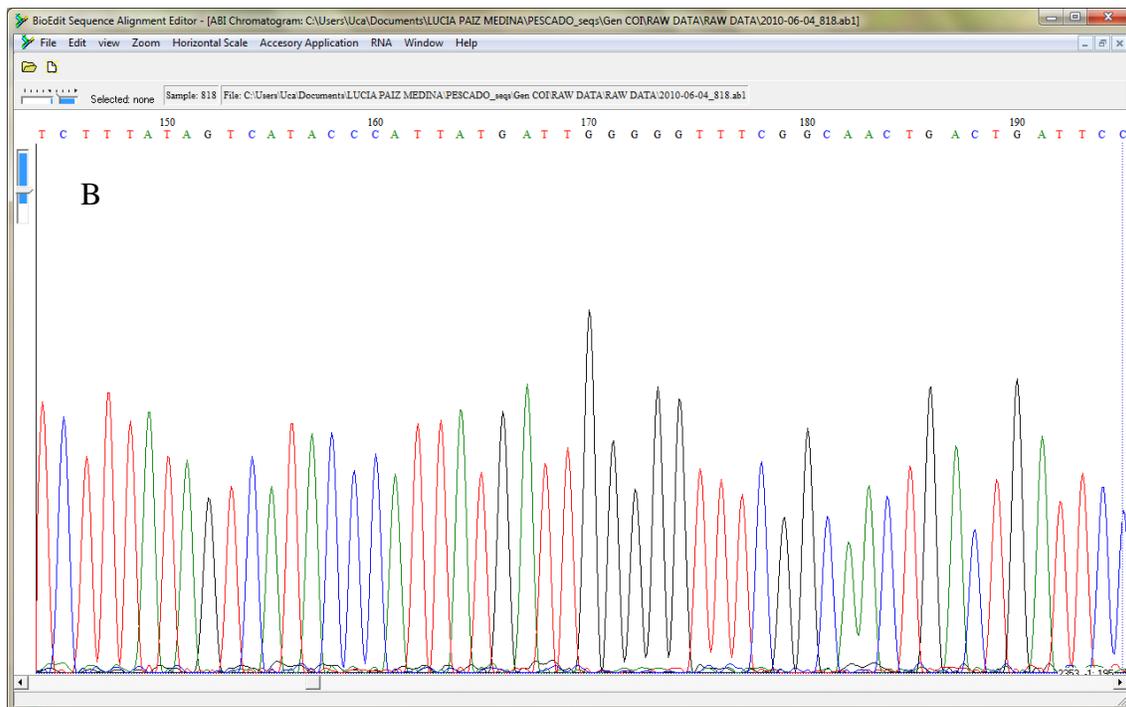
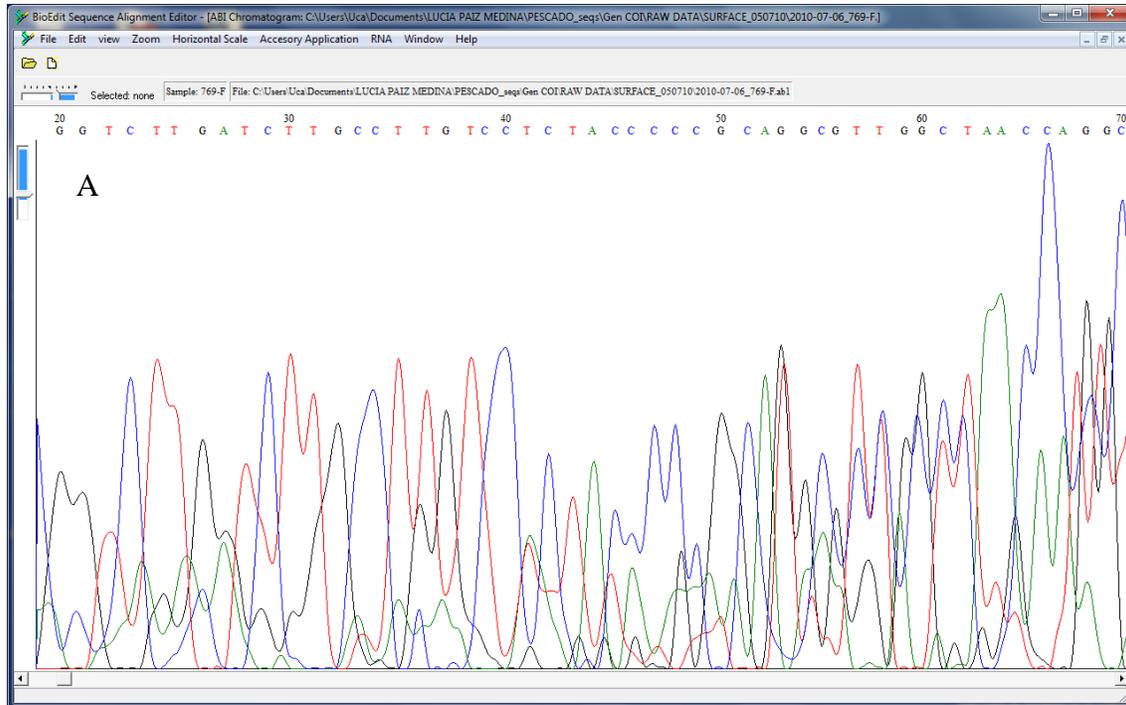


Código ADN	Familia	Género	Especie	Localidad	Latitud N/S	Longitud E/O
CBM-762	Cichlidae	Amphilophus	Amarillo	Laguna de Xiloá, Al sureste de la costa donde termina la playa pública, en frente de "Casita" Dep. Managua	12° 12' 56.23" N	86° 18' 44.41" W

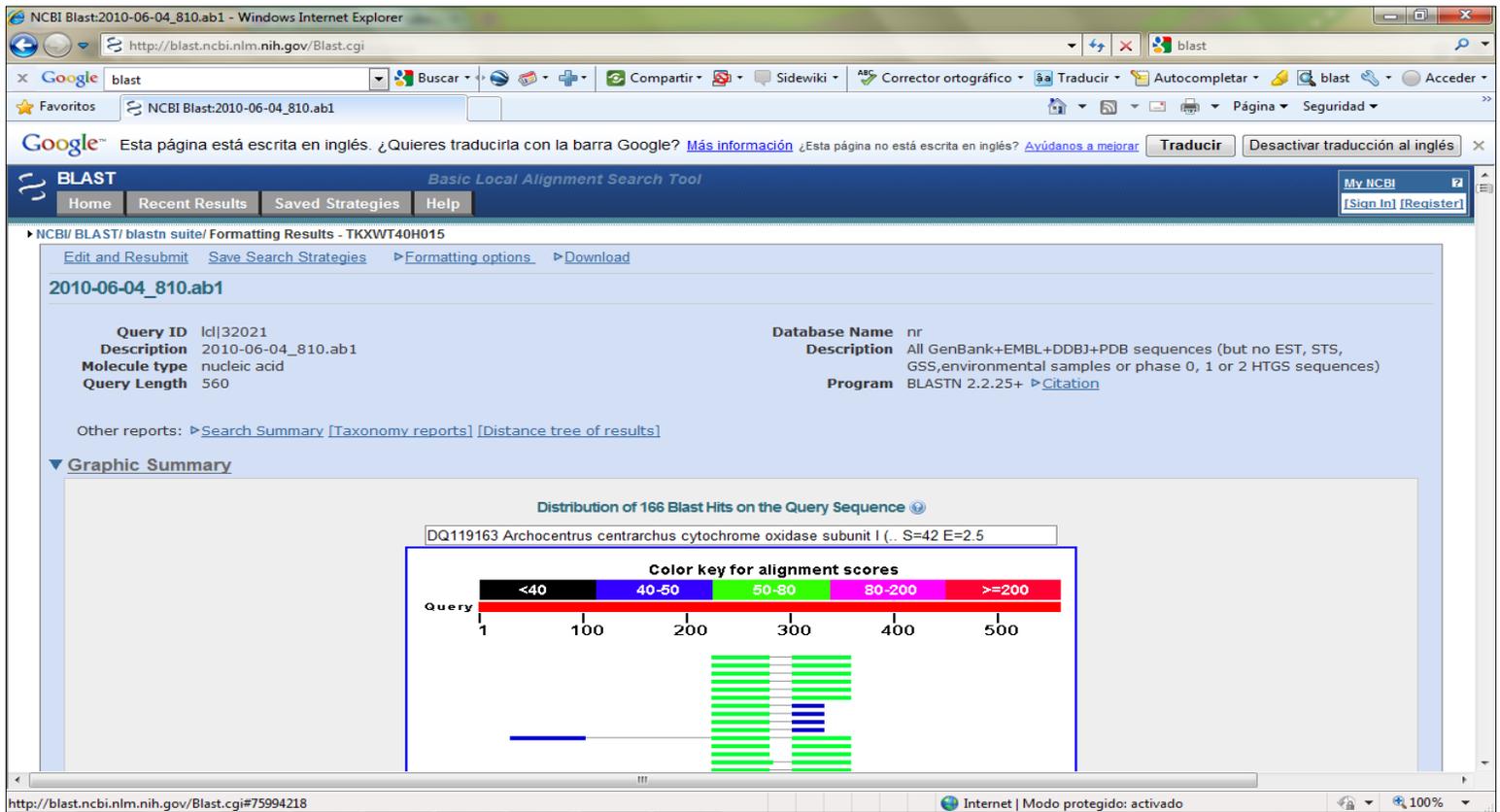


Fotografías por: Por Matthias Geiger

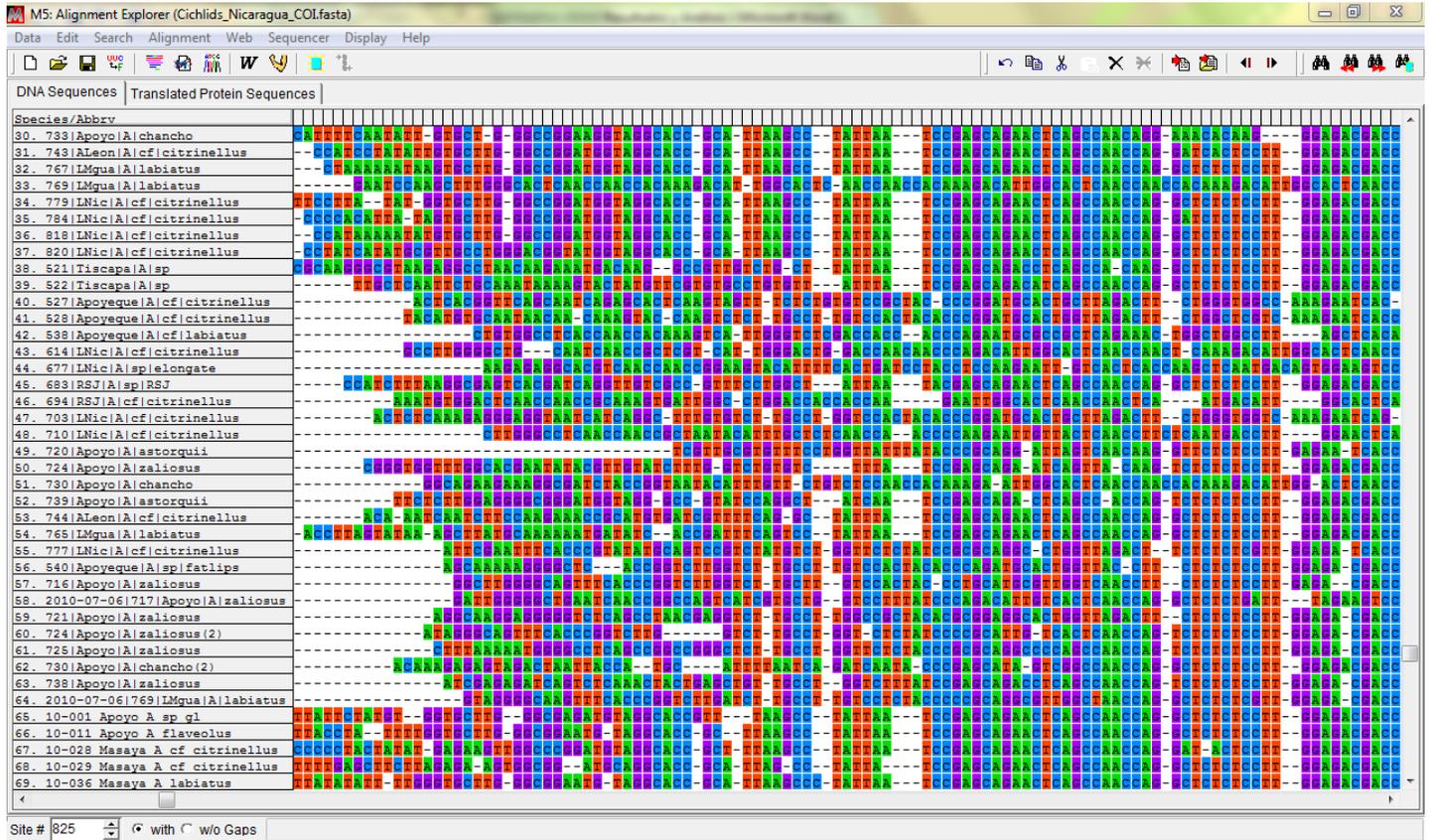
**No 1.** Ejemplo de la Hoja de campo y fotografías tomadas de cada espécimen.



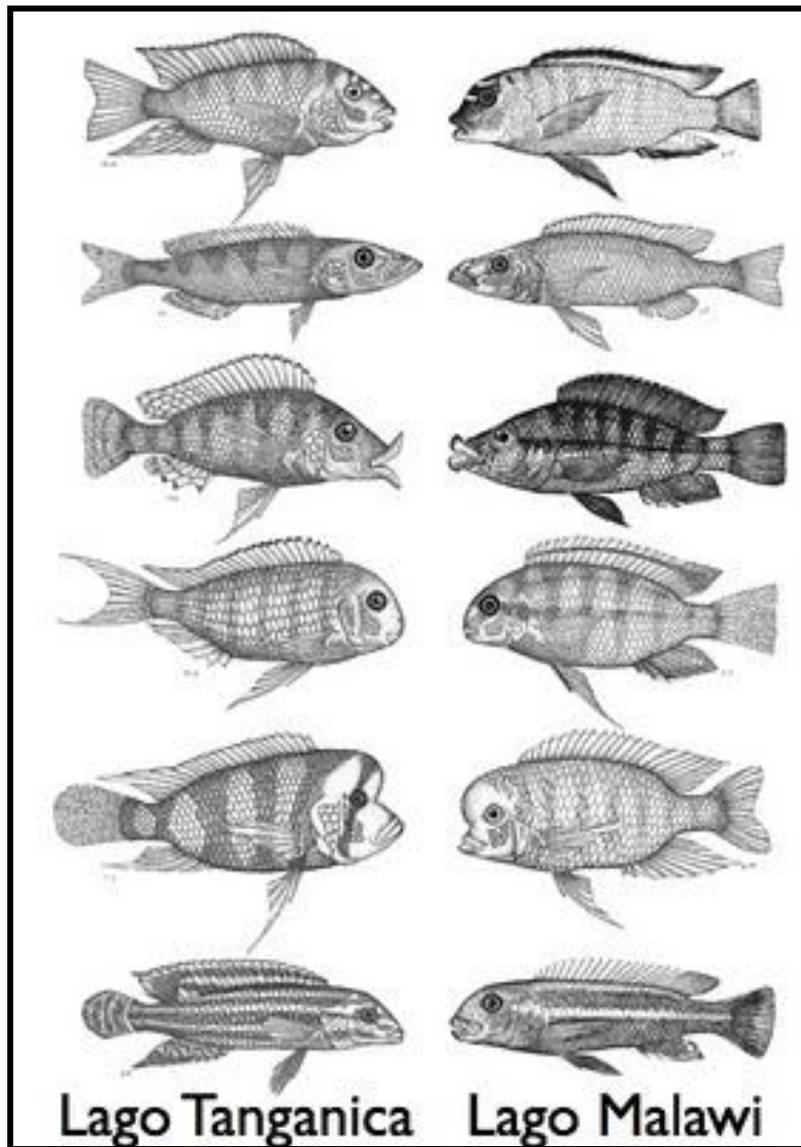
**No 2.** Cromatogramas que muestran la diferencia entre usar dos tipos de enzimas: A. Taq polimerasa, nótese la degradación e inespecificidad. B. Phire® Hot Start II, nótese las curvas limpias y poco 'background'.



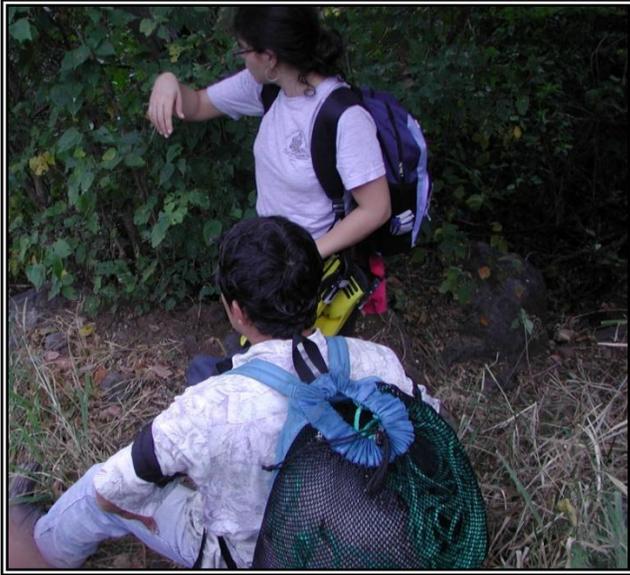
**No 3.** BLAST de secuencia para conocer si se estaba secuenciando el segmento adecuado de COI, en la figura se muestra una secuencia que no coincidió con la Base de Datos de GenBank.



**No 4.** Alineamiento de las secuencias antes de recortar pares de base al inicio de las secuencias, utilizando el programa *MEGA-5b*, algoritmo *ClustalW*



**No 5.** Ejemplo de evolución paralela convergente en los Lagos Tanganica y Malawi.



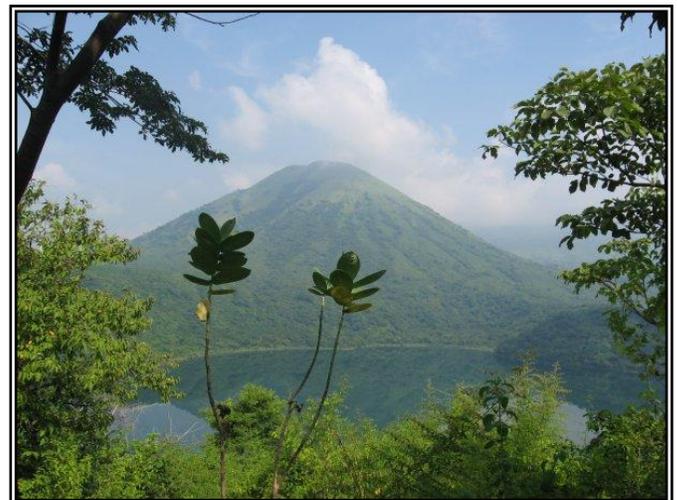
Muestreo Laguna de Apoyeque



Toma de muestra para análisis genéticos, aleta pectoral.



Laguna Apoyeque



Laguna Asosca León

**No 6.** Fotografías de la colección, toma de muestras y algunas localidades. Fotografías por Matthias Geiger