

Evolutionary Relationships of the Fish *Prochilodus reticulatus* and *Prochilodus magdalenae* (Characiformes: Prochilodontidae)

Nelson Alfonso Vega Contreras

Seir Antonio Salazar Mercado

Universidad Francisco de Paula Santander Universidad Francisco de Paula Santander

Nestor Fabian Galvis Serrano

Universidad de Santander

Received: February 7, 2017

Accepted: June 29, 2017

Pag. 161-171

Abstract

A phylogenetic study was carried out between the species *Prochilodus reticulatus* (Valenciennes, 1850) and *P. magdalenae* (Steindachner, 1879) of great socioeconomic value in the country. Initially, the species were collected for DNA extraction and subsequent characterization by RAPD-PCR to establish their phylogenetic relationships using the Jaccard coefficient and the UPGMA method. The phylogenetic analysis of *P. reticulatus* and *P. magdalenae* showed a close genetic relationship, which suggests that the differences found between them may not be considered significant.

Keywords: *Prochilodus* sp, RAPD, Phylogenetic analysis.

Doi: <http://dx.doi.org/10.25100/rc.v21i1.6348>

Relaciones evolutivas de los peces *Prochilodus reticulatus* y *Prochilodus magdalenae* (Characiformes: Prochilodontidae)

Resumen

Se realizó un estudio filogenético entre las especies *Prochilodus reticulatus* (Valenciennes, 1850) y *P. magdalenae* (Steindachner, 1879) de gran valor socioeconómico en el país. Inicialmente, las especies fueron colectadas para la extracción del ADN y su posterior caracterización mediante RAPD-PCR para establecer sus relaciones filogenéticas empleando el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA. El análisis filogenético de *P. reticulatus* y *P. magdalenae* mostró una estrecha relación genética, lo que sugiere que las diferencias encontradas entre ellas pueden considerarse no significativas.

Palabras clave: *Prochilodus* sp, RAPD, Análisis filogenético.

1 Introducción

El departamento de Norte de Santander, Colombia, se encuentra rodeado por tres grandes cuencas: río Magdalena, río Catatumbo y río Orinoco ⁽¹⁾, que cuentan con una variedad de especies icticas de impacto económico, siendo *Prochilodus* sp, las especies más representativas a nivel comercial ⁽²⁻⁴⁾.

Prochilodus magdalenae (bocachico), especie endémica de la cuenca del río Magdalena ⁽⁵⁾, se distribuye en las zonas bajas de los ríos Magdalena, Sinú y Atrato, hasta los 1,000 m.s.n.m., aproximadamente; y en el río Cauca alcanza a remontar a la cuenca alta hasta los 1,500 m.s.n.m. debido a la pendiente suave ⁽⁶⁾. En la década de los años 80 se estableció que la población de bocachico estaba cercana a los límites de aprovechamiento sostenible (tasa de explotación $E=41\%$) ⁽⁷⁾. Para la cuenca del Sinú, Valderrama y Solano 2004 ⁽⁸⁾, determinaron una disminución progresiva de la biomasa desovante durante el periodo 1997-2002, pasando de 279 ton a 32 ton, con mortalidades por pesca (F media anual = 1.9 año⁻¹) muy superiores al punto biológico de referencia (PBR) de mortalidad por pesca al máximo rendimiento por recluta $F_{max} = 0.9$ año⁻¹, indicando altos niveles de sobreexplotación. En razón a su gran importancia económica, *P. magdalenae* es la especie íctica más investigada del país, no obstante, persisten vacíos de información sobre aspectos reproductivos, genéticos poblacionales, dinámicas poblacional y migratoria en las cuencas del Magdalena y Atrato. Para la cuenca del Sinú se conoce su dinámica migratoria y estructura genética de las poblaciones ⁽⁶⁾.

Prochilodus reticulatu se encuentra en las cuencas de los ríos Catatumbo y Ranchería, distribuidas en Colombia y Venezuela ⁽⁹⁾. En el Catatumbo habita en toda la cuenca desde el Lago de Maracaibo y ciénagas adyacentes de la parte baja, hasta los 1,000 m.s.n.m. En época de aguas bajas remonta el río Catatumbo y demás tributarios como los ríos, Tibú, Tarra, San Miguel, río de Oro, Sardinata, Nuevo Presidente y Zulía, hasta aproximadamente los 1,000 m.s.n.m. ⁽¹⁰⁾. Para el Catatumbo, *P. reticulatu* era la especie de mayor contribución a las capturas totales, según los monitoreos realizados entre 1989 y 1995 por la Asociación Cravo Norte ⁽¹¹⁾, sin embargo, en la actualidad su aporte ha disminuido.

Se ha observado que los ríos Catatumbo y Magdalena comparten muchas especies de peces, lo que hace suponer un origen común ⁽⁹⁾. Shultz ⁽¹⁰⁾, consideraba que las cuencas de estos ríos debieron converger en algún momento; el levantamiento de la serranía del Perijá, durante el plioceno superior separó en dos, las cuencas del Magdalena y Catatumbo con lo cual poblaciones de peces prácticamente idénticas quedaron aisladas de lado y lado de esta serranía evolucionado por separado. Los endemismos producidos por esta separación no bastan para explicar las diferencias entre la fauna del Magdalena y del Catatumbo ⁽²⁾. La caracterización genética se convierte en una herramienta importante que permite dar un nuevo enfoque más acorde a la relación filogenética entre estas especies ^(12, 13). Las metodologías moleculares han revolucionado el análisis genético permitiendo la identificación de especies implementando diversas técnicas moleculares. La técnica para detectar polimorfismo en el ADN amplificado al azar (RAPD) en ictiología, es un método basado en la PCR, en el que se emplea un cebador corto, generalmente de 10

bases, para amplificar secuencias arbitrarias de ADN ⁽¹¹⁾. Con esta técnica no se busca ningún fragmento de ADN específico, ya que el cebador se adhiere al ADN patrón en secuencias complementarias de ubicación desconocida. En consecuencia, no se conocerá la naturaleza de los productos obtenidos. Los fragmentos de ADN así generados se separan y se detectan mediante electroforesis, produciendo polimorfismos que permiten una caracterización molecular de las especies en estudio. Según Alberti ⁽¹⁴⁾ su rapidez, sencillez y bajo costo son los marcadores elegidos para numerosos estudios de diversidad, sobre todo en especies no modelo en las que no se dispone de información previa de secuencia. Silva *et al.*⁽¹⁵⁾, utilizaron de forma exitosa los marcadores RAPD y ADN *mitochondrial* (mtADN) en el pez *Atherinella brasiliensis*, determinando su diversidad genética, estructura de la población y el flujo de genes. En otra investigación, Mohapatra *et al.*⁽¹⁶⁾, evaluaron la variación genética y la filogenia molecular entre y dentro de dos poblaciones de *Catla catla* implementando la técnica RAPD. Según lo anterior y teniendo en cuenta los estudios de Bardakci y Skibinski ⁽¹⁷⁾ en especies de Tilápia, el empleo de marcadores RAPD pueden detectar variaciones interpopulacionales e interespecíficas en poblaciones de peces. Diferentes autores han evaluado la estructura genética de las poblaciones y han caracterizado una gran variedad de peces, que han permitido conocer las relaciones evolutivas de un grupo de especies utilizando los marcadores RAPD ⁽¹⁵⁻¹⁹⁾. Sin embargo, no se han reportado estudios en donde se analicen las relaciones filogenéticas entre las especies *P. magdalenae* y *P. reticulatus*. Por tal motivo esta investigación busca caracterizar a nivel molecular las especies *P. reticulatus* y *P. magdalenae*, utilizando la técnica RAPD. Posteriormente, se realiza un análisis filogenético utilizando el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA para determinar la relación entre las especies trabajadas.

2 Materiales y métodos

Se recolectaron cuatro individuos de cada una de las siguientes poblaciones:

- *Prochilodus magdalenae* de la piscícola San Silvestre Barrancabermeja Santander – Colombia (Figura 1A).

- *Prochilodus reticulatus* de la piscícola del parque eco turístico Paco Piedra Corponor Zulia Norte de Santander- Colombia (Figura 1B).

- *Prochilodus mariae* en el río Urivante Orinoco Venezolano. Utilizada como control positivo.

- *Anodus laticeps* del parque eco turístico Paco Piedra Corponor Zulia Norte de Santander - Colombia, como control negativo por ser una especie que no pertenece al género *Prochilodus*.

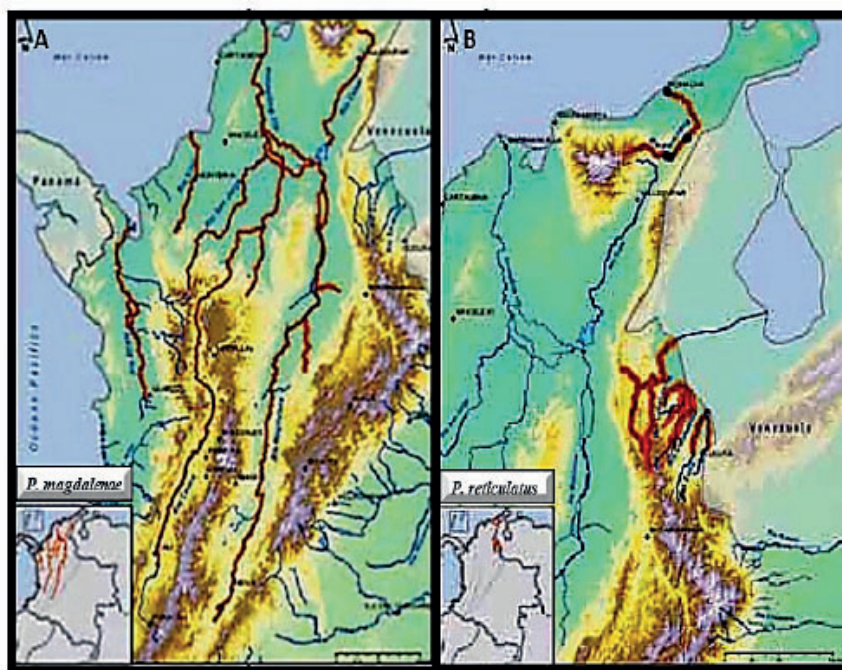


Figura 1. Distribución geográfica de *P. magdalenae* y *P. reticulatus*. A. localización de *P. magdalenae*. B. localización de *P. reticulatus*. Fuente: Mojica et al.⁽⁶⁾.

2.1 Extracción de ADN

El ADN fue extraído a partir de la aleta dorsal de dieciséis individuos siguiendo el protocolo de fenol cloroformo por maceración manual descrito por Sambrook *et al.*⁽²⁰⁾. Posteriormente, se visualizó la cantidad y calidad del ADN en un gel de agarosa al 1 %. Las muestras de ADN fueron almacenadas a 4° C hasta su utilización.

2.2 Caracterización molecular mediante RAPD

Se utilizó la metodología propuestas por Hatanaka y Galetti⁽²¹⁾ en la estandarización de la mezcla de PCR, las temperaturas y los tiempos para la amplificación arbitraria mediante RAPD de los ADN de *P. magdalenae*, *P. reticulatus*, *P. mariae* y *A. laticeps*. Los cebadores utilizados fueron OPP-7 GTCCATGCCA, OPP-12 AAGGGCGAGT, A11 CAATCGCCGT y A02 TGCCGAGCTG^(21, 22).

La PCR se realizó con un paso inicial de desnaturalización a 94° C durante 5 min, seguido de 45 repeticiones de 1 min a 94° C, 1 min a 36° C y 2 min a 72° C, con un ciclo final de extensión a 72° C por 15 min. Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.4 %.

3 Estudio Filogenético

Para el estudio filogenético de *P. magdalenae* y *P. reticulatus* se utilizaron matrices de presencia y ausencia de bandas de los perfiles de ADN obtenidos por RAPD con cada uno de los cebadores utilizados. Con ellos se hizo un análisis de agrupamiento con el fin de

identificar patrones de similitud entre *P. magdalenae* y *P. reticulatus* comparado con *P. mariae* como control positivo y *A. laticeps* como control negativo. Los datos de perfiles de bandas fueron ordenados de acuerdo a un sistema binario de 0 y 1, donde valores de 0 indican ausencia de una banda y 1 la presencia en una posición determinada. Los perfiles de fragmentos de ADN obtenidos con los 4 diferentes cebadores fueron analizados con el Software estadístico NTSYS 2.2. En este análisis se empleó la técnica de ligamiento por el promedio ponderado o UPGMA. La matriz de similitud fue construida utilizando el coeficiente de Jaccard ⁽²³⁾.

4 Resultados y discusión

En el aislamiento de ADN, utilizando el procedimiento propuesto por Sambrook *et al.* ⁽²⁰⁾, se obtuvo un ADN en adecuada de alta concentración y pureza en las especies *P. magdalenae*, *P. reticulatus*, *P. mariae* y *A. laticeps* demostrando la eficacia en la extracción de ADN. (Figura 2).

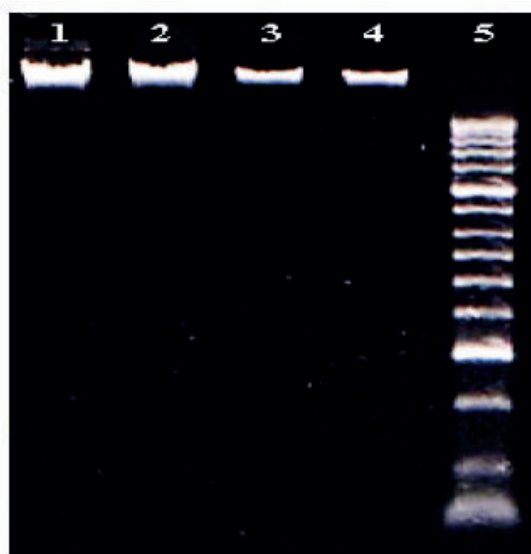


Figura 2. ADN aislado mediante el método de Fenol-Cloroformo con maceración manual. 1: *P. magdalenae*; 2: *P. reticulatus*; 3: *P. mariae*; 4: *A. laticeps*; 5: Marcador de peso molecular Hyperladder II.

Para la caracterización molecular de *P. magdalenae* y *P. reticulatus* todas las amplificaciones realizadas mostraron patrones de bandas definidas y reproducibles. El perfil de bandas que generó cada uno de los cebadores (Figura 3) fue analizado para cada especie mediante el registro de la presencia ("1") o ausencia ("0") de bandas de ADN de tamaño similar. El criterio utilizado para identificar una banda como polimórfica fue su presencia o ausencia en forma consistente en dos amplificaciones independientes, demostrando la reproducibilidad de la técnica. Estos resultados permitieron construir una matriz binaria que combinó todos los polimorfismos detectados en las especies utilizadas en este estudio.

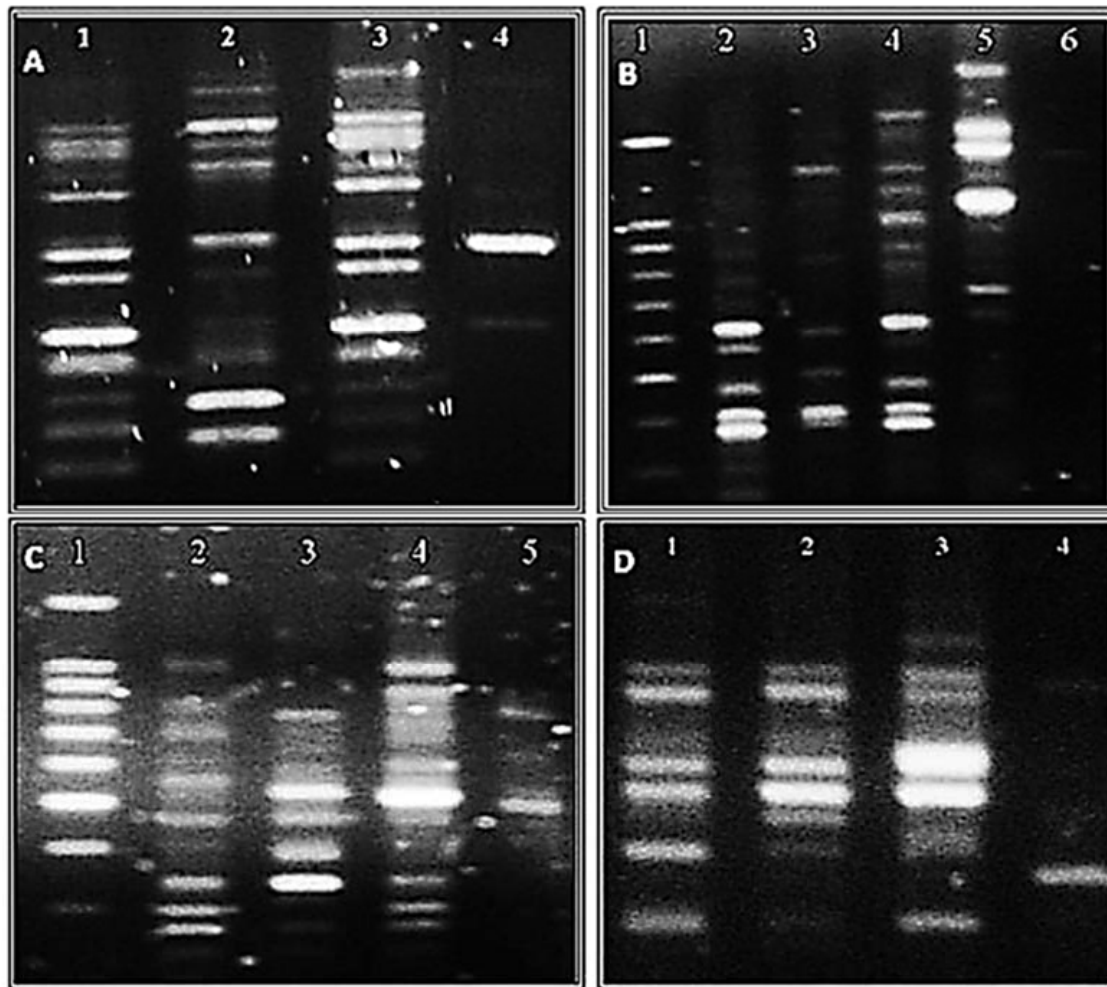


Figura 3. Patrones de amplificación RAPD. A: cebador OPP7 (1: *P. reticulatus*; 2: *P. mariae*; 3: *P. Magdalenae*; 4: *A. Leptus*). B: cebador OPP12 (1: Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder; 2: *P. reticulatus*; 3: *P. mariae*; 4: *P. Magdalenae*; 5: *A. laticeps*) C: cebador A02 (1: Marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2: *P. reticulatus*; 3: *P. mariae*; 4: *P. Magdalenae*; 5: *A. laticeps*). D: cebador A11 (1: *P. reticulatus*; 2: *P. mariae*; 3: *P. Magdalenae*; 4: *A. Laticeps*).

En el análisis filogenético utilizando el cebador OPP7 se observó que el índice de similitud de 0.93 obtenido entre *P. reticulatus* y *P. magdalenae* muestra una relación muy estrecha, lo que demuestra que las diferencias a nivel molecular entre estas dos especies son mínimas (Figura 4A). En un estudio realizado por Hatanaka y Galetti ⁽²¹⁾, en donde establecen una caracterización molecular de *P. marggravii* distribuidas en diferentes áreas geográficas, la amplificación con el cebador OPP7 mostró un alto grado de polimorfismo, estableciendo una diferenciación genética en los individuos en sus diferentes hábitats. También este cebador ha sido utilizado en estudios de caracterización de algas, hongos, plantas y mamíferos, mostrando un alto grado de polimorfismo ⁽²⁴⁾.

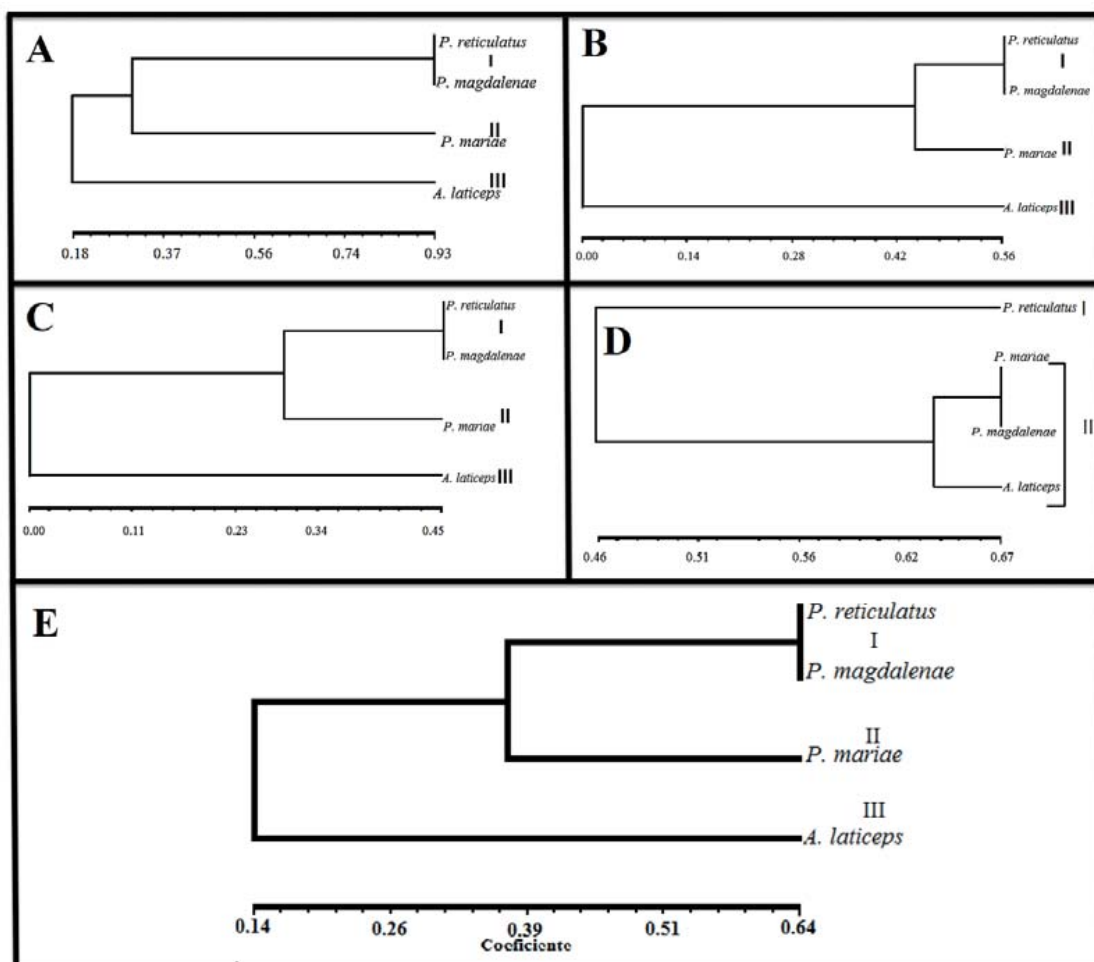


Figura 4. Dendrogramas de similitud usando el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA.

(A) Cebador OPP-7. (B) Cebador OPP-12. (C) Cebador A11. (D) Cebador A02. (E) Análisis total.

Los cebadores OPP12 y A02 presentaron un porcentaje de similitud de 0.56 y 0.45, respectivamente, entre *P. reticulatus* y *P. magdalenae*, mostrando una relación entre estas dos especies. Establecen una diferencia de 0.45 para OPP12 y 0.31 para A02, con el control *P. mariae* y una diferencia total con los dos cebadores con el control negativo *A. laticeps* (Figura 4B y 4C). Estos cebadores también han sido utilizados mostrando amplificaciones polimórficas en estudios de caracterización molecular en otros peces, como *Piaractus mesopotamicus* y *Leporinus elongatus*⁽¹³⁾, y en plantas, como *Solanum tuberosum*⁽²⁵⁾.

El análisis molecular con el cebador A11 mostro una diferencia con los cebadores anteriores, agrupando al control negativo *A. laticeps* con *P. magdalenae* y *P. mariae* con un coeficiente de similaridad de 0.64. Además, establece una diferencia entre *P. reticulatus* y las demás especies analizadas (Figura 4D). Este marcador molecular localiza regiones altamente polimórficas no apropiadas para el estudio a nivel de género y especie en la familia Curimatidae, sino probablemente permitiría caracterizar especies en categorías taxonómicas superiores.

Relacionando los cuatro cebadores utilizados mediante un análisis de similitud y agrupamiento se observó la formación de tres *clusters* entre las especies comparadas. Todas presentaron un porcentaje de similitud de 0.14. *P. mariae* exhibe un coeficiente de similaridad de 0.38 con *P. reticulatus* y *P. magdalenae*. El porcentaje de agrupamiento entre *P. reticulatus* y *P. magdalenae* fue de 0.64 (Figura 4E). Islam *et al.* ⁽¹⁹⁾, utilizaron marcadores moleculares RAPD para analizar la diferenciación genética en las poblaciones de *C. catla* en tres ríos de la India a partir de la combinación de cuatro cebadores aleatorios (OPB03, OPB08, OPB09, OPB15) el coeficiente de similitud varió de 0.025 a 0.052 en las poblaciones de los ríos Halda (0.052) Jamuna y Padma (0.025), demostrando que entre más distantes son geográficamente las poblaciones de *C. catla*, la distancia genética va a ser mayor ⁽¹⁹⁾. Otro estudio similar con cuatro poblaciones de *C. catla*, confirman la importancia de los marcadores RAPD para discriminar eficazmente las diferencias genéticas de las poblaciones ⁽¹⁸⁾. Silva *et al.* ⁽¹⁵⁾, implementaron los marcadores RAPD y el ADN *mitochondrial* (mtADN) para brindar información sobre la diversidad, la estructura y la historia de las poblaciones de *A. brasiliensis* a lo largo de la costa brasileña. Recientemente, se emplearon exitosamente los marcadores de mtADN para conocer la estructura de las poblaciones y las relaciones filogenéticas del pez *Gymnocypris dobula* ⁽²⁶⁾. En otras investigaciones, Orozco *et al.* ⁽²⁷⁾, utilizaron los marcadores de microsatélites para determinar la diversidad genética y la estructura poblacional de *P. magdalenae* en la cuenca del río Magdalena en Colombia, constituyendo una herramienta para una mejor comprensión del comportamiento y biología de esta especie, contribuyendo a la gestión de la pesca y los programas de conservación de *P. magdalenae*.

El análisis filogenético entre las especies *P. reticulatus* y *P. magdalenae* muestra una estrecha relación genética entre estas dos especies. Esta uniformidad genética sugiere que las diferencias encontradas entre *P. reticulatus* y *P. magdalenae* pueden considerarse no significativas. Sin embargo, se considera necesario realizar investigaciones en donde se comparen otros marcadores para seguir estudiando la relación entre *P. reticulatus* y *P. magdalenae*.

5 Conclusiones

Se caracterizó molecularmente *P. reticulatus* y *P. magdalenae* mediante RAPD presentando una estrecha relación entre estas dos especies, con un coeficiente de similitud de 0.64. Sus diferencias fenotípicas pueden resultar no de cambios genéticos, si no, probablemente, de la interacción genotipo y ambiente, que provocarían diferentes manifestaciones del fenotipo, ya que estas especies son grupos de poblaciones naturales con posibilidad de cruzamiento entre sí, pero conservando diferentes barreras en la reproducción que impiden el intercambio genético ⁽²⁷⁾.

Se plantea la posibilidad de realizar un estudio más detallado de la relación entre las especies *P. reticulatus* y *P. magdalenae* en donde se puedan utilizar nuevos marcadores moleculares como secuenciación y microsatélites que permitan medir la variación genética y la filogenia entre estas dos poblaciones de *P. reticulatus* y *P. magdalenae*, que permitirían aportar una información más detallada.

Agradecimientos. A la Universidad Francisco de Paula Santander y Universidad de Santander por su valiosa colaboración.

Referencias bibliográficas

1. IGAC. Atlas Básico de Colombia. 5a edición. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2003.
2. Castro R, Vari R. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae. 1st ed. Washington, D.C.: Smithsonian Books; 2004.
3. Mojica JI, Galvis G, Sánchez-Duarte P, Castellanos C, Villa-Navarro FA. Peces del valle medio del río Magdalena, Colombia. Biota Colombiana. 2006; 7: 23-38.
4. Jaramillo U, Jiménez L. Algunos aspectos biológicos de la población de *Prochilodus magdalenae* en las ciénagas de Tumaradó (Río Atrato), Colombia. Actual Biol. 2008; 30(88): 55-66.
5. Maldonado JA, Vari RP, Usma JS. Checklist of the freshwater fishes of Colombia. Biota Colombiana. 2008; 9(2): 143-237.
6. Mojica JI, Usma JS, Álvarez-León R, Lasso CA (Eds). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia 2012. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales. Bogotá, D. C., Colombia. 2012.
7. Valderrama M, Garzón AC, Salas F, Rangel B, Solano D, Fadul M. Monitoreo ictiológico y pesquero del embalse de Urrá. Informe final Año 2002 presentado a Urrá S.A. E.S.P. Montería, Colombia:Urrá S.A. E.S.P.; 2003.
8. Valderrama M, Solano D. Estado de la población de bocachico, *Prochilodus magdalenae* (Pisces: Characiformes), y su manejo en la cuenca del río Sinú, Colombia. Dahlia. 2004; 7: 3-1.
9. Galvis G, Mojica JI, Camargo M. Peces del Catatumbo. Ecopetrol-Oxy-Shell-Asociación Cravo Norte. Bogotá D.C., Colombia: D’Vinni Edit. Ltda;1997.
10. Schultz LP. A Further contribution to the ichthyology of Venezuela. Proceeding Unites States National Museum. 1949; 95: 235-367.
11. Shubina E, Ponomareva E, Klimov A, Klimova A, Kedrova O. Repetitive DNA sequences as an indicator of the level of genetic isolation in fish. Molecular Biology. 2015; 49(3): 358-368.
12. Orozco-Berdugo G. Evaluación de la estructura genética de la población de bocachico *Prochilodus magdalenae* (characiformes, prochilodontidae) en la cuenca del río magdalena y sus principales tributarios - Colombia. Tesis de maestría. Universidad del Magdalena. 2013.

13. Lopera-Barrero NM, Povh JA, Sirol RN, Rodriguez-Rodriguez M del P, Lima ECS, Poveda-Parra AR, *et al.* Genetic diversity of pacu and piapara broodstocks in restocking programs in the rivers Paraná and Paranapanema (Brazil). *Semina: Ciências Agrárias*. 2016; 37(4): 2365-2374.
14. Alberti E, Fraga J, García R, Hernández E, Castillo L, de la Cuetara K, *et al.* Estudio del polimorfismo genético de las células de la médula ósea y del sistema nervioso central de ratas mediante la técnica de RAPD. *Rev Colomb Biotecnol*. 2011; 13(1): 42-51.
15. Silva CMC, Kersanach R, Proietti MC, Cestari LF, D’Incao F, Lacerda AL, *et al.* Genetic structuring among silverside fish (*Atherinella brasiliensis*) populations from different Brazilian regions. *Estuarine Coastal Shelf Science*. 2016; 178: 0272-7714. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2016.06.007>.
16. Mohapatra TK, Chattopadhyay NR, Behera BK, Patra A. To evaluate genetic variation within and among the two different stocks of *Catla catla* in Orissa based on RAPD profiles. *Aquaculture*. 2013; 1-11.
17. Bardakci FY, Skibinski D. Application of the RAPD technique in Tilapia fish species and subspecies identification. *Heredity*. 1994; 73:117-123.
18. Zakiur S, Rahman MK, Islam S, Alam S. Genetic variation of wild and hatchery populations of the catla Indian major carp (*Catla catla* Hamilton 1822: Cypriniformes, Cyprinidae) revealed by RAPD markers. *Genet Mol Biol*. 2009; 32(1): 197-201. 2009.
19. Islam M, Ahmed A, Azam MY, Alam M. Genetic analysis of three river populations of catla catla (HAMILTON) using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Asian-Australasian J Animal Sci*. 2005; 18(4): 453-457.
20. Sambrook J, Fritish EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd end. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
21. Hatanaka T, Galetti J. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genet Mol Biol*. 2003; 26(1):19-25.
22. Ramella MS, Kroth MA, Meurer S, Nuñez APO, Zaniboni-Filho E, Arisi ACM. Genetic variability in four fish species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. *Braz Arch Biol Technol*. 2006; 49: 589–598.
23. Moreno CE. Métodos para medir la biodiversidad. M&T-manuales y tesis SEA, vol. 1. Zaragoza; 2001.
24. Chen P-H, Salazar E, Fernández H, Castro L, Russo A, Vásquez S. Detección de polimorfismos RAPD en materiales de *Musa* sp. con respuesta diferencial al ataque de *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *Agronomía Tropical*. 2011; 61(2): 125-132.
25. Hoque M, Huq H, Moon N. Molecular diversity analysis in potato (*Solanum tuberosum* L.) through RAPD markers. *SAARC J Agriculture*. 2013; 11(2): 95-102.

26. Chan J, Li W, Hu X, Liu Y, Xu Q. Genetic diversity and population structure analysis of Qinghai-Tibetan plateau schizothoracine fish (*Gymnocypris dobula*) based on mtDNA D-loop sequences. *Biochemical Systematics Ecol.* 2016; 69: 152-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2016.09.004>.
27. Orozco G, Narváez J. Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena River basin and its tributaries, Colombia. *Genet Mol Biol.* 2014; 37(1): 37-45.

Dirección de los autores

Nelson Alfonso Vega Contreras

Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta - Colombia.

nealvec6@gmail.com

Nestor Fabian Galvis Serrano

Grupo de Investigación BIOGEN, Universidad de Santander, San José de Cúcuta - Colombia.

fgs999@hotmail.com

Seir Antonio Salazar Mercado

Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta - Colombia.

salazar663@hotmail.com