

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

# TESIS

Sistemática y biogeografía de los bagres del género *Rhamdia* (Heptapteridae: Siluriformes) en América Media

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN DEECOSISTEMAS TROPICALES

PRESENTA

SONIA GABRIELA HERNÁNDEZ ÁVILA

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

MAYO DE 2025



## UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

# ΤΕSΙS

## Sistemática y biogeografía de los bagres del género *Rhamdia* (Heptapteridae: Siluriformes) en América Media

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra En Ciencias en Biodiversidad y

Conservación de Ecosistemas Tropicales

PRESENTA

### SONIA GABRIELA HERNÁNDEZ ÁVILA

Director

DR. JAIRO ANDRÉS ARROYAVE GUTIÉRREZ Instituto de Biología, UNAM Co-Director DR. WILFREDO ANTONIO MATAMOROS ORTEGA Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH Asesora DRA. RUTH PERCINO DANIEL Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

**MAYO DE 2025** 



### UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS SECRETARÍA ACADÉMICA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 23 de mayo de 2025 Oficio No. SA/DIP/0590/2025 Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

C. Sonia Gabriela Hernández Ávila CVU: 1249623 Candidata al Grado de Maestra en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales Instituto de Ciencias Biológicas UNICACH Presente

Con fundamento en la opinión favorable emitida por escrito por la Comisión Revisora que analizó el trabajo terminal presentado por usted, denominado Sistemática y biogeografía de los bagres del género Rhamdia (Heptapteridae: Siluriformes) en América Media cuyo Director de tesis es el Dr. Jairo Andrés Arroyave Gutiérrez (CVU: 665246) quien avala el cumplimiento de los criterios metodológicos y de contenido; esta Dirección a mi cargo autoriza la impresión del documento en cita, para la defensa oral del mismo, en el examen que habrá de sustentar para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales.

Es imprescindible observar las características normativas que debe guardar el documento impreso, así como realizar la entrega en esta Dirección de un ejemplar empastado.

Atentamente "Por la Cultura de mi Raza" DIRECCIÓN DE Dra. Dulce K of Ramírez López INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Dra, Alma Gabriela Verdugo Valdez, Directora del Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento. C.c.p. Dr. José Antonio De fuentes Vicente, Coordinador del Posgrado, Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento.

Archivo/minutario.

EPL/DKRL/hyb/gp/gtr



2025, Año de la mujer indígena Año de Rosario Castellanos





Ciudad Universitaria, libramiento norte poniente 1150, col. Lajas Maciel C.P. 29039. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México investigacionyposgrado@unicach.mx

Bustración: Noé Zenceno

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca otorgada que me permitió continuar con mis estudios (CVU:1249623).

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA202119 e IN214922, por otorgar los fondos para financiar este proyecto.

Al posgrado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales del Instituto de Ciencias Biológicas por permitirme formar parte de su comunidad y continuar investigando.

A mi director de tesis, el Dr. Jairo Andrés Arroyave Gutiérrez, quien me apoyó, asesoró y puso su confianza en mí durante todo el proyecto, gracias a su disponibilidad y grandes enseñanzas en transcurso del camino.

A mi codirector y profesor, el Dr. Wilfredo A. Matamoros, a quien admiro como persona e investigador y quien ha sido parte fundamental en mi formación académica, además de un buen maestro, guía y amigo.

A mi asesora, la Dra. Ruth Percino Daniel, por su retroalimentación, comentarios y sugerencias en mi manuscrito.

Al Dr. Caleb McMahan y Diego Elías, por recibirme de forma tan amable y cordial durante toda mi estancia en Chicago. Además de, todas sus grandes enseñanzas y conocimientos transmitidos.

A mis padres, Reyna y Carlos, quienes con su amor y apoyo incondicional han sido mi sostén e impulso para seguir continuando en el camino. A mi hermana Karen, quien también ha sido una parte importante en mi vida.

A Antonio, por su compañía, apoyo y palabras de aliento.

A Carlos Kante, por su apoyo a la distancia.

A mis amigos, Monserrat y César, con quienes he compartido grandes momentos y charlas a distancia en el transcurso de este viaje.

A mis compañeros de laboratorio, Fernando y Frida, por su compañía y momentos divertidos durante mi estadía en Ciudad de México.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	5
2.1 2.2 2.3 2.4 2.5	Familia Heptapteridae El género <i>Rhamdia</i> Bleeker 1858 Sistemática Filogenética molecular Secuenciación de nueva generación	5 7 .10 .13 .14
III.	ANTECEDENTES	16
IV.	JUSTIFICACIÓN	18
V.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
VI.	HIPÓTESIS	20
VII.	OBJETIVOS	20
3. 2 3. 2	1 General 2 Particulares .MÉTODO	. <b>20</b> . <b>20</b> 21
8.1 8.2 8.3 8.4 8.5 8.6 8.7	Recolecta y obtención de muestras Extracción de ADN, preparación de bibliotecas genómicas y secuenciación Procesamiento de datos genómicos Análisis filogenéticos Análisis multivariados Análisis del tiempo de divergencia Estimación de áreas ancestrales	. 21 . 23 . 24 . 26 . 27 . 28 . 29
IX.	RESULTADOS	32
9.1 9.2 9.3 9.4 9.5	Procesamiento de datos genómicos Análisis filogenéticos Análisis multivariados Tiempos de divergencia Estimación de áreas ancestrales	. 32 . 32 . 36 . 40 . 42
IX.	DISCUSIÓN	44
10. 10.	<ol> <li>Relaciones filogenéticas</li> <li>2 Estimación de tiempos de divergencia y biogeografía de <i>Rhamdia</i> trans-Andina</li> </ol>	.44 a48
Х.	CONCLUSIONES	52
XI.	REFERENCIAS DOCUMENTALES	54

XII. ANEXOS	65
-------------	----

#### ÍNDICE DE TABLAS

#### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rango de distribución del género Rhamdia. El clado de Rhamdia trans-Andina Figura 2. Árbol filogenético más reciente de la familia Heptapteriidae, realizado bajo inferencia de máxima verosimilitud con una matríz que incluye 1 319 loci de elementos Figura 3. Árbol filogenético presentado por Darwin (1859) en "El origen de la Especies" Figura 4. Primera ilustración de Rhamdia ('nhamdiâ') del primer especímen descrito, que posiblemente pudo haber sido R. quelen. Ilustración tomada de Historia Naturalis Figura 5. Mapa de distribución de los individuos seleccionados de las especies del Figura 6. Bloques geológicos presentes en América Media y Sudamérica. La división de estos bloques se realizó de acuerdo con la definición de Dengo (1987) y Donelly et al., (1985). Estos bloques representan las unidades biogeográficas las cuales se ajusta la distribución de Rhamdia trans-Andina. Los simbolos representan la distribución cada una Figura 7. Árbol filogenético basado en un análisis de máxima verosimilitud en IQ-TREE. Los círculos rojos en los nodos indican valores de bootstrap % <95 (porcentaje sobre 1 000 réplicas). La escala en la parte inferior indica el número de sustituciones por sitio. Este árbol está basado en una matríz de datos concatenados que tiene una longitud de 386 196 pb. En el árbol se observa el acomodo de al menos ocho linajes correspondientes a R. laticauda. Por otro lado, tres linajes pueden distinguirse para R. 

Figura 8. Árbol de delimitación de especies realizado en SVDguartets el cual implementa el modelo de coalescencia multiespecie. Para este análisis se usó 6 158 SNPs y 96 Figura 9. Resultado del análisis de componentes principales (PCA) con elipses de 95% de intervalo de confianza realizado con 6 158 SNPs. Con base en la taxonomía actual, Figura 10. Visualización del resultado de análisis discriminante de componentes principales (DAPC), realizado con 6 158 SNPs para el grupo Rhamdia laticauda A) Dispersión de las especies de Rhamdia trans-Andina, bajo la clasificación actual, los círculos circulos representan a los individuos y las lineas la pertenencia a la especie actual a la que pertenecen. B) Dispersión de los 14 grupos totales de individuos calculados con find.clusters en los que se incluyen los individuos de Rhamdia trans-Figura 11. Inferencia de árbol filogenético basado en el modelo de coalescencia multiespecie realizado en SNAPP utilizando un total de 606 SNPs bialélicos. (A) Todos los árboles muestreados, las áreas que muestran una mayor densidad significan un mayor acuerdo con la topología más probable. (B) Árbol consenso fechado en el tiempo usando una calibración secundaria basada en Hernández et al. (2015), el nodo calibrado Figura 12. Estimación de rangos ancestrales inferidos bajo el modelo Dispersión-Extinción-Cladogénesis (DEC + j) en BioGeoBears. Las áreas marcadas en los nodos indican en area con la mayor probabilidad del ancestro. El mapa que se muestra a la izquierda las unidades biogeográficas correspondientes a los bloques geológicos de América Media: A) Bloque Maya; B) Bloque Chortis; C) Bloque Chorotega; D) Bloque 

#### RESUMEN

El género Rhamdia comprende un clado taxonómico de peces dulceacuícolas neotropicales constituido por 27 especies que se subdividen en dos clados principales, un clado cis-Andino y uno trans-Andino, este último también conocido como el clado de América Media (AM). Miembros del clado de AM se distribuyen desde Veracruz (sureste de México), hasta el norte de Sudamérica (abarcando países como Colombia, Venezuela y Ecuador). Sin embargo, la taxonomía y sistemática de este grupo es controversial debido a sinonimizaciones y revalidaciones para algunas de sus especies. Por esta razón, éste trabajo pretende establecer las relaciones filogenéticas, los tiempos y modo de diversificación de las especies de Rhamdia de AM. Para esto, se llevó a cabo una reconstrucción filogenética bajo inferencia de máxima verosimilitud, implementando también el modelo de coalescencia multiespecie y bayesiana, en el que se utilizaron datos genómicos, obtenidos mediante el método 3RADseq. Asimismo, se utilizó una calibración secundaria para estimar tiempos de divergencia. Adicionalmente se realizó una estimación de áreas ancestrales. Los resultados indican que el clado de AM se divide en dos grupos recíprocamente monofiléticos: la especie Rhamdia guatemalensis y el clado que incluye la especiea Rhamdia cinerascens como especie hermana del clado formado por las especies tradicionalmente consideradas como el grupo Rhamdia laticauda. Los resultados además corroboran la parafilia de Rhamdia laticauda y que este grupo consiste en linajes geográficos bien soportados. Los resultados de datación molecular indican que el ancestro común más reciente del clado de AM se originó en Sudámerica, hace aproximadamente 6.8 Ma, durante el Mioceno. Se hipotetiza que algunos eventos que promovieron la diversificación y distribución actual de este grupo incluyen la formación de la Cordillera de Talamanca, la depresión de Nicaragua, la falla del Motagua y las fluctuaciones climáticas y ecológicas derivadas de las glaciaciones ocurridas en el Pleistoceno.

#### I. INTRODUCCIÓN

Entender los procesos que causan la diversificación de los seres vivos en el planeta ha sido uno de los mayores retos en el campo de la biología evolutiva. Estos procesos frecuentemente son asociados entre muchos otros a eventos históricos, relacionados con la historia geológica de la región o también a eventos ecológicos en escalas más recientes, como el cambio climático. Ambos eventos, tanto históricos como ecológicos, pueden promover la especiación, por medio del aislamiento de poblaciones o la dispersión (Nürk et al., 2020; Acha et al., 2021); sin embargo, también pueden promover procesos de extinción. La biología evolutiva se apoya fuertemente de la sistemática filogenética, cuyo objetivo es describir las relaciones ancestro descendencia entre las diferentes especies y taxones supraespecíficos, de manera que dichas relaciones permitan organizar y clasificar a las especies (Contreras-Ramos y Goyenechea, 2007). Además de relaciones de parentesco (particularmente, relaciones de ascendencia común reciente) la sistemática filogenética permite hacer inferencias sobre la temporalidad de las divergencias entre especies y linajes (Perea et al., 2017). Esta información, hace posible que se pueda inferir y entender la rapidez y las circunstancias por las cuales ocurrieron cambios evolutivos que pudieron promover la diversificación, o en caso contrario, la extinción de las especies (Sanderson y Donoghe, 1996; Rabosky, 2009).

Debido a que las especies son la unidad básica para diversos estudios en distintas áreas, especialmente en los estudios de diversificación biológica, biogeografía y biología de la conservación, la delimitación de especies de forma objetiva es indispensable para comprender diversos mecanismos y procesos evolutivos (Sites y Marshall, 2003; De Queiroz, 2007; Pie *et al.*, 2019). Sin embargo, en muchas ocasiones, la clasificación para ciertos grupos de organismos tanto a nivel de especie como categorías taxonómicas superiores se convierte en una tarea difícil debido a diferentes procesos biológicos y evolutivos complejos, por lo que el empleo de diferentes caracteres o propiedades de los organismos, así como también la implementación de metodologías y datos moleculares más sofisticados, se han convertido en una herramienta necesaria para permitir dilucidar las relaciones filogenéticas de aquellos taxones controversiales (Herrera y Shank, 2016;

Weirauch *et al.*, 2018). Diferentes procesos biológicos como la hibridación, la separación incompleta de linajes, y la transferencia horizontal de genes, pueden convertirse en aquellos factores que intervienen en el proceso de especiación y dificultan la inferencia filogenética en diversos taxones; de la misma forma, la falta de información ecológica, geográfica, y la ontogenia de la especie, entre muchas más, pueden ser una limitante que dificulte llegar a una delimitación de especie acertada (Zhang, 2020).

El orden Siluriformes comprende uno de los grupos de peces más diversos con una amplia distribución y representatividad en el Neotrópico; su alta adaptabilidad a diferentes tipos de hábitats y nichos ecológicos lo han convertido en uno de los órdenes que ha experimentado una de las radiaciones adaptativas más importantes en las cuencas de Sudamérica y el resto de la zona neotropical (Labastidas, 2005). Este grupo se ha caracterizado por presentar dificultades en la clasificación y resolución de las relaciones filogenéticas entre familias, géneros y muchas de sus especies, por lo que muchas de las filogenias disponibles para taxones dentro de Siluriformes no están completamente resueltas (Sullivan et al., 2006; Kappas et al., 2016). Heptapteridae, una de las familias miembro de Siluriformes, cuenta actualmente con 239 especies válidas (Fricke *et al.*, 2025), y es la cuarta familia con mayor riqueza de especies dentro del orden. Al igual que muchas de las familias de Siluriformes, durante mucho tiempo, la posición filogenética de Heptapteridae fue confusa. Durante varias décadas, sus miembros fueron incluidos dentro de Pimelodidae, no obstante, aunque actualmente se reconoce a Heptapteridae como un grupo monofilético, la posición filogenética de muchos de sus géneros y especies aún sigue siendo controversial, ya que algunos de ellos se han mostrado parafileticos o polifiléticos.

Dentro de Heptapteridae se encuentra el género *Rhamdia*, este es un grupo de bagres dulceacuicolas neotropicales con una amplia distribución, que se expande desde las cuencas del sureste de México (Papaloapan, Tehuantepec, Coatzacoalcos, Grijalva Usumacinta y Peninsula de Yucatán) hasta el centro de Argentina (Figura 1). Actualmente, este género está constituido por 27 especies válidas (Fricke *et al.,* 2025) y se encuentra subdividido en dos distintivos clados geográficos correspondientes a un grupo cis-Andino (17 especies) y un grupo trans-Andino y de América Media (10

2

especies) (Perdices *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2015). Esta subdivisión se asocia a la gran barrera biogeográfica que produce la cordillera de los Andes, la cual se ha sugerido es responsable de la divergencia de estos dos subgrupos aproximadamente hace ocho millones de años (Perdices *et al.*, 2002). El grupo de AM de *Rhamdia* se extiende específicamente desde el norte del Itsmo de Tehuantepec en el estado de Veracruz, México (Wilkens, 2001) sin cruzar el Eje Neovolcanico Transversal de México, hasta el norte de Sudamérica, sin sobrepasar los límites de la cadena montañosa de los Andes (Figura 1).



Figura 1. Rango de distribución del género Rhamdia. El clado de Rhamdia trans-Andina se distribuye en la región noroeste de la cadena montañosa de los Andes.

En la actualidad, existen algunos estudios que han tratado de resolver la sistemática y taxonomía de Rhamdia, sin embargo, estos estudios están basados en muestreos parciales y no exhaustivos, y por lo general con especímenes de pocas poblaciones (Perdices et al., 2002; Hernández et al., 2015; Arroyave y de la Cruz-Fernández, 2021a). Además, estos mismos estudios donde se han empleado tanto caracteres genéticos como morfológicos sugieren que el grupo trans-Andino se divide en dos subclados principales (*R. guatemalensis* y el complejo "laticauda"); no obstante, la monofilia de R. laticauda y las relaciones filogenéticas entre las especies de este complejo, incluyendo cuatro especies troglobias endémicas de México (R. zongolicensis, R. macuspanensis, R. reddelli, R. laluchensis), no han sido completamente resueltas. Esto ha provocado que la validez de las especies hipogeas mexicanas hava sido cuestionada por diferentes autores (Arroyave et al., 2021a; Arroyave y de la Cruz-Fernández, 2021b), incluso hace mas de dos décadas atrás, Silfvergrip (1996) no consideró a estas especies válidas, sino más bien, sugirió que R. reddelli y R. zongolicensis, podrían corresponder a poblaciones de la especie R. laticauda, y que las presiones selectivas dada la condición de hábitat en ambientes subterráneos/cavernosos han jugado un papel determinante en los cambios fenotípicos diagnosticables para cada una de estas especies.

Como consecuencia de lo anteriormente mencionado, las relaciones evolutivas no han sido totalmente esclarecidas y el estado taxonómico de algunas especies sigue siendo aún incierto. Esta problemática y la diversidad moderada del subclado trans-Andino brinda una oportunidad para investigar no solo las relaciones filogenéticas entre sus miembros, sino también la historia biogeográfica del grupo.

#### II. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Familia Heptapteridae

Los peces son el grupo de vertebrados más diverso y los Siluriformes, mejor conocidos como "bagres" o "peces gato", conforman uno de los órdenes con mayor riqueza de especies ya que cuentan con al menos 3 995 especies válidas (Fricke *et al.,* 2024). Dentro de este gran orden se encuentra la familia Heptapteridae, que es un grupo de peces neotropicales constituido actualmente por 23 géneros y 239 especies válidas (Fricke *et al.,* 2025). Esta familia se encuentra ampliamente distribuida desde el sur de México hasta Argentina, y puede ocupar una gran variedad de hábitats de agua dulce, incluyendo ríos, manantiales, lagos y lagunas, con fondos rocosos y vegetación sumergida (Bockmann y Guazzelli, 2003; Faustino-Fuster *et al.,* 2021).

Inicialmente, muchos de los taxones que actualmente pertenecen a Heptapteridae se encontraban ubicados dentro de la familia Pimelodidae, debido a que Heptapteridae hasta ese entonces no era reconocida como una familia. No obstante, Lundberg y McDade (1986) presentaron la primera evidencia filogenética de un subgrupo monofilético equivalente a Heptapteridae dentro de Pimelodidae (de Pinna, 1998; Silva *et al.*, 2021). Lundberg *et al.*, (1991), definieron nuevamente a ese grupo añadiendo más generos, y lo denominaron como la subfamilia Rhamdiinae, aunque tiempo después de Pinna (1993) designó a este grupo como una familia, nombrándola Rhamdiidae. Sin embargo, debido a que Heptapterinae (Gill, 1861) tenía prioridad sobre Rhamdiinae por su antigüedad, fue priorizado y usado a nivel familia nombrándola Heptapteridae (de Pinna, 1993; Silfvergrip, 1996).

Finalmente, Lundberg y McDade (1986) consolidaron a Heptapteridae como una familia que incluía 13 géneros para ese entonces, en esta familia: *Brachyglanis*, *Brachyrhamdia*, *Cetopsorhamdia*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Imparfinis*, *Myoglanis*, *Nannorhamdia*, *Pariolius*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia* y *Typhlobagrus*; y

propusieron las siguientes sinapomorfías con base en caracteres anatómicos para clasificar a este grupo:

- **1.** Borde posterior del proceso transverso de la cuarta vertebra expandido lateralmente sobre la vejiga natatoria y con una o varias hendiduras.
- Espina neural del complejo de Weber unido por una lámina ósea horizontal o apenas elevada.
- Proceso de la hiomandíbula para inserción del músculo "levator operculi" muy expandido
- 4. Cuadrado con margen dorsal bífido y libre
- 5. Presencia de un proceso anterior del mesetmoides recurvado

Oficialmente, la familia Heptapteridae fue reconocida por Bockmann y Guazelli (2003), pero la sistemática y taxonomía para este grupo ha sido cuestionada debido a las distintas hipótesis intergenéricas propuestas por diferentes autores, que van desde descripciones y claves de identificación, hasta diversos estudios filogenéticos basados tanto en caracteres morfológicos como genéticos (de Pinna, 1998; Diogo y Peng, 2010). Así también, recientemente por estudios basados en inferencias realizadas con datos genómicos a gran escala (Faustino-Fuster *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021, Figura 2). Además, la controversia ha sido mayor debido a la dificultad para encontrar caracteres morfológicos externos visibles suficientes para llegar a una correcta delimitación (Lundberg y McDade, 1986; de Pinna, 1998; Sullivan *et al.*, 2006).



Figura 2. Árbol filogenético más reciente de la familia Heptapteriidae, realizado bajo inferencia de máxima verosimilitud con una matríz que incluye 1 319 loci de elementos ultraconservados (728 019 pb) (Silva *et al.*, 2021).

#### 2.2 El género Rhamdia Bleeker 1858

*Rhamdia* es un género descrito en 1858 por Bleeker. Originalmente los primeros datos e información para este grupo se remontan a una breve descripción realizada en 1648 por Marcgravius, quien probablemente recolectó al primer ejemplar en ríos de la costa noreste-oriental de Brasil (Silfvergrip, 1996). Descripciones subsecuentes fueron realizadas por otros autores, las cuales fueron en su mayoría escritas en latín y alemán (Silfvergrip, 1996; Koerber y Reis, 2019). *Rhamdia* se encuentra constituido actualmente por 27 especies válidas (Fricke *et al.*, 2025; Tabla 1), y su distribución se

extiende desde Veracruz, México (específicamente desde la cuenca del río Papaloapan), hasta el centro de Argentina (Figura 1), encontrándose la mayor diversidad en Sudamérica.

Tabla 1. Lista del total de especies válidas para el género *Rhamdia* (Fricke *et al.,* 2025)

	Rhamdia guatemalensis			
	Rhamdia laticauda			
	Rhamdia zongolicensis			
	Rhamdia reddelli			
Especies trans-Andinas	Rhamdia macuspanensis			
	Rhamdia laluchensis			
	Rhamdia parryi			
	Rhamdia nicaraguensis			
	Rhamdia cinerascens			
	Rhamdia saijaensis			
	Rhamdia branneri			
	Rhamdia quelen			
	Rhamdia foina			
	Rhamdia eurycephala			
	Rhamdia enfurnada			
	Rhamdia gabrielae			
	Rhamdia guasarensis			
Fanagiag dia Andinas	Rhamdia humilis			
Especies dis-Anumas	Rhamdia itacaiunas			

Rhamdia jequitinhonha Rhamdia laukidi Rhamdia parvus Rhamdia poeyi Rhamdia schomburgkii Rhamdia voulezi Rhamdia xetequepeque Rhamdia muelleri

Al igual que otros géneros pertenecientes a la familia Heptapteridae, la sistemática y taxonomía de *Rhamdia* ha sido un tema debatido, principalmente debido a la falta de caracteres morfológicos externos visibles para poder diagnosticarla (Bockmann, 1998; Bockmann y Slobodian, 2017). Anteriormente, *Rhamdia* era el género más diverso dentro de Heptapteridae, puesto que hasta inicios de la década de los 90s se consideraban 116 especies válidas, sin embargo, fue a partir de una revisión exhaustiva del género realizada por Silfvergrip (1996) con base en caracteres morfológicos y osteológicos, que la cantidad de especies válidas se redujeron a tan solo 11 especies, de las cuales al menos 47 especies fueron sinonimizadas con R. quelen. Silfvergrip (1996), reconoció únicamente tres especies para centroamerica: R. laticauda, R. nicaraguensis, y R. quelen, sin embargo, subsecuentes estudios resucitaron muchas de las especies que habían sido sinonimizadas, como R. guatemalensis, R. saijaensis y R. cinerascens (Perdices et al., 2002; Hernández et al., 2015). Perdices et al., (2002), demostró la existencia de dos grupos recíprocamente monofiléticos, constituidos por especies que se subdividen en un clado cis-Andino y un clado trans-Andino. La mayor diversidad de Rhamdia se encuentra en Sudamérica, y en México únicamente se distribuyen siete especies, de las cuales cuatro de ellas son microendémicas: Rhamdia zongolicensis, R. reddelli, R, macuspanensis y R. laluchensis.

Los peces del género *Rhamdia*, son comúnmente conocidos como bagres, juiles o barbudos, y habitan diferentes ambientes acuáticos, tanto lóticos (ríos y arroyos) como lénticos (tales como lagunas o presas), ya sean de sedimentos rocosos, de aguas turbias y de pocos nutrientes, o bien, aguas de flujo lento sin corrientes y poca vegetación (Julián, 2017). Algunas especies pertenecientes a este grupo son de hábitos troglobios y se encuentran en sistemas acuáticos subterráneos, tales como cuevas semisecas, cenotes y cuevas subacuáticas. Este tipo de ambientes ha generado que las especies hayan adquirido adaptaciones troglomórficas, como la perdida y reducción de pigmentación y de ciertos órganos como los ojos, de hecho, en algunos casos algunas especies con características troglobias pueden coexistir con individuos de su misma especie que no presentan mismas características, o bien, pueden presentar tan solo un desarrollo parcial de esos órganos (Miller, 2005). En cuanto a sus hábitos alimenticios, estos peces poseen un espectro alimenticio amplio, como pequeños invertebrados, peces más pequeños y restos vegetales (Julián, 2017).

De acuerdo con Silfvergrip (1996), *Rhamdia* es definida por presentar las siguientes características: 1) cuerpo revestido por piel sin escamas; 2) poseen tres pares de barbillones; 3) una aleta adiposa larga y libre; 4) ausencia de dientes en el vómer y placa; 5) aleta caudal bilobulada; 6) primer radio de la aleta pectoral duro (Hernández, 2015; de la Cruz, 2019).

#### 2.3 Sistemática

La sistemática es la disciplina que se encarga de estudiar la diversidad biológica a través de su historia evolutiva, trata de entender las posibles causas que promueven la diversificación de las especies, teniendo en cuenta tres objetivos principales: describir, clasificar y ordenar la biodiversidad (Crisci y Katinas, 2008). Antes de que la sistemática llegara a consolidarse como una disciplina, el ser humano, desde que tiene consciencia, ha mostrado un especial interés por clasificar y agrupar todo lo que lo rodea y que podría resultarle útil, incluyendo al resto de seres vivos (Conteras-Ramos y Goyenechea, 2007). Hasta el momento, la sistemática ha sido considerada como una de las disciplinas más

elementales y también inclusivas dentro de la biología, debido a que permite sistematizar y recabar toda información que se conozca de las especies, formando así un sistema general de entendimiento que vinculan muchas otras disciplinas también enfocadas en el estudio de los seres vivos, tales como la biogeografía, ecología ó fisiología (Morrone, 2013).

Históricamente, uno de los primeros naturalistas con un profundo interés en clasificar y ordenar la diversidad biológica fue Carl von Linneo, quien, a mediados del siglo XVIII, desarrolló un sistema de identificación y clasificación natural que agrupaba organismos según similitudes en características específicas, tal como una clasificación sexual en las plantas (Linneo, 1735). Su trabajo sentó las bases para el estudio sistemático de la naturaleza, principalmente debido a su sistema de nomenclatura binomial el cual ofrecía una forma sistémica para dar nombre a las especies.

Posteriormente, Charles Darwin y Alfred Rusell Wallace, revolucionaron la biología al establecer las bases del pensamiento evolutivo, ya que, conjuntamente llegaron a las mismas conclusiones acerca de la formación de las especies. Sin embargo, fue Charles Darwin quien publicó primero la teoría en su libro *"El origen de las especies"* en el año 1859, donde por primera vez ilustró un árbol filogenético (Figura 3), un diagrama que mostraba las relaciones evolutivas entre las especies mediante ramas bifurcadas. Para Darwin, la única forma de ordenar a las especies era con base en un sistema jerarquizado (Frost, 1994).



Figura 3. Árbol filogenético presentado por Darwin (1859) en "El origen de la Especies" (Tomado de "El Árbol de la Vida" (p. 2) por García-Meza (2015).

A inicios de la década de 1950, el entomólogo alemán Willi Hennig, desarrolló una disciplina y metodología basada principalmente en la idea de agrupar taxones con base en similitud especial (debida a ascendencia común reciente) y en busca de grupos monofiléticos (Hennig, 1950). Esta disciplina se conoce como sistemática filogenética o cladística, y en ella Hennig sugería centrarse en aquellas similitudes especiales compartidas entre las especies, llamadas sinapomorfías (Contreras-Ramos y Goyenechea, 2007; Barros, 2018). Además, aunque el término "monofilia" había sido descrito años anteriores por diferentes autores, otra de las grandes contribuciones de Willi Hennig fue su refinamiento en su definición, puesto que Hennig definió la monofilia como: "un grupo de especies que descienden de una única especie, y en la cual aparecen a la vez reunidas todas las especies que son descendientes de esta especie original" (Morrone, 2000). Esta contribución marcó uno de los avances más significativos para la sistemática.

En los últimos 50 años, la sistemática ha avanzado debido a la implementación de métodos cuantitativos y sofisticados para construir clasificaciones, por ejemplo, el uso de muchos tipos de caracteres de las especies para la inferencia filogenética. Aunque en su

mayoría las filogenias han sido fuertemente apoyadas por datos moleculares (Stuessy, 2020).

#### 2.4 Filogenética molecular

La filogenética molecular consiste en estudiar y comprender aquellas relaciones evolutivas que existen entre los seres vivos, usando principalmente datos de ADN, y junto con ello conocer los tiempos en los que pudo haber ocurrido la diversificación de cualquier especie en particular (Ajawatanawong, 2016). El genoma es el empaquetamiento donde se encuentra contenido el material genético, a lo largo del tiempo los genomas evolucionan debido en parte, a la acumulación gradual de mutaciones, esto permite que cada especie sea diferente, y que sea debido a esta diferencia en la secuencia de nucleótidos que podamos llegar a definir una aproximación de que tan reciente dos genomas en comparación pudieron haber compartido un ancestro común (Brown, 2002), por lo que los análisis comparativos de las secuencias moleculares se ha convertido en un método de preferencia para estimar las relaciones evolutivas (Fitch y Margoliash, 1967; Woese y Fox, 1977; Liberles *et al.*, 2020).

Las primeras técnicas de análisis de comparaciones de caracteres entre las especies para conocer la posición y relaciones que ocupa una especie en un grupo fueron realizadas con base en pruebas inmunológicas, electroforesis de proteínas y datos de hibridación ADN-ADN. Eventualmente, el ADN se convirtió en la molécula principal para estos estudios, debido a que éste contiene más información filogenética (variación para ser analizada) que las proteínas (Brown, 2002). Las técnicas más recientes usan análisis de secuencias de ADN y de la misma manera pueden utilizarse marcadores genéticos, que son más específicos y que pueden usarse para estudios sobre migraciones (Ajawatanawong, 2016).

Las primeras nociones acerca de emplear secuencias de ADN para poder inferir las relaciones genealógicas entre las especies fueron propuesta por primera vez por Francis Crick (1958) y posteriormente la idea fue reforzada por Zuckerkandly y Pauling (1962), quienes proponían que el tiempo en el cual pudo haber divergido una especie podría estimarse a partir de comparar las distancias o diferencias entre dichas secuencias (Pace *et al.*, 2012; Abascal *et al.*, 2014). En un principio, los árboles filogenéticos tenían el único objetivo de poder representar cuáles eran aquellas relaciones de parentesco entre los organismos objeto de estudio bajo contextos evolutivos. Sin embargo, en la actualidad su aplicación puede emplearse para comprender diversos cuestionamientos biológicos, tales como la historia de poblaciones, la evolución y dinámica epidemiológica de patógenos, las relaciones entre parálogos de una familia de genes, y la reconstrucción de genomas ancestrales (Yang y Rannala, 2012).

#### 2.5 Secuenciación de nueva generación

Los primeros métodos de secuenciación de ADN y ARN consistían en la degradación química de las moléculas para conseguir fragmentos que podían ser analizados de manera individual. El avance más significativo basado en la terminación de la cadena fue desarrollado en forma independiente en 1977 por Frederick Sanger y por Walter Gilbert, esta técnica permitió lecturas de secuencias de hasta cientos de nucleótidos de longitud, de manera que revolucionó la biología molecular al posibilitar la rápida secuenciación de ADN y ARN (Heather y Chain, 2016; Satam *et al.,* 2023).

A principios del siglo XXI se desarrolló una nueva tecnología con un enfoque de secuenciación paralela masiva, que incluía básicamente la generación simultanea de miles o millones de secuencias cortas de ADN en una sola corrida. Esta secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés), ha ofrecido mejoras sobre la secuenciación de Sanger, principalmente debido a la rápida y eficiente secuenciación de grandes cantidades de datos comparativos para diversos tipos de estudios. Algunas de las ventajas de obtener múltiples fragmentos de ADN alrededor de todo el genoma es la facilidad de detectar un amplio espectro de polimorfismos genómicos, por ejemplo, desde la variación de un único par de bases hasta mutaciones puntuales, inserciones y deleciones o duplicaciones genómicas, además de no requerir de un genoma de referencia, por lo que es ideal para organismos no modelo (Pante *et al.*, 2015a; López, 2016). Por otra parte, es importante mencionar que ante la existencia de técnicas como la secuenciación de genomas completos, donde es posible obtener regiones codificantes

y no codificantes en su totalidad, continúa siendo un reto, dado que se obtiene una gran cantidad de información y que en muchas ocasiones puede ser difícil para analizar y almacenar. Además de que brindan un sinfín de variantes de significado incierto, así como el tiempo para generar resultados puede ser más prolongado, en comparación con otros métodos.

Derivado de la secuenciación masiva de próxima generación se ha desarrollado una técnica denominada secuenciación de ADN asociado al sitio de restricción (RAD-seq), en las que se efectúa un muestreo genómico empleando enzimas de restricción para realizar una digestión del genoma y obtener miles de *loci* y sitios polimórficos (SNPs) distribuidos por todo el genoma (Baird *et al.*, 2008). El genotipado RAD-seq ha demostrado ser útil para ayudar a describir patrones de estructura de poblaciones, investigar relaciones filogenéticas y probar la diferenciación de especies en organismos donde los caracteres morfológicos y el uso exclusivo de limitados números de *loci* han sido poco informativos (Aurelle *et al.*, 2021; Pante *et al.*, 2015b). Un enfoque alternativo y más reciente derivado del método original es 3RAD-seq, método en el cual se utilizan tres enzimas de restricción y dos adaptadores de forma simultánea, esta modificación en la técnica promueve ciertas ventajas, como evitar la formación de dímeros en los adaptadores y reducen la formación de quimeras y un flujo de trabajo simplificado con pocos intercambios de amortiguadores consecutivos (Bayona-Vásquez *et al.*, 2019).

Asimismo, debido a que las diferentes partes del genoma pueden contar diferentes historias evolutivas, recientemente se ha incorporado sincrónicamente métodos basados en el modelo de coalescencia multiespecie (Kingman, 1982) y el uso de múltiples *loci* para proporcionar un marco natural en la inferencia de árboles de especie y árboles de genes (Buckley *et al.*, 2018; Hühn *et al.*, 2022). Este tipo de análisis puede proporcionar información para detectar fuentes de discordancia entre arboles de genes y especies que pueden ser generadas por la separación incompleto de linajes (también conocida como coalescencia profunda) o introgresión/hibridación, los métodos coalescentes utilizan una modelización computacional para determinar el número de especies putativas en un grupo (Hühn *et al.*, 2022).

#### **III. ANTECEDENTES**

Como anteriormente se ha mencionado, *Rhamdia* es un género descrito originalmente por Bleeker (1858), y al igual que muchos Siluriformes, este taxón ha pasado por una larga transición en su historia taxonómica. La primera descripción del primer especímen para este género fue realizado por Marcgravius (1648), y fue nombrado como 'nhamdiâ (Figura 4), posteriormente surgieron nuevas descripciones de especies que, aunque inicialmente en su mayoría fueron descritas como *Pimelodus*, eventualmente fueron reconocidas dentro de *Rhamdia* (Bloch, 1794; Humboldt, 1821). No obstante, cabe mencionar que mucha información acerca de las descripciones y especialmente el material tipo empleado para las descripciones, fueron extraviadas o nunca fueron establecidas (Anza, 2006), aunque, se ha asumido que un ejemplar identificado como *R. quelen* se ajusta al holotipo que había sido descrito como primera especie para el género (Silfvergrip, 1996).



Figura 4. Primera ilustración de *Rhamdia* ('nhamdiâ') del primer especímen descrito, que posiblemente pudo haber sido R. quelen. Ilustración tomada de Historia Naturalis Brasiliae, Auspicio et Beneficio Illustriss. I. Mauritii Com. Nassau Illius Provinc.

Uno de los trabajos más representativos fue realizado por Silfvergrip (1996), quien hizo una revisión exhaustiva acerca de la sistemática para el género. En ese entonces

habían alrededor de 116 especies descritas para Rhamdia, sin embargo, a raíz del trabajo de Silfvergrip, el número de especies se redujo considerablemente a 11, las cuales fueron: Rhamdia foina, R. humilis, R. itacaiunas, R. jequitinhonha, R. laticauda, R. laukidi, R. muelleri, R. nicaraguensis, R. poeyi, R. xetepeque y finalmente R. quelen. De las cuales únicamente R. laticauda, R. nicaraguensis y R. quelen eran consideradas para América Central. Cabe destacar que 47 especies fueron sinonimizadas con R. quelen, considerándola como una especie de amplia distribución, que habitaba desde México hasta Argentina (Anza, 2006). Más tarde, un estudio subsecuente sugirió que algunas de las especies que habían sido sinonimizadas, como R. guatemalensis, R. saijaensis y R. cinerascens fueran consideradas especies válidas (Hernández et al., 2015); además, nuevas especies fueron halladas en México: R. reddelli (Miller, 1984), R. zongolicensis (Wilkens, 1993), y R. macuspanensis (Weber y Wilkens, 1998) y por mucho tiempo fueron consideradas como especies válidas por Weber y Wilkens (1998). Para otros autores, estas mismas especies eran consideradas como R. laticauda (Silfvergrip, 1996; Bockmann y Guazzelli, 2003), mientras que R. parryi (especie que se distribuye sobre la vertiente del pacífico al sur de México) fue considerada como una especie válida y diferente a R. laticauda. Por otro lado, R. guatemalensis, también fue una especie sinonimizada con R. quelen (Silfvergrip, 1998), aunque otros autores (Miller, 1984; Romero y Paulson, 2001; Wilkens, 2001) diferían de esta postura y consideraban a R. guatemalensis como una especie independiente (Anza, 2006).

El estudio publicado por Perdices *et al.* (2002) hizo una distinción muy importante para *Rhamdia*, como resultado de un análisis filogenético de ADN mitocondrial. Este género se dividió en dos subclados principales, los cuales fueron denominados como el subclado trans-Andino (que inicia a partir del lado noroeste de la cadena montañosa de los Andes), y el otro como cis-Andino (que contempla a aquellos individuos que se distribuyen sobre el este de la cadena montañosa de los Andes). Dicho análisis logró resolver parte de las incongruencias con respecto a *R. guatemalensis*, y fue reconocida como una especie independiente al grupo *laticauda*, al igual que *R. cinerascens*, lo cual confirmaba las afirmaciones de Miller (1984). Sin embargo, esta filogenia implicaba algunos problemas taxonómicos, ya que dentro del grupo *R. laticauda* se anidaban *R. reddelli y R. nicaraguensis*. El estudio de Perdices *et al.* (2002), además, fue el primero

en ilustrar la historia evolutiva de *Rhamdia* bajo un contexto biogeográfico, y también infirió los tiempos en los cuales este grupo pudo haber divergido.

Finalmente, los estudios más recientes que han tratado de resolver la sistemática y taxonomía de *Rhamdia* en las que se incluyen especies trans-Andinas (principalmente especies que se distribuyen en México), han utilizado tanto caracteres genéticos para reconstruir filogenias como caracteres morfométricos (de la Cruz-Fernández, 2019; Arroyave *et al.*, 2021; Arroyave y de la Cruz-Fernández, 2021a). Mismos estudios recobran a cada una de las especies troglobias mexicanas anidadas dentro de *R. laticauda*, lo que sigue poniendo en duda la monofila de cada una de ellas, sugiriendo que dichas especies microendémicas de México podrían ser poblaciones derivadas de *R. laticauda*, que aún se encuentran en proceso de especiación y podrían considerarse como especies incipientes, o bien, sean poblaciones de divergencia temprana (Arroyave y de la Cruz-Fernández, 2021a). Por otro lado, se ha sugerido que las principales diferencias entre las especies troglóbicas y la especie *R. laticauda* pueden ser derivadas de la plasticidad de cada individuo debido al hábitat donde se encuentran (Pérez-Rodríguez *et al.,* 2023).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Dado el número de especies válidas actuales para *Rhamdia* trans-Andina y debido a los antecedentes expuestos para este género, en el presente estudio se propone investigar la historia evolutiva del clado de América Media (AM) de *Rhamdia* mediante análisis filogenéticos, datación molecular y una reconstrucción de áreas ancestrales. Hasta hoy día, previos registros de estudios sistemáticos y biogeográficos han sido expuestos, pero bajo ciertas limitaciones, principalmente, debido a que no se han incluido a todas o la mayoría de las especies para el clado trans-Andino. Además, a pesar de que estudios más recientes se han realizado con base en métodos de secuenciación de Sanger y análisis morfológicos, la parafilia de *R. laticauda* sigue siendo un problema. Aunado a ello, otra de las dificultades para clasificar a este grupo es el amplio espectro de variación fenotípica entre las especies, ya que tanto las especies de superficie como las especies

troglobias presentan diferencias morfológicas entre y dentro de las especies (de la Cruz, 2019). Es decir, que, aunque hay estudios con base en la morfología que clasifican a cada una de las especies de *Rhamdia* como especies distintivas, estos análisis no han sido lo suficientemente robustos para llegar a dicha conclusión, por lo que la comprensión de la historia evolutiva y las relaciones filogenéticas entre las especies aun queda por delucidar.

Por lo tanto, a diferencia de los métodos como la secuenciación de Sanger, los métodos actuales de secuenciación de próxima generación permiten obtener una mayor disponibilidad de datos alrededor de todo el genoma lo que posibilitará obtener una cantidad mayor de miles de loci. Esto hace posible identificar gran cantidad de sitios polimórficos, lo que permite estudiar la variabilidad genética a mayor resolución. Al mismo tiempo, debido a que existe un interés por conocer las relaciones filogenéticas de especies de amplia distribución (*R. guatemanlensis* y el complejo *R. laticauda*), en el presente estudio se aumentaron el número de poblaciones y de individuos para cada especie. Por lo que se espera obtener una reconstrucción filogenética más completa, aumentando el número de especies. Y con ello contribuir a un mejor entendimiento en la evolución de este taxón bajo estudio.

#### V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La falta de una resolución filogenética en *Rhamdia* trans-Andina, convierte a este subclado en un grupo de interés para estudiar y comprender las relaciones filogenéticas entre sus miembros, así como también los eventos históricos que han forjado no solo los patrones de diversificación, sino también la distribución actual de las especies dentro del grupo. Por lo tanto, con base en ello la principal pregunta en este estudio es ¿Cuáles son las relaciones filogenéticas entre las especies del clado de América Media de *Rhamdia*? y sincrónicamente a ello, ¿Cuál ha sido el contexto temporal de la diversificación de este grupo y cuáles fueron aquellos eventos geológicos que pudieron haber intervenido en la diversificación de las especies actuales de *Rhamdia*?

#### VI. HIPÓTESIS

La historia evolutiva de *Rhamdia* trans-Andina en América Media ha sido moldeada por una serie de eventos geológicos y climáticos que, en conjunto, han propiciado la diversificación y distribución actual de sus especies. Se plantea que los tiempos de divergencia y áreas ancestrales de este grupo han sido fuertemente influenciados por eventos que pudieron actuar como barreras o impulsar la dispersión de estos organismos, lo que pudo haber conducido a procesos de especiación, tales como la conclusión del levantamiento del Itsmo de Panamá, los eventos desencadenantes provocados por la unión de la falla del Motagua, el levantamiento de la cordillera de Talamanca y las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno. Por otro lado, se anticipa que el uso de metodologías de secuenciación masiva, al proporcionar un mayor número de loci genéticos, podrá brindar una mejor resolución y mayor soporte de las relaciones evolutivas entre las especies y permitirá una clasificación más precisa de las relaciones filogenéticas.

#### VII. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Analizar la historia evolutiva del clado de América Media (incluidas especies trans-Andinas) del género *Rhamdia*, mediante una aproximación filogenómica y biogeográfica.

#### 3. 2 Particulares

• Determinar las relaciones filogenéticas entre los miembros del género *Rhamdia* del clado de América Media con base en datos moleculares generados mediante secuenciación masiva (RADseq).

• Inferir el contexto geográfico y temporal de la diversificación del grupo mediante reconstrucción biogeográfica y datación molecular de la filogenia resultante.

#### VIII. MÉTODO

#### 8.1 Recolecta y obtención de muestras

Para este estudio se utilizaron muestras de tejido de especímenes recolectados durante estudios previos que abarcaron principalmente la zona del sureste de México (Figura 5); particularmente de la Península de Yucatán, Veracruz, Tabasco y Oaxaca (Arroyave *et al.,* 2021a; Arroyave y de la Cruz-Fernández, 2021b; Arroyave y De La Cruz Fernández, 2021). Dicho material previamente recolectado se encuentra depositado en la Colección Nacional de Peces, Instituto de Biología-UNAM (CNPE, IBUNAM). También, se realizaron muestreos a diferentes localidades de Chiapas (México), Guatemala, y Costa Rica; este último con el objetivo de recolectar especialmente muestras de *R. nicaraguensis* y mejorar su representatividad. Tambien fue posible obtener muestras de tejido para el resto de las especies con distribución en Centroamérica y Sudamérica gracias a la colaboración con diferentes colecciones internacionales como: el Field Museum of Natural History y Louisiana State University (E.E.U.U.), el Royal Ontario Museum (Canadá), y la Colección de Tejidos del Instituto Humboldt (IAvH-CT) (Colombia).

Los muestreos en campo para la captura de los ejemplares consistieron en el uso de diferentes tipos de artes de pesca dependiendo del tipo, estructura y dimensiones del hábitat; en la mayoría de los casos se usaron atarrayas, electropesca y trampas de nasa (en las cuales se colocaron cebos atrayentes, como residuos de pescados, atún o embutidos). Los ejemplares capturados fueron eutanizados y posteriormente se tomaron muestras de tejido cortando un trozo de la aleta pectoral derecha para cada individuo,

cada una de las muestras fueron colocadas en alcohol al 96% para mantener su preservación.

En total, el muestreo taxonómico y geográfico consistió en 112 individuos representantes de un total de nueve de las 10 especies pertenecientes al clado trans-Andino de *Rhamdia*: *R. guatemalensis*, *R. laticauda*, *R. zongolicensis*, *R. macuspanensis*, *R. reddelli*, *R. parryi*, *R. laluchensis*, *R. nicaraguensis*, *R. cinerascens*, siendo estas el grupo interno, y siete especies de heptapteridos como grupo externo: *Imparfinis stictonotus*, *Pimelodella chagresi*, *Pimellodela macturki*, *Pimelodus tetramerus y R. quelen* (Anexo 1). Cabe destacar que inicialmente se contaba con el número completo de especies de *Rhamdia* trans-Andina (10 especies), sin embargo, había individuos mal identificados que posteriormente fueron corregidos, y se realizó una nueva reasignación de nombres para esos individuos, obteniendo al final una matriz con todas las especies, a excepción de *R. saijaensis*, ya que esta especie estaba mal identificada y en realidad pertenece *R. guatemalensis*.



Figura 5. Mapa de distribución de los individuos seleccionados de las especies del género *Rhamdia.* 

#### 8.2 Extracción de ADN, preparación de bibliotecas genómicas y secuenciación

El ADN genómico fue extraído empleando el kit *DNeasy Blood and tissue* de Quiagen siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, para evaluar la cantidad de ADN de cada una de las extracciones, se utilizó el Fluorómetro Qubit 2.0 de Invitrogen y las muestras de ADN tuvieron que ser normalizadas a 20 ng/µL, asegurándose de obtener por lo menos  $\geq$  5 ng/µL de ADN por cada una de las muestras. Adicional a ello, la

evaluación de la calidad de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Se generaron bibliotecas genómicas 3RAD-seq siguiendo el protocolo Adapterama III (Bayona-Vásquez *et al.*, 2019), en la que se utilizaron dos enzimas de restricción para realizar la digestión, las cuales fueron: Clal (que reconoce los sitios 5' AT^CGAT 3'), y BamHI (que reconoce los sitios 5' G^GATC\_C 3'). De igual forma, siguiendo el protocolo, se agregó una tercera enzima (Mspl) para evitar la formación de dímeros y quimeras en los adaptadores en el proceso de ligación. De manera simultánea, fueron añadidos los adaptadores para unirse a los extremos resultantes de la digestión enzimática, un adaptador complementario al corte cohesivo en cada extremo especifico de cada enzima, en este caso al extremo P1 (Mspl) y al extremo P2 (Xbal). Posterior al proceso de digestión, se realizó la ligación de los adaptadores. Tanto la realización de las extracciones como la preparación de bibliotecas genómicas fueron realizadas en Pritzker Laboratory for Molecular Systematics and Evolution, del Field Museum of Natural History (Chicago, E.E.U.U.).

Finalmente, las librerías fueron enviadas para secuenciación genómica usando la plataforma Illumina HiSeq 2000 a la compañía Novogene Laboratories (Davis, CA), dicha secuenciación fue realizada desde ambos extremos al mismo tiempo (*paired-end sequencing*). Finalmente, se obtuvieron fragmentos con un tamaño de 140 pb.

#### 8.3 Procesamiento de datos genómicos

El procesamiento bioinformático de los datos crudos se realizó utilizando Ipyrad v0.9.97 (Eaton y Overcast, 2020). Este programa incluye básicamente siete pasos esenciales para poder llevar a cabo el demultiplexado, filtrado y alineamiento de las secuencias de archivos *fastq* provenientes de la secuenciación. Para ello, Ipyrad utiliza un archivo en formato texto (.txt) que incluye los parámetros necesarios que pueden ser configurados y también utilizados de forma predeterminada para poder realizar cada uno de los pasos necesarios del procesamiento bioinformático.

Primeramente, se realizó el demultiplexado de las muestras para ordenar y asignar cada una de las secuencias de acuerdo con el individuo a las cuales pertenecen, utilizando los códigos de barras (*barcodes*) de cada fragmento de las muestras. Estos códigos de barras son partes de las secuencias reconocidas constituidas por las secuencias de las enzimas y de los adaptadores, que sirven como un identificador para cada individuo. El demultiplexado fue combinatorio, se utilizaron códigos de barras para ambos extremos obtenidos de la secuenciación (R1 y R2). Una vez listo el demultiplexado, el siguiente paso consistió en realizar una evaluación de calidad de las lecturas, esta evaluación fue realizada a través de FastQC (Andrews, 2010), y posteriormente se realizó un mismo análisis con MultiQC (Ewels *et al.,* 2016), para conocer la calidad de las lecturas de todos los individuos de forma simultánea.

Las secuencias fueron filtradas eliminando todas aquellas lecturas replicadas y conservando las lecturas únicas, se utilizaron los valores estándar en los distintos parámetros de lpyrad, salvo el que se refiere al parámetro de agrupamiento entre las muestras. Las secuencias fueron agrupadas de acuerdo con su similitud dentro de cada muestra con un umbral de 0.85. Finalmente, se obtuvieron 17 archivos de salida en diferentes formatos, los cuales brindaron datos importantes como los estadísticos del procesamiento para cada uno de los pasos y también se obtuvieron los archivos que eventualmente fueron empleados de forma específica para realizar cada uno de los análisis subsecuentes.

Con el objetivo de conocer las implicaciones de trabajar con diferentes proporciones de datos faltantes, y debido a que algunas muestras obtuvieron poca cantidad de lecturas, se generaron cuatro matrices con diferentes valores del paramétro *Min\_samples\_locus*, que significa número mínimo de muestras con datos. Para ello se utilizaron diferentes porcentajes de datos compartidos para el 60, 70, 80 y 90 por ciento. Del total de 112 individuos, es decir, cada locus tendría que compartirse entre al menos 67, 78, 90 y 101 individuos del total (Tabla 2). Todo el análisis bioinformático fue realizado en el servidor de la Unidad de Síntesis en Sistemática y Evolución (UniSSE) del Instituto de Biologia de la UNAM.

Min_samples_locus	No. Individuos	SNPs	Longitud	Loci	Datos faltantes
60%	67	60 130	470 523	3 770	23.33
70%	78	49 570	386 196	2 979	19.98
80%	90	11 864	91 803	461	17.41
90%	101	16	239	1	9.84

Tabla 2. Datos obtenidos para cada una de las matrices generadas con diferentes valores de *Min\_samples\_locus*.

#### 8.4 Análisis filogenéticos

Con el objetivo de conocer las relaciones filogenéticas entre especies del clado de América Media de Rhamdia trans-Andina, se estimaron filogenias bajo enfoques de concatenación y coalescentes. Para el primer enfoque, se realizó un análisis filogenómico bajo inferencia de máxima verosimilitud en IQTREE v2.3.4 (Nguyen et al., 2015) empleando el modelo evolutivo general de sustitución de nucleótidos reversibles (GTR + I + G), con 1 000 réplicas de bootstrap. Para ello, se realizaron análisis preliminares filogenéticos utilizando las diferentes matrices resultantes con valores diferentes de min\_samples\_locus (Tabla 2). Los resultados mostraron que los diferentes conjuntos de datos eran congruentes en sus topologías (a excepción del conjunto a 90%, veáse anexos 2 - 4), por lo que se optó por elegir aquella matriz de datos con la que se obtuvo una filogenia con nodos mejor soportados y al mismo tiempo la menor cantidad de datos faltantes. Por lo tanto, la matríz utilizada para éste y posteriores análisis fue la del 70%. En este análisis se utilizó el archivo *phylip* que contiene los datos concatenados (386 196 pb) generados por lpyrad, que posee tanto los sitios variantes como invariantes, en la que se incluye un total de 101 individuos de las especies muestreadas de Rhamdia trans-Andina y cinco del grupo externo.

El segundo enfoque consistió en un análisis filogenético coalescente empleando SVDQuartets (Chifman y Kubatko, 2014) implementado en PAUP\* *v.4.0a166* (Swofford,

2003). Este programa usa un algoritmo en el que calcula algebraicamente una topología para un conjunto de cuatro taxones por medio de loci no vinculables, y estima una puntuación a cada una de las tres topologías para ese conjunto de individuos, la topología con el valor SVD más bajo es la topología seleccionada como la verdadera (Chou *et al.,* 2015). Inicialmente, se utilizó únicamente el conjunto de datos en formato *.vcf* que contiene únicamente las variantes (SNPs) de la matriz al 70% (Tabla 3); estos datos fueron filtrados utilizando los paquetes analíticos VCFtools (Danecek *et al.,* 2011), bcftools (Li, 2011) y PLINK (Purcell *et al.,* 2007). La filtración consistió en la selección únicamente SNPs bialélicos, se eliminaron inserciones y deleciones (indeles) y además se utilizó una frecuencia alélica mínima (MAF) de 0.1, el cual indica la frecuencia con la que se encuentra el alelo menos común dentro de una población. También, debido a que algunos individuos presentaban una gran cantidad de datos faltantes, se optó por eliminar a los individuos que contenían ≥70% de datos faltantes, esto principalmente debido a la susceptibilidad de los análisis que utilizan SNPs para trabajar con muchos datos faltantes (Wright *et al.,* 2019; Yi y Latch, 2021).

Dado que esta matriz se encontraba en formato vcf, se optó por utilizar el script de Python vcf2phylip (Ortíz, 2019) para convertir dicho formato a un archivo phylip y nexus. Durante el análisis, se realizó un muestreo exhaustivo de cuarteto con 100 réplicas de arranque bajo un modelo de árbol coalescente multiespecie. Este modelo permite tratar aquellos conflictos dados por la incongruencia entre arboles de especies y árboles de genes, pudiendo ser más sensible a fenomenos tales como retención de polimorfismos ancestrales, que los métodos de concatenación (Kubatko y Degnan, 2007).

#### 8.5 Análisis multivariados

Como análisis exploratorio, se realizó un análisis de agrupamiento, para identificar grupos genéticos entre las muestras del grupo interno. Para ello se utilizaron dos métodos, incluyendo un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis discriminante de componentes principales (DAPC). El PCA sirve como una herramienta que puede ayudar en la interpretación genética poblacional y notar diferencias entre muestras de forma

independiente a los patrones históricos subyacentes a la estructura y sin la necesidad de aplicar un modelo evolutivo (Reich *et al.*, 2008). Por otro lado, el DAPC permite utilizar los componentes principales del análisis anterior y utiliza un componente entre grupos y a su vez un componente dentro de cada grupo, haciendo una discriminación maximizada del componente entre grupos y reduciendo la variación dentro de cada uno de ellos (Jombart *et al.*, 2010). Para este análisis se utilizó la matriz de datos que contiene únicamente los sitios variables (6 158 SNPs) filtrados con 92 individuos, excluyendo el grupo externo, misma matriz que fue utilizada en el análisis de SVDQuartets.

Este análisis fue ejecutado utilizando el paquete *Adegenet* (Jombart, 2008) en R v4.3.3 (R Core Team, 2020). Primero se utilizó el agrupamiento K-means para identificar el número óptimo de grupos utilizando la función *find.clusters* de Adegenet para ello se probaron diferentes escenarios de agrupamiento (K = 2 – 15). Finalmente, se seleccionó el número de grupos apropiado con el criterio de información bayesiano (BIC) más bajo.

#### 8.6 Análisis del tiempo de divergencia

Posteriormente, con el fin de estimar los tiempos de divergencia entre especies y clados supraespecíficos, se usó un análisis bayesiano bajo el modelo coalescente multiespecie (MCM) en SNAPP (SNP and AFLP Package for Phylogenetic analysis) *v2.4.8* (Bryant *et al.,* 2012) implementado en BEAST 2.6.2 (Bouckaert *et al.,* 2019). Este método calcula la probabilidad posterior para múltiples árboles generados a través de cadenas de Markov Monte Carlo. Por otra parte, debido a la falta de registros fósiles para el género *Rhamdia* y la familia Heptapteridae, se optó por utilizar una calibración secundaria para calibrar el reloj molecular, fechando el nodo que representa el ancestro común más reciente de *Rhamdia* trans-Andina, derivada de un estudio realizado por Hernández *et al.* (2015) quienes utilizaron dos calibraciones fósiles para el grupo externo, obteniendo una edad aproximada específicamente para el clado trans-Andino de 6.9 Ma (95% HDP: 3.8 - 10.4).
Dado que los análisis en SNAPP requieren de un tiempo prolongado y de una gran capacidad computacional, se realizó un submuestreo del total de individuos para todo el subclado trans-Andino. Esta matriz consistió en un total de 17 individuos (incluyendo la raíz). Cada uno de estos individuos es asignado a su especie correspondiente, obteniendo finalmente un árbol con un total de 15 terminales. También, al ser un programa demasiado susceptible a datos faltantes únicamente se consideraron 606 SNPs lo suficientemente informativos para correr el análisis.

El análisis fue configurado y controlado utilizando un archivo XML que fue generado a través del script Ruby (Stange *et al.*, 2018), en el que se establece un modelo de reloj estricto. También se utilizó una distribución normal, en la que se establecieron los siguientes parámetros para la calibración: 1) Offset=0, 2) Mean =  $6.9 ext{ y}$  3) Standard deviation = 0.25. Debido al costo computacional excesivo y tiempo de análisis, únicamente se realizaron tres corridas independientes de un millón de generaciones con un muestreo cada 1 000 iteraciones. La convergencia de la cadena y su estacionariedad, así como la adecuación del muestreo se evaluó mediante Tracer *v1.7.2* (Rambaut *et al.*, 2018), asegurando que los tamaños efectivos de todos los parámetros se encontraran igual o por encima a 200. Todas las corridas para cada replica fueron combinadas usando LogCombiner (Drummond y Rambaut, 2007), utilizando el 10% de quemado. Y finalmente los resultados fueron resumidos en un árbol de credibilidad de clado mediante TreeAnotator *v.2.7.5* para ser visualizados finalmente en Figtree *v1.4.4*.

#### 8.7 Estimación de áreas ancestrales

Finalmente, para inferir la historia biogeográfica del grupo, se realizó una reconstrucción de áreas ancestrales. Para ello, se utilizó la filogenia datada obtenida, así como una matriz que contiene tanto a los individuos como las áreas biogeográficas a la cual pertenecen cada uno. Con el propósito de elegir áreas biogeográficas que pudieran reflejar aspectos importantes acerca de la distribución de las especies actuales del grupo de estudio, se optó por utilizar los bloques geológicos como unidades biogeográficas, los

cuales se ajustan con la distribución de *Rhamdia* trans-Andina, asimismo, muchos estudios biogeográficos han enfatizado la importancia de la historia geológica de América Media en la distribución de algunos grupos actuales. Estos bloques corresponden a los siguientes: Bloque Maya (sur de México y Guatemala; Donelly *et al.*, 1990); Bloque Chortis (Costa de Chiapas, sureste de Guatemala, todo el Salvador y Honduras, y una gran extensión de Nicaragua; Donelly *et al.*, 1990); Bloque Chorotega (sur de Nicaragua; Donelly *et al.*, 1990); Bloque Chorotega (sur de Nicaragua, 1987); Bloque Chocó (Panamá y Colombia; Dengo, 1987) (Figura 6).

Posterior a la clasificación de unidades biogeográficas, se realizó la estimación de rangos ancestrales utilizando el paquete BioGeoBears (Matzke, 2013) en R (R core team, 2020). Primero se realizó un análisis de comparación de modelos biogeográficos, cada uno de ellos asume diferentes procesos que pudieron contribuir en la evolución del rango de las especies a través de la filogenia, estos modelos son los siguientes: Dispersal-Extinction-Cladogenesis (DEC; Ree y Smith, 2008), Dispersal-Vicariance Analysis (DIVA; Ronquist, 1997) y Bayesian Area (BAYAREA; Yu *et al.*, 2013). Asimismo, BioGeoBears también implementa un parámetro libre, que corresponde a la especiación del evento fundador (j) y se puede ajustar a cada modelo anteriormente mencionado, creando los siguientes: DEC+J, DIVALIKE+J y BAYAREA+J (Matzke, 2013). Posterior a la evaluación de modelos biogeográficos, se seleccionó como el óptimo aquel que tuviera el valor más bajo, utilizando el criterio de información de Akaike con corrección para el tamaño de la muestra (AICc).



Figura 6. Bloques geológicos presentes en América Media y Sudamérica. La división de estos bloques se realizó de acuerdo con la definición de Dengo (1987) y Donelly et al., (1985). Estos bloques representan las unidades biogeográficas las cuales se ajusta la distribución de *Rhamdia* trans-Andina. Los simbolos representan la distribución cada una de los individuos de las especies correspondientes a *Rhamdia* trans-Andina.

### **IX. RESULTADOS**

#### 9.1 Procesamiento de datos genómicos

Se obtuvieron un total de 562 209 129 de lecturas por pares sin procesar para los 112 individuos totales incluidos en este estudio, con una profundidad promedio de 224X (Anexo 5). Las revisiones con FASTQC y multiQC no mostraron lecturas de mala calidad, sin embargo, se encontraron algunas muestras con poca cantidad de lecturas. La muestra con mayor número de lecturas presentó un total de 11 050 791 lecturas, mientras que la muestra con número más bajo presentó únicamente un total de 542 lecturas.

#### 9.2 Análisis filogenéticos

El conjunto de datos seleccionado y utilizado para el análisis filogenético concatenado (70% de min\_samples\_locus, Tabla 2), contiene un total de 97 individuos para el grupo interno y cuatro individuos para el grupo externo. Esta matríz final incluyó un total de 386 196 pares de bases. La topología resultante del análisis de máxima verosimilitud realizado en IQ-TREE presenta fuertes valores de soporte de bootstrap (>95%) para la gran mayoría de nodos de la filogenia a excepción de 11 nodos (Figura 7. La filogenia muestra dos clados principales (A y B, Figura 7), donde el clado A, se divide en dos subclados: uno donde se encuentra la especie *R. cinerascens*, y el otro subclado sitúa a todas las especies actualmente válidas; tanto troglobias (*R. reddelli, R. zongolicensis, R. macuspanensis, R. laluchensis*) como de superficie (*R. nicaraguensis* y *R. parryi*) dentro de *R. laticauda*, mostrando un fuerte soporte estadístico para ese nodo (nodo C, PP 100), mostrando a *R. laticauda* como una especie parafilética. Sin embargo, a pesar de esa parafilia, el nodo C muestra la formación de clados genéticos (tomando en cuenta las longitudes de rama) que son también geográficamente distintivos, los nombres de estos linajes fueron asignados de acuerdo con su distribución.

El primer linaje reconocido corresponde a *Rhamdia laticauda* "Papaloapan", este linaje considera sinónimos a las especies *R. zongolicensis*, *R. reddelli* y aquellas poblaciones de *R. laticauda* que se distribuyen sobre la misma cuenca.

El linaje *R. laticauda* "Grijalva-Usumacinta" incluye a individuos de México de la cuenca del Grijalva-Usimacinta, mientras que el tercer linaje *R. laticauda* "Centro-Norte de Guatemala" está constituido por individuos que pertenecen a cuencas de Guatemala y Belize de la vertiente del Atlántico (Chixoy, Moho y La Pasión). Por otro lado, tres linajes son asignados a Honduras, de los cuales *R. laticauda* "Motagua" y *R. laticauda* "Tierras altas de Honduras" son linajes hermanos que mantienen una distribución disyuntiva en el oeste y este de Honduras, mientras que *R. laticauda* Atlántico de Honduras, se distribuye al norte de Honduras sobre cuencas de la vertiente del Atlántica. La especie *R. nicaraguensis* se posiciona como hermana de *R. laticauda* de "Costa Rica". Finalmente, *R. laticauda* "Changuinola" aparece como el grupo basal de todos los linajes anteriormente mencionados.

El clado B está compuesto exclusivamente por individuos de la especie *R*. *guatemalensis*, esta especie se divide en tres linajes que siguen un patrón de acomodo geográfico latitudinal: el subclado D, esta constituido por los linajes *R. guatemalensis* del Noroeste de Centro America" y "*R. guatemalensis* América Central baja" ambos linajes corresponden a Centro América, mientras que, el linaje "*R. guatemalensis* Pacífico-Magdalena" (nodo E) está conformado exclusivamente por poblaciones de *R. guatemalensis* de Sudamérica.

.



Figura 7. Árbol filogenético basado en un análisis de máxima verosimilitud en IQ-TREE. Los círculos rojos en los nodos indican valores de bootstrap % <95 (porcentaje sobre 1 000 réplicas). La escala en la parte inferior indica el número de sustituciones por sitio. Este árbol está basado en una matríz de datos concatenados que tiene una longitud de 386 196 pb. En el árbol se observa el acomodo de al menos ocho linajes correspondientes a *R. laticauda*. Por otro lado, tres linajes pueden distinguirse para *R. guatemalensis*.

Como resultado del análisis de SVDQuartets con 6 178 SNPs bialélicos y 96 individuos (Figura 8), se obtuvo una topología congruente con el análisis de datos concatenados en IQ-TREE, con ciertas excepciones y valores de soporte más bajos. Este árbol también recuperó dos grupos monofiléticos bien soportados (A y B, Figura 8), el clado más diverso está conformado por todas las especies de *Rhamdia* de cueva y la especie *R. laticauda* dividida en 7 linajes (*R. macuspanensis*, *R. laluchensis, R. parryi, R. nicaraguensis*), al igual que el análisis de datos concatenados. Así también esta filogenia identifica linajes que son genética y geográficamente diferenciados, los cuales en conjunto forman el subclado (nodo C, Figura 8) que es grupo hermano de *R. cinerascens*.

El único linaje que no es apoyado como un grupo monofilético fue *R. laticauda* del Centro-Norte de Guatemala, que deja fuera a un individuo de la cuenca de Chixoy en Guatemala, ya que esta población aparece hermana del resto de linajes de México, convirtiéndola en un grupo polifilético. Todas las especies de cueva están estrechamente relacionadas, formando un solo clado, pero a mayor profundidad, las poblaciones de *Rhamdia* del Papaloapan y las especies, actualmente válidas, como *R. reddelli* y *R. zongolicensis* forman un solo clado, que se ha denominado *R. laticauda* del Papaloapan.

Por otro lado, el resto de los nuevos linajes de *R. laticauda* correspondientes a América Media, fueron monofiléticos y mantuvieron las mismas relaciones filogenéticas que el árbol obtenido en IQTREE, manteniendo el mismo sentido geográfico. Dentro de la especie *R. guatemalensis* se forman dos subclados principales, uno correspondiente a las poblaciones de América Media (nodo D, Figura 8), la cual se divide en dos linajes, y otro clado que corresponde únicamente a poblaciones de cuencas de América del Sur (nodo E, Figura 8). Algunas incongruencias fueron encontradas para los individuos de *R. guatemalensis* de Yucatán, ya que, no se anidan en un solo clado, sino que los individuos estan separados y relacionados con diferentes poblaciones del Grijalva-Usumacinta y cuencas de Belize y Guatemala.



Figura 8. Árbol de delimitación de especies realizado en SVDquartets el cual implementa el modelo de coalescencia multiespecie. Para este análisis se usó 6 158 SNPs y 96 individuos.

### 9.3 Análisis multivariados

Se utilizó un gráfico PCA para resumir y visualizar en dos dimensiones la variación genética en los individuos de *Rhamdia*.

Siguiendo la taxonomía actual, los dos primeros componentes identificaron dos grupos principales bien diferenciados y explicaron el 26.37% (PC1) y 7.7% (PC2) de la varianza total, respectivamente (Figura 9). El PCA muestra claramente dos grupos principales que corresponden a *R. guatemalensis* y una conglomeración del resto de especies, en las que se incluye, especies actualmente validas como, *R. zongolicensis, R. parryi. R. laluchensis* y *R. macuspanensis,* es decir, no existe una clara diferenciación genética entre las cuatro especies troglobias mexicanas y las poblaciones de *R. laticauda* de México y Centroamérica, aunque se muestran algunas especies que forman subgrupos dentro de *laticauda,* siendo más evidente *en R. nicaraguensis* y *R. parryi.* Tanto las poblaciones *de R. nicaraguensis* como las poblaciones de *R. laticauda* de Costa Rica se se agrupan dos grupos diferenciados (Figura 9).



Figura 9. Resultado del análisis de componentes principales (PCA) con elipses de 95% de intervalo de confianza realizado con 6 158 SNPs. Con base en la taxonomía actual, se observan una clara diferenciación de dos grupos.

En cuanto a los resultados del análisis discriminante de componentes principales (DAPC), se obtuvieron 35 componentes principales (PCs) y 12 funciones discriminantes

retenidas, además de 14 grupos genéticos de acuerdo con el análisis de *find.clusters* bajo el criterio de información bayesiana (Anexo 5 y 6). Cuatro de estos grupos se asignan para la especie *R. guatemalensis*, y 10 de ellos corresponden de nuevos grupos genéticos y al resto de especies actualmente válidas (Figura 10).

Los individuos de la especie *R. parryi* (grupo 14), *R. nicaraguensis* (grupo 10) y *R. laluchensis* (grupo 1) se agrupan a su especie correspondiente. Mientras que, el resto de las muestras forman agrupaciones de especies combinadas y otros grupos que son geográficamente reconocibles. Por ejemplo, el análisis indica que no hay una distinción entre las especies *R. zongolicencis*, *R. reddelli*, *R. macuspanensis* y poblaciones de *R. laticauda* del Papaloapan y del Grijalva-Usumacinta, ya que salen anidadas en un solo grupo (grupo 6). Y esta misma combinación de especies se observa con *R. cinerascens* y *R. laticauda* del Changuinola (Panamá), las cuales pertenecen a un solo grupo (grupo 13).

Por otro lado, la formación de nuevos grupos geográficos para la especie *R. laticauda* está dada por los siguientes: Grupo 3: corresponde a poblaciones de *R. laticauda* que se distribuyen sobre las cuencas del centro y norte de Guatemala, así como también parte de Belize; Grupo 4: se incluyen todas las poblaciones de *R. laticauda* del este de Honduras, que se distribuyen sobre las cuencas del Patuca y Goascoran. El grupo 10 está conformado por *R. laticauda* del Motagua y el grupo 12 esta formado por *R. laticauda* del norte de Honduras de la vertiente del Atlantico, de las cuencas de Lancentilla y Cangrejal. Finalmente, el grupo 11 incluye está constituido por poblaciones de *R. laticauda* de Costa Rica.

La especie *R. guatemalensis* está constituida por cuatro diferentes grupos (grupo 2, 5, 8 y 9). Entre ellos, el grupo 2 y 5 corresponden a *R. guatemalensis* de América Central, donde el grupo 2 está conformado pues muestras de Honduras, Nicaragua y Costa Rica, mientras que el grupo 5 incluye aquellas muestras de México y Guatemala. Todas las *R. guatemalensis* Sudaméricanas de las cuencas de Colombia, fueron agrupadas en el grupo 9. Hubo una excepción, debido a que al menos dos individuos de Sudamérica de las Cuencas del Magdalena-Cauca y la cuenca de Goascorán de Honduras están agrupadas en el grupo 8.



Figura 10. Visualización del resultado de análisis discriminante de componentes principales (DAPC), realizado con 6 158 SNPs para el grupo *Rhamdia laticauda* A) Dispersión de las especies de *Rhamdia* trans-Andina, bajo la clasificación actual, los círculos circulos representan a los individuos y las lineas la pertenencia a la especie actual a la que pertenecen. B) Dispersión de los 14 grupos totales de individuos calculados con *find.clusters* en los que se incluyen los individuos de *Rhamdia* trans-Andina.

#### 9.4 Tiempos de divergencia

En cuanto al análisis de estimación de tiempos de divergencia realizado en SNAPP, las relaciones evolutivas entre las especies fueron congruentes con las dos filogenias obtenidas anteriormente, tanto en el análisis inferido a partir de datos concatenados en IQTREE como en la inferencia realizada con SNPs en SVDQuartets. Sin embargo, hubo una excepción en aquellas relaciones entre las especies *R. parryi* y las especies troglobias mexicanas, incluyendo también a *R. laticauda* del Papaloapan, las cuales están más estrechamente relacionadas entre sí, formando un solo clado que aparece como hermano del linaje *R. laticauda* Grijalva-Usumacinta.

De acuerdo con las estimaciones obtenidas, el ancestro común más reciente (ACMR) de *Rhamdia* trans-Andina divergió hace aproximadamente 6.8 Ma (95% HPD 7.83 – 6.4) durante el Mioceno tardío, que corresponde a la divergencia de dos grandes clados (A y B, Figura 11). La especie *R. cinerascens* es la especie más ancestral y divergió del complejo de *R. laticauda* hace 4.33 Ma (95% HPD: 5.1 - 3.6). El clado más joven corresponde a las especies mexicanas: *R. laticauda* "Papaloapan", *R. macuspanensis, R. laluchensis, R. parryi* y *R. laticauda* "Grijalva-Usumacinta", su ancestro común más reciente se ubica en el Pleistoceno hace 0.26 Ma (95% HPD: 0.35 – 0.17). Dentro del clado B se encuentra la especie *R. guatemalensis*, la cual divergió hace aproximadamente 1.9 Ma (95% HPD: 1.4 - 2.3), este grupo está dividido en tres linajes, de los cuales, dos de ellos corresponden a un clado del Sureste de México y Centroamérica (95% HPD: 0.11 - 0.35), y otro incluye poblaciones exclusivamente Sudamericanas (95% HPD: 1.49 - 2.39).



Figura 11. Inferencia de árbol filogenético basado en el modelo de coalescencia multiespecie realizado en SNAPP utilizando un total de 606 SNPs bialélicos. (A) Todos los árboles muestreados, las áreas que muestran una mayor densidad significan un mayor acuerdo con la topología más probable. (B) Árbol consenso fechado en el tiempo usando una calibración secundaria basada en Hernández *et al.* (2015), el nodo calibrado se muestra con \*.

#### 9.5 Estimación de áreas ancestrales

Después de realizar el análisis de comparación de modelos biogeográficos, el modelo DEC + j fue el que resultó como mejor modelo, con el valor de AICc más bajo (Tabla 3). Estos resultados sugieren que el ancestro común mas reciente de *Rhamdia* trans-Andina (nodo 1, Figura 12), tuvo una distribución ancestral en Sudamérica, y que, posteriormente se extendió hacia el norte abarcando los tres bloques geológicos correspondientes a América Central (Bloque Chorotega, Chortis y Maya). Se estimó que la divergencia correspondiente a las especies actuales *R. cinerascens* y las especies de *Rhamdia* de América Central (nodo 2), ocurrió alrededor de 4.39 Ma en un ancestro común generalizado distribuido sobre América Central se detectó un evento simpátrico, en el cual ambos ancestros desendientes heredaron la misma área ancestral (nodo 3).

Model	LnL	numparams	d	e	j		AICc	AICc_wt
DEC+J	-24.38	3	0.139	1.00e-12		0.097	56.58	3.6-e01
DIVALIKE+J	-24.468	3	0.162	1.00e-12		0.10	56.81	3.04-e01
BAYAREALIKE+J	-25.460	3	0.110	1.00e-07		0.12	58.76	1.35-e01
DEC	-25.811	2	0.976	1.00e-07		0.09	59.60	9.55-e02
DIVALIKE	-30.891	2	0.262	2.00e-09	0		66.64	2.65-e03
BAYAREALIKE	-38.294	2	0.207	1.69e-01		0	81.44	1.61-e06

Tabla 3. Comparación de modelos biogeográficos en BioGeoBears (Matzke, 2013), basado en los criterios de información de Akaike (AIC), y Akaike corregido (AICc).

Estos resultados también muestran que el rango ancestral de las especies y linajes de México y de Guatemala (nodo 7) ocurrió durante el Pleistoceno, hace aproximadamente 400 000 años sobre el Bloque Maya y Chortis (nodo 7). Posteriormente, los nodos siguientes diversificaron principalmente hacia el norte, abarcando el Bloque Maya. La especie *R. guatemalensis* cuenta con la distribución más amplia, y de acuerdo con los resultados se sugiere que divergió durante el Mioceno sobre la región Norte de Sudamérica (Bloque Chocó) y posteriormente se dispersó hacia el norte del contienente, estableciendo nuevas poblaciones alrededor de los bloques Chorotega, Chortis y Maya, dando lugar a tres linajes, siendo *R. guatemalensis* "Sudamérica" el linaje más ancestral y que permaneció en su área de origen.



Figura 12. Estimación de rangos ancestrales inferidos bajo el modelo Dispersión-Extinción-Cladogénesis (DEC + j) en BioGeoBears. Las áreas marcadas en los nodos indican en area con la mayor probabilidad del ancestro. El mapa que se muestra a la izquierda las unidades biogeográficas correspondientes a los bloques geológicos de América Media: A) Bloque Maya; B) Bloque Chortis; C) Bloque Chorotega; D) Bloque Chocó.

## IX. DISCUSIÓN

#### 10.1 Relaciones filogenéticas

En los últimos años los avances metodológicos y las nuevas aplicaciones en sistemática molecular, análisis filogenéticos y delimitación de especies, en conjunto con el uso de datos genómicos y también de la taxonomía integradora, se han convertido en herramientas ventajosas y útiles para resolver problemas taxonómicos para diversos grupos biológicos (Papakostas et al., 2016; Lozano-Fernandez, 2022). Al delimitar especies o linajes, la búsqueda de una congruencia entre los resultados obtenidos en cada uno de los análisis filogenéticos y estadísticos se convierte en algo necesario, aunque puede haber ciertas excepciones. Este estudio proporciona nueva evidencia por medio de análisis derivados de datos genómicos obtenidos a través de la metodología 3RAD-seq, que es posible que la diversidad de Rhamdia trans-Andina haya sido subestimada, y que por lo menos para el grupo Rhamdia laticauda existen siete linajes (clado D, Figura 7 y 8), y para *R. guatemalensis* tres linajes (clado E, Figura 7 y 8), que muestran una estructura filogeográfica, y que son tanto genética como geográficamente distintivos y que podrían corresponder a especies no descritas, y en otros casos, podrían representar especies anteriormente descritas y que bajo la taxonomía actual están en sinonimia.

El patrón principal observado en cada uno de los análisis filogenéticos y estadísticos confirma con base en datos genómicos que la especie actualmente válida *R. laticauda* es parafilética, con respecto a la posición de especies que actualmente son válidas como *R. zongolicensis*, *R. reddelli*, *R. macuspanensis*, *R. parryi*, y *R. nicaraguensis*. Este patrón ha sido anteriormente documentado por estudios precedentes basados en datos genéticos que han cuestionado la validez de *R. laticauda* y también de las especies que se encuentran anidadas dentro de este grupo (Arroyave y De La Cruz Fernández, 2021a; Arroyave y de la Cruz-Fernández, 2021b; Buenavad-Gonzalez *et al.,* 2023; Arroyave *et al,* 2024).

Desde hace varias décadas, se ha sugerido que tanto R. reddelli como R. zongolicensis no son más que poblaciones hipógeas de R. laticauda, y que ambas especies microendémicas y de hábitos troglobios podrían considerarse sinónimos (Miller, 2005), siendo estas dos últimas en realidad poblaciones troglobias de R. laticauda que recientemente han colonizado estos hábitats hipógeos a partir de individuos epígeos de R. laticauda. Cabe destacar que los caracteres diagnósticos de estas especies están principalmente ligados al troglomorfismo, y además no se han observado diferencias morfológicas y genéticas siginificativas entre dichas especies y las poblaciones de superficie correspondientes a individuos identificados como R. laticauda con características troglobias intermedias (Arroyave y De La Cruz Fernández, 2021). Inclusive, la revisión exahustiva realizada por Silfvergrip (1996) indicó que las especies mexicanas R. reddelli, R. zongolicensis, y también la especie de superficie R. parryi eran sinónimos de R. laticauda, posteriormente estas especies fueron resucitadas y validadas, además, se realizaron nuevas descripciones de especies troglobias para México que también han sido taxonómicamente controversiales (Weber y Wilkens, 1998; Wilkens, 2001; Weber et al., 2003). La localidad tipo de R. laticauda corresponde al río Jamapa en Veracruz (Silfvergrip, 1996), por lo tanto, es posible que aquellas poblaciones que se distribuyen sobre la cuenca del Papaloapan corresponden a R. laticauda, ya que, bajo el principio de autoridad taxonómica, al ser la especie más antiguamente descrita, tanto R. reddelli como R. zongolicensis podrían considerarse sinónimos junior de R. laticauda.

En las filogenias resultantes de los análisis de IQTREE y SVDquartets, las especies troglobias *R. macuspanensis* y *R. laluchensis* (las más recientemente descritas para el clado de AM) se recuperan en grupos monofiléticos altamente soportados y con un nivel moderado de divergencia. Sin embargo, los resultados del análisis PCA y DAPC (Figura 9 y 10) no recuperan grupos iguales a los linajes observados en los árboles filogenéticos, esto es evidente para *R. reddelli, R. zongolicensis* y *R. laticauda* del Papaloapan y Grijalva-Usumacinta la cuales no se muestran como especies distintivas. Esta incongruencia puede ser dada debido a la suceptibilidad de estos análisis para trabajar con muestras desbalanceadas para cada especie (Acosta, 2023), es decir, en este caso, algunas especies poseían poca cantidad de muestras en comparación con otras.

A pesar de la dificultad para realizar delimitación de especies, es fundamental que la identificación de especies candidatas vaya acompañada de un análisis de discontinuidad genética o morfológica sobre el área geográfica, bajo este criterio, se puede considerar que los linajes con evolución independiente deberían mostrar mínimamente que las especies putativas ocupan áreas geográficamente discretas (Burbrink y Ruane, 2021).

Por lo anteriormente mencionado, es posible que los linajes geográficos identificados dentro del clado *R. laticauda sensu lato* pueden corresponder a especies previamente descritas, aunque posteriormente sinonimizadas por Silfvergrip (1996). Para estos casos, el resultado (después de una revisión sistemática) sería que algunas especies antiguamente sinonimizadas fueran resucitadas. Por ejemplo, hasta ahora, el conocimiento acerca de la distribución de *Rhamdia laticauda* Costa Rica, es que se encuentra sobre diferentes cuencas del centro y norte de Costa Rica, y al menos cuatro especies habían sido descritas para esa región desde inicios de los años 1900: *Rhamdia regani* (Meek 1907), *R. underwoodi* (Regan 1907), *R. rogersi* (Regan 1987), *R. alfori* (Fowler, 1932).

Lo mismo sucede con *Rhamdia laticauda* Grijalva-Usumacinta, debido a que su distribución abarca las cuencas que están al centro-norte de Guatemala y Belice, probablemente siendo esta la especie *R. petenensis* (Gunther 1864). Para *R. laticauda* del Motagua de Honduras y Guatemala es posible que pueda corresponder a *R. motaguensis* (Gunther 1864). Cabe destacar que estas supuestos son realizados con base en coincidencias en las distribuciones de los límites de las especies que han sido denominadas aquí, pero se necesita una mayor revisión acerca de los limites geográficos de las distribuciones de cada una de estas especies y una revisión más exahustiva para proponer estos linajes dados como especies.

Como especie hermana del complejo *Rhamdia laticauda,* se encuentra la especie Sudaméricana *R. cinerascens;* inicialmente, la posición filogenética de esta especie era incierta (Perdices, 2002), pero estudios subsecuentes apoyaron la hermandad entre *R. cinerascens, R. saijaensis* y *R. laticauda*, las cuales formaron un grupo monofilético (Hernández *et al.,* 2015; Arroyave *et al.,* 2024). Por otro lado, contrario a ello, una filogenia

46

realizada con COI obtuvo que *R. cinerascens* era más cercana a *R. guatemalensis* (Buenavad *et al.,* 2023). La incongruencia provocada por el uso de diferentes marcadores genéticos reafirma la hipótesis acerca de la evolución independiente de cada gen, es decir, diferentes regiones en el genoma pueden contar historias evolutivas distintas que no necesariamente coinciden con el árbol de especies real, esto puede ser resultado de diferentes factores, tales como presiones selectivas diferentes, la tasa de evolución y homoplasia (Hime *et al.,* 2020). Es por lo que el uso de grandes cantidades de loci puede resultar beneficioso debido a su baja suceptibilidad para tener errores estocásticos o de muestreo, y también a su debida predisposición por obtener mayor resolución en nodos conflictivos que generan mayor robustez para estudiar procesos evolutivos (Lozano-Fernández *et al.,* 2022; Shauna *et al.,* 2022).

Aquí, tanto los resultados del análisis concatenado como el análisis realizado únicamente con SNPs en SVDQuartets sugieren las mismas relaciones de hermandad para casi todos los linajes, con excepción *Rhamdia laticauda* del Centro y Norte de Guatemala. Se ha sugerido que los estudios comparativos que utilizan SNPs y secuencias genéticas concatenadas puede producir árboles topológicamente concordantes y no es raro obtener resultados iguales o similares (Harvey *et al.,* 2016; Manthey *et al.,* 2016; Leaché y Oaks, 2017).

En cambio, la discordancia entre resultados de ambos métodos también puede suceder, y puede ser atribuida con frecuencia a clados que poseen ramas cortas o altos niveles de sorteo incompleto de linajes (McLean *et al.,* 2022). Por otro lado, bajo estos resultados, la especie *R. guatemalensis*, muestra leves cambios topológicos en ambos árboles, donde existe cierta discordancia entre las poblaciones correspondientes al Sur de México y Centro América, pero estos cambios podrían atribuirse al corto tamaño de longitud de ramas que dichas poblaciones poseen.

## 10.2 Estimación de tiempos de divergencia y biogeografía de *Rhamdia* trans-Andina

En cuanto al análisis de coestimación de filogenia y tiempos de divergencia realizado en SNAPP, se obtuvo una edad para *Rhamdia* trans-Andina de 6.8 Ma, la cual se ajusta y se aproxima con la edad obtenida por Hernández *et al.*, (2015), y también por Perdices *et al.*, (2002). El ancestro común más reciente para este grupo ocurrió en la región Sudaméricana durante el Mioceno tardío. Esto sugiere que la distribución ancestral fue en Sudamérica, y que, posteriormente, hubo escenarios donde el ancestro del complejo de especies de *R. laticauda* y también *R. guatemalensis* de Centro América se dispersaron hacia el norte, después de la conclusión del levantamiento de Itsmo de Panamá dando lugar a las especies que actualmente se distribuyen sobre Centro América.

La compleja historia geológica que posee América Media ha jugado un papel importante en la diversificación de diferentes grupos taxonómicos que se distribuyen ahí, debido a que se encuentra sobre la interacción de seis placas tectónicas: Placa de Norteamérica, Placa del Pacífico, Placa Cocos, Placa Nazca, Placa del Caribe y Placa de Suramérica (Coney, 1982). De las cuales, específicamente tres de ellas han generado fuertes cambios sobre el área contienental: Placa Norte América, Placa del Caribe y Placa de Suramérica. Esta región se subdivide en cuatro elementos tectónicos principales: Bloques Maya, Chortis, Chorotega y Chocó, los cuales poseen características tectónicas y climáticas particulares (Marshall, 2007).

Muchos estudios geológicos y biogeográficos han propuesto diferentes edades en las que el levantamiento del Itsmo de Panamá concluyó, estas hipótesis en su mayoría se encuentran en un intervalo entre 2.8 y 3.5 Ma (Marco *et al.*, 2002; Coates y Stallard, 2012; Bacon *et al.*, 2015; O'Dea *et al.*, 2016), y que este evento ha fungido como un puente terrestre que ha permitdo el intercambio biótico entre América del Sur y América del Norte. Las fechas obtenidas para aquellas especies y linajes correspondientes a Centro América (nodo 3 y 9, Figura 12), confirma que la colonización de este grupo concluyó después del cierre del Itsmo de Panamá. Esta hipótesis biogeográfica ya se

había planteado para *Rhamdia* trans-Andina en estudios anteriores (Silfvergrip, 1996; Perdices *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2015). Aunque contrariamente a lo que Perdices *et al.* (2002) y Hernandez *et al.* (2015) obtuvieron, en estos resultados *Rhamdia guatemalensis* divergió tiempo antes de que *R. laticauda* lo hiciera, por lo tanto, el ancestro del complejo *laticauda* colonizó primero que *guatemalensis* la región Centroamericana que incluye cada uno de los bloques geológicos.

El Pleistoceno fue la época en la cual ocurrió la mayor diversificación para *Rhamdia* trans-Andina, dando lugar a todos los linajes actuales que se distribuyen sobre los bloques Chorotega, Chortis y Maya. El ancestro común de este clado (nodo 5) divergió hace aproximadamente 2.8 Ma en la región del bloque Chorotega, justo sobre esta región se encuentra la cordillera de Talamanca que se extiende desde el centro y sur de Costa Rica hasta el Norte de Panamá. El levantamiento de esta cordillera ha sido uno de los eventos más relevantes que dió lugar a la diversificación de diferentes grupos taxonómicos (Solís *et al.,* 2024). Se ha hipotetizado que el levantamiento de la Cordillera de Talamanca, tuvo lugar a finales del Plioceno y principios del Pleistoceno (Solís *et al.,* 2024; Alfaro *et al.,* 2021).

Estas fechas se ajustan al tiempo de diversificación del nodo 5, lo mismo para la diversificación del nodo 3, donde se incluye a todos los linajes de *R. laticauda* y las especies troglobias y de superficie (*R. parryi* y *R. nicaraguensis*) (Figura 12), aunque es difícil asegurar que el efecto de esta Cordillera haya provocado un evento de vicarianza entre los clados correspondientes a *R. laticauda* "Costa Rica" y *R. nicaraguensis*, debido a que estas habitan en simpatría y se distribuyen sobre toda la región, tanto de tierras altas como bajas. El escenario mas pausible quizá sea que *Rhamdia* logró ocupar básicamente toda el área de esta región debido a una reciente colonización después del deshielo provocados por glaciaciones del Pleistoceno (Hastenrath, 1973); ya que este evento generó la formación de depósitos aluviales y lagunas sobre las tierras altas y la formación de deltas sobre tierras bajas (p. ej. en El Valle del General, Costa Rica), y una vez establecido, el ancestro de los clados de Costa Rica pudieron haber divergido mediante especiación ecológica.

La depresión de Nicaragua es un valle que se extiende desde El Salvador hasta Costa Rica y estuvo caracterizada por transgersiones e inundaciones marinas constantes durante el Plioceno y Pleistoceno (Bagley y Johnson, 2014). Estas inundaciones marítimas constantes provocaron una barrera en la vertiente atlántica para peces dulceacuícolas (Bussing, 1976). Otros estudios también han sugerido que dicha depresión ha influido sobre la filogeografia de otros grupos taxonómicos, actuando como una barrera que limitó su dispersión (en ranas, Crawford y Smith, 2005; en roedores, Gutiérrez-García y Vázquez-Dominguez, 2012). Es por ello que, durante esta época, la depresión de Nicaragua probablemente impidió la dispersión del ancestro de *R. niacaraguensis* hacia la región del Atlántico, dando lugar a que dicha especie prevaleciera principalmente sobre la vertiente del Pacífico durante el Plioceno temprano y Pleistoceno tardío hasta la época actual en Nicaragua.

Además, el registro fósil de mamíferos terrestres ha confirmado que durante el Pleistoceno temprano una pequeña diversidad de mamíferos terrestres de hace 300 000 años yacía sobre la región de la depresión de Nicaragua y tierras altas (Lucas *et al.,* 2008). Esto sugiere que, durante esa época, la función de barrera, debido a las inundaciones marinas de la depresión de Nicaragua probablemente había concluido, permitiendo que muchos seres vivos pudieran atravesarla, incluyendo al ancestro de las *Rhamdias* de Honduras (nodo 7), Guatemala y México (nodo 8), ya que el tiempo en que los ancestros de estos clados aparecieron hace 0.4 y 0.3 Ma.

La falla del Motagua-Polochic constituye una zona de contacto entre los bloques Maya y Chortis (Marshall, 2007). Durante el proceso de unión de ambos bloques, el movimiento del bloque Chortis en dirección al este respecto al bloque Maya contribuyó en gran parte con la formación de lo que hoy en día conocemos como las grandes cadenas montañosas del Sureste de México y América Media (Rogers *et al.,* 2002). Diferentes estudios han propuesto la hipótesis acerca de la función como barrera fisiográfica que ha desempeñado la falla del Motagua desde su formación durante el Plioceno-Pleistoceno (Sinbránquidos: Perdices *et al.,* 2005; Cíclidos: Cocheiro *et al.,* 2007, McMahan *et al.,* 2017). Los resultados obtenidos indican una divergencia clara entre el clado que incluye a los linajes de *R. laticauda* de México y *R. laticauda* "Grijalva-Usumacinta", ubicados al norte y oeste de la falla Chixoy y Moho, y las poblaciones de especies de Honduras al sureste de la falla (nodo 8). Esta divergencia geográfica y genética sugiere que la falla del Motagua ha actuado efectivamente como una barrera, limitando la dispersión de especies y contribuyendo a la diferenciación de estos linajes.

Por otro lado, la divergencia observada entre los linajes de Honduras (nodo 8) pudo haber sido causada por diversos factores que desencadenó la actividad geológica sobre la región. Es posible que el ancestro común de este clado apareció sobre las tierras bajas de Honduras, sin embargo, la actividad tectónica y el levantamiento de las tierras altas (Álvarez-Gómez *et al.*, 2008); provocaron el aislamiento de aquellos linajes que actualmente se distribuyen ahí. Perdices (2002) menciona que la región del Atlántico del Motagua era tan estrecha y permanecía tan aislada de ríos adyacentes, que probablemente por esa razón, no hubo oportunidad para que los peces pudieran dispersarse a otras áreas, de manera que estos individuos pudieron haber quedado aislados (*R. laticauda* "Atlántico de Honduras"). La temprana divergencia de los linajes del clado *R. laticauda* "Motagua y *R. laticauda* "tierras Altas de Honduras" podría indicar que su origen se encuentra sobre las tierras altas, y que el proceso de especiación tuvo que ser al momento de su aislamiento en las montañas altas de Honduras. En contraste, *R. laticauda* "Atlántico de Honduras" se mantuvo sobre las cuencas bajas de la vertiente del Atlántico.

Un posible escenario para los linajes que se distibuyen en México, indica que, debido a las fluctuaciones climáticas provocadas por las glaciaciones del Pleistoceno, los linajes de tierras bajas habrían comenzado a colonizar las tierras altas al finalizar estos eventos, a mediados de esa época. Estas glaciaciones, impactaron de forma significativa la distribución de muchas especies (Hewitt, 2000). No obstante, contrariamente a ello, es posible que *R. parryi* haya estado exclusivamente adaptada a tierras bajas de la vertiente del Pacífico, con su ancestro permaneciendo en esa área desde su diversificación hasta la actualidad. Esta adaptación pudo haber limitado su expansión a otras regiones de mayor altitud, tomando en cuenta que su área de distribución es estrecha debido a la

interposición de la Sierra Madre de Chiapas. Varias investigaciones han señalado que las glaciaciones del Pleistoceno impactaron significativamente los patrones de distribución de especies (Hewitt, 2000).

Finalmente, las especies troglobias mexicanas aparecen como las más recientemente divergentes, esto sugiere que la colonización a estos ambientes cavernosos ha sido posterior a la colonización de ambientes superficiales. Esta hipótesis ya se había planteado desde hace varias décadas por diferentes estudios (Silfvergrip, 1996; Wilkens, 2001; Miller, 2005; Arroyave y de la Cruz, 2021ab). En Yucatán la formación de un extenso sistema de drenaje interconectado subterraneo dentro de la llanura kárstica ha dado lugar a la formación de elaboradas redes de cuevas y cenotes, su formación radica en la disolución kárstica durante fluctuaciones de bajos niveles del mar durante el Pleistoceno tardío (Marshall, 2007). La formación de este sistema brindó una oportunidad de colonización para poblaciones de *R. guatemalensis* "Noroeste de Centro América", aunque se ha sugerido que a pesar de que estos sistemas se encuentran interconectados, esta especie muestra estructura filogeográfica lo que demuestra que, dentro de estos sistemas, la dispersión se ve limitada por ciertas barreras físicas que promueven esa estructuración (Arroyave *et al.,* 2021).

### X. CONCLUSIONES

Los resultados revelan que *Rhamdia* trans-Andina posee una historia evolutiva compleja, en la que posiblemente tanto los eventos geológicos y climáticos históricos, probablemente desempeñaron un papel importante en la diversificación de varios linajes genéticos y geográficos distintivos. Estos linajes podrían corresponder a especies no descritas o especies que han sido previamente sinonimizadas. Además, los resultados reafirman que *R. laticauda* es un grupo parafilético, lo que cuestiona la validez de esta especie ya que no es monofilética. Por otro lado, la especie *R. guatemalensis* también muestra una estructura similar, en la que se forman tres grupos monofiléticos claramente diferenciados geográficamente, lo que también plantea interrogantes sobre su diversidad. Tanto los análisis filogenéticos de datación molecular, como el análisis de estimación de áreas ancestrales revelaron que las especies de este grupo muestran una historia evolutiva que ha sido influenciada por eventos geológicos y climáticos históricos. La primera aparición para el ancestro común más reciente en este grupo ocurrió en el Mioceno temprano (hace 6.8 Ma), en Sudamerica y la mayoría de los eventos geológicos involucrados en su diversificación tuvieron lugar después del levantamiento de Itsmo de Panamá, durante el Pleisticeno, entre 2.1 y 1.9 millones de años atrás. Dada la complejidad taxonómica de *Rhamdia*, se enfatiza la necesidad de realizar una revisión más exahustiva, en la que se añadan más líneas de evidencia, que contribuyan a realizar una delimitación de especies con mayor objetividad, en la que tal vez, puedan considerarse la historia de vida, la ecología y los caracteres morfológicos y anatómicos internos mediante metodologías más minuciosas, tal como la tomografía computarizada.

# XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

Abascal, F., Irisarri, I. y Zardoya, R. 2014. Filogenia y evolución molecular. En: Abascal, F., Aguirre, A., Andres-Leon, E., Bajic, D., Calabuig, B., Cortés- Cabrera, I., Dotu, I., Fernández, H., Santos, B., García-Jímenez, R., Irisarri, I., Jímenez-Lozano, N., J. Klett, R. Mendez, A. Morreale, A. Pascual-Garca, A. Perona, A. Sebastian, M. Stich, S. Tarazona, I. Yruela y R. Zardoya. (Eds) Bioinformática con Ñ. CreateSpace Pp. 231–259.

Acha, S., Linan, A., MacDougal, J., y Edwards, C. 2021. The evolutionary history of vines in a neotropical biodiversity hotspot: Phylogenomics and biogeography of a large passion flower clade (Passiflora section Decaloba). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (164)

Acosta, D. S. 2023. Filogeografía y genética poblacional de hormigas del género *Philidris.* Tesis de Licenciatura. Escuela de estudios superiores Unidad Morelia. Universidad Autónoma de México. Morelia, México

Ajawatanawong, P. 2016. Molecular Phylogenetics: Concepts for a Newcomer. In: Nookaew, I. (Eds.). Network Biology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. (160): 185-196.

Alfaro, A., Gazel, E., White, W. M., Jicha, B., Rasbury, T. 2021. Unravelling the genesis of young continental-arc shoshonites in the Talamanca Cordillera, Costa Rica. *Lithos*. (387)

Andrews, S. 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Babraham Bioinforma.

Anza, J. A. 2006. Revisão das espécies do gênero Rhamdia (Siluriformes: heptapteridae) de drenagens costeiras do sul e sudeste do Brasil, um exemplo de diversidade subestimada do gênero. Tesis de Maestria. Universidad Federal do Rio Grande Do Sul Porto Alegre. Brasil.

Arroyave, J., Martinez, C. M., Martínez-Oriol, F. H., Sosa, E., y Alter, S. E. 2021. Regional-scale aquifer hydrogeology as a driver of phylogeographic structure in the Neotropical catfish *Rhamdia guatemalensis* (Siluriformes: Heptapteridae) from cenotes of the Yucatán Peninsula, México. *Freshwater Biology*. 2(66): 332-348.

Arroyave, J., y De La Cruz Fernández, D. A. 2021a. Cave-dwelling populations of *Rhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Sierra de Zongolica, Veracruz, México: an evidence-based checklist with comments on their evolutionary history and taxonomy. *Journal of Fish Biology*. 1(99): 283-287

Arroyave, J., y de la Cruz-Fernández, D. A. 2021b. Genetic and morphological evidence cast doubt on the validity of Mexican troglobitic species of the Neotropical

catfish genus Rhamdia (Siluriformes: Heptapteridae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*. (92): 1-32

Aurelle, D., Pratlong, M., Oury, N., Haguenauer, A., Gélin, P., Magalon, H., Adjeroud, M., Romans, P., Vidal-Dupiol, J., y Claereboudt, M. 2021. Population genomics of Pocillopora corals: insights from RAD-sequencing. *BioRxiv*, 19-21.

Bacon, C. D., Silvestro, D., Jaramillo, C., Smith, B. T., Chakrabarty, P., y Antonelli, A. 2015. La evidencia biológica apoya una aparición temprana y compleja del Istmo de Panamá. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*. 112(19): 6110-6115.

Bagley, J. C., Y Johnson, J. B. 2014. Phylogeography and biogeography of the lower Central American Neotropics: diversification between two continents and between two seas. *Biological Reviews*. 89(4): 767-790.

Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., y Johnson, E. A. 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*. 3(10): 1-7.

Barros, D. 2018. Sistemática molecular e historia evolutiva de peces marinos de profundidad del océano atlántico y del mar mediterráneo. Universidad de Vigo.

Bayona-Vásquez, N. J., Glenn, T. C., Kieran, T. J., Pierson, T. W., Hoffberg, S. L., Scott, P. A., Bentley, K. E., Finger, J. W., Louha, S., Troendle, N., Diaz-Jaimes, P., Mauricio, R., y Faircloth, B. C. 2019. Adapterama III: Quadruple-indexed, double/triple-enzyme RADseq libraries (2RAD/3RAD). *PeerJ* (109): 1-25

Bloch, M.E. 1794. Naturgeschichte der ausländischen Fische. Mit sechs und dreissig ausgemalten Kupfern nach Originalen. Achter Theil. J. MorinoyComp. Berlin.

Bockmann, F. A. y G. M. Guazelli. 2003. Family Heptapteridae (Heptapterids). Pp 406-441. En Checklist of the freshwater fishes of South and Central America, Reis E. E., S. O. Kullander y C. J. Ferarris (Eds) Edipucrs. Porto Alegre. Brazil

Bockmann, F.A. y Slobodian, V. 2017. Family Heptapteridae – Three-barbeled catfishes. In: Van der Sleen P, Albert JS (Eds.). Field Guide to the fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas. Princeton University Press. Princeton and Oxford. Pp. 233-252

Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F. K., Müller, N. F., Ogilvie, H. A., Du Plessis, L., Popinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I. Drummond, A. J. 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*. 15(4): 1-28.

Brown, T. A. 2002. Molecular Phylogenetics. En: Brown, T. A. (Eds). Genomes. Oxford: Wiley-Liss. Inglaterra.

Bryant, D., Bouckaert, R., Felsenstein, J., Rosenberg, N. A., y Roychoudhury, A. 2012. Inferring species trees directly from biallelic genetic markers: Bypassing gene trees in a full coalescent analysis. *Molecular Biology and Evolution*. 29(8): 1917-1932.

Buckley, S. J., Domingos, F. M. C. B., Attard, C. R. M., Brauer, C. J., Sandoval-Castillo, J., Lodge, R., Unmack, P. J., y Beheregaray, L. B. 2018. Phylogenomic history of enigmatic pygmy perches: Implications for biogeography, taxonomy and conservation. *Royal Society Open Science*. 13(5): 1-17.

Buenavad-González, M. A., López-Vila, J. M., Torres-Vázquez. D., Hernández-Ávila, S. G., Zárate-Gálvez, K., Arroyave, J. 2023. New records of cave-dwelling populations of *Rhamdia* catfishes (Siluriformes, Heptapteridae) from Chiapas, Mexico. *Subterranean Biology*. 46: 61-76

Cacho, A., Smirnova, E., Huzurbazar, S., y Cui, X. 2016. A comparison of base-calling algorithms for illumina sequencing technology. *Briefings in Bioinformatics*. 17(5): 786-795.

Chifman, J. y Kubatko, L. 2014. Quartet inference from SNP data under the coalescent model. *Bioinformatics*. 23(30):3317-24.

Chou, J., Gupta, A., Yaduvanshi, S., Davidson, R., Nute, M., Mirarab, S., y Warnow, T. 2015. A comparative study of SVDquartets and other coalescent-based species tree estimation methods. *BMC Genomics*. 10(16): 1-11.

Coates, A. G. y Stallard, R. F. 2013. How old is the Isthmus of Panama? *Bulletin of Marine Sciencie*. 13(89): 801-813

Concheiro, G. A., Říčan, O., Ortí, Bermingham, G. E., Doadrio, I., Zardoya, R. 2007. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43(1): 91-110

Coney, P. J. 1987. Plate Tectonic Constraints on the Biogeography of Middle America and the Caribbean Region. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 3(69): 432-443

Contreras-Ramos, A. y I. Goyenechea. 2007. "La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad", En: Contreras-Ramos, A., C. Cuevas Cardona, I. Goyenechea y U. Iturbe (Eds.). La sistemática, base del conocimeinto de la biodiversidad. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca. Pp. 11-21

Crawford AJ, Smith EN. 2005. Cenozoic biogeography and evolution in directdeveloping frogs of Central America (Leptodactylidae: Eleutherodactylus) as inferred from a phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 3(35): 536-555

Crisci, J. V. y Katinas, L. 2008. La sistemática biológica y los peligros de la hegemonía molecular. Ciencia Hoy. (18): 44-45

Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo M. A., Handsaker R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., Durbin, R.2011. 1000 Genomes Project Analysis Group. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 27(15):2156-8.

Darwin, C. 1859. The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life.

De la Cruz, D. A. 2019. Revisión Morfológica y Morfométrica del género *Rhamdia* en México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de México. México

de Pinna, M. C. C. 1993. Higher-Level phylogeny of Siluriformes, with a new classification of the order (Telotei, Ostariophysi). Tese de doutorado. The City University of New York. New York. Estados Unidos

de Pinna, M. C. C. 1998. Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical overview and synthesis of hypotheses. En: Malabarba, R. E., Reis, R. P., Vari, Z. M., Lucena S. (Eds.). Phylogeny and classifications of Neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs. Pp. 279-330

De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*. 56(6): 879-886.

Dengo, G. 1985. Middle America: tectonic setting for the Pacific margin from southern Mexico to northwestern Colombia. En: Nairn, A. E. M. Stehli, F. G. y Uyeda, S. (Eds): The Ocean Basins and Margins, 7A. The Gulf of Mexico and the Caribbean. Plenum Press, New York. Pp.123-180

Díaz-Arce, N., y Rodríguez-Ezpeleta, N. 2019. Selecting RAD-Seq data analysis parameters for population genetics: The more the better? *Frontiers in Genetics* (10): 1-10.

Diogo, R. y Peng, Z. 2010. State of the Art of Siluriform Higher-level Phylogeny. En: T. Grande, F. J., Poyato-Ariza, F. J., Diogo, R. (Eds.). Gonorynchiformes and Ostariophysan Relationships: A comprensive review. Enfield, NH: Science publishers. Pp. 465-515

Donelly, T. W., Horne, G. S., Finch, R. C. y López-Ramos, E. 1990. Northern Central America; The Maya and Chortis blocks. En: G. Dengo y J.E. Case (Eds). The Geology of North America, Vol. H, The Caribbean Region. Geological Society of America. Pp. 37-76.

Drummond, A. J., Rambout, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 214(7): 1-8

Eaton, D. A. R., y Overcast, I. 2020. Ipyrad: Interactive assembly and analysis of RADseq datasets. *Bioinformatics*. 36(8): 2592-2594.

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Käller, M. 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 19(32): 3047-3048.

Faustino-Fuster, D., Meza-Vargas, V., Lovejevoy, N., Lujan, N. T. 2021. Multi-locus phylogeny with dense Guiana Shield sampling supports new suprageneric classification of the neotropical three-barbeled catfishes (Siluriformes: Heptapteridae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. (162)

Fitch, W. y Margoliash, E. 1967. Construction of Phylogenetic Trees: A method based on mutation distances as estimated from cytochrome c sequences is of general applicability. *Science*. 3760(155): 279–284

Fricke, R., Eschmeyer, W. N. y R. van der Laan (eds). 2025. Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species. http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp Consultado el 30 de abril de 2025

Frost, D. R., y Arnold, K. 1994. A consideration of epistemology in systematic biology. In *Cladistics* 3(10): 259-294

Gutiérrez-García, T. A. y Vázquez-Domínguez, E. Biogeographically dynamic genetic structure bridging two continents in the monotypic Central American rodent Ototylomys phyllotis. *Biological Journal of the Linnean Society*. 3(107): 593-610

Harvey MG, Smith BT, Glenn TC, Faircloth BC, Brumfield RT. 2016. Sequence capture versus restriction site associated DNA sequencing for shallow systematics. *Systematic Biology*. 5(65): 910-24

Hastenrath, S. 1973 On the Pleistocene glaciation of the Cordillera de Talamanca, Costa Rica. *Z Gletscherk Glazialgeol.* 9:105-121

Heather, J. M., y Chain, B. 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 1(107): 1-8

Hernández, C. L., Ortega-Lara, A., Sánchez-Garcés, G. C., y Alford, M. H. 2015. Genetic and Morphometric Evidence for the Recognition of Several Recently Synonymized Species of Trans-Andean *Rhamdia* (Pisces: Siluriformes: Heptapteridae). *Copeia*. 103(3): 563-579.

Herrera, S. y Shank, T. M. 2016. RAD sequencing enables unprecedented phylogenetic resolution and objective species delimitation in recalcitrant divergent taxa. *Molecular Phylogenet and Evolution*. 100:70-79

Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405: 907-913

Hühn, P., Dillenberger, M. S., Gerschwitz-Eidt, M., Hörandl, E., Los, J. A., Messerschmid, T. F. E., Paetzold, C., Rieger, B., y Kadereit, G. 2022. How challenging RADseq data turned out to favor coalescent-based species tree inference. A case study in Aichryson (Crassulaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (167): 1-23

Humboldt A. deyA. Valenciennes. 1821. Recherches sur les poissons fluviatiles de l'amerique équinoxiale. Fase. XI, pp. 145-176, Pis 31-44. In: Humboldt, A. deyA. Bonpland. 1813-1832. Voyage aux régions équinoxiales du nouveau continet, fait en 1799, 1800, 1801, 1802, 1803 et 1804. Deuxième partie. Recueil d'observations de zoologie et d'anatome comparées faites dans l'Ocean Atlantique, dans l'intérieur du nouveau continent et dans la Mer du Sud pendant les années 1799, 1800, 1801, 1802, 1803 et 1804. SchoellyDufour, Paris , 2: 352 pp., Pis 31-51.

Jombart, T., Devillard, S. y Balloux, F. Análisis discriminante de componentes principales: un nuevo método para el análisis de poblaciones genéticamente estructuradas. *BMC Genet*. 94(11): 1-15

Julian, C. C. 2017. Edad, crecimiento, madurez sexual y dieta de Rhamdia (Siluriformes: Heptapteridae) en un área natural protegida en México. Tesis Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México

Kappas, I., Vittas, S., Pantzartzi, C. N, Drosopoulou, E., Scouras, Z.G. 2016. A Time-Calibrated Mitogenome Phylogeny of Catfish (Teleostei: Siluriformes). *PLoS ONE* 11(12): 1-16

Koerber, S. y Reis, R. E. 2019. The current situation of *Rhamdia* Bleeker, 1858 (Siluriformes: Heptapteridae) – Gather available information, define a zero point and start all over again. *Historia Natural*. 2(9): 51-74

Kubatko, L. S. y Degnan, J. H., Inconsistency of Phylogenetic Estimates from Concatenated Data under Coalescence. *Systematic Biology*. 1(56): 17-24

Labastidas, J. L. 2005. Estado actual de la taxonomia de los siluriformes continentales (Actinopterygii: pisces). de la costa norte colombiana. Universidad de Magdalena. Facultad de Ciencias Básicas Programa de Biologia Santa Marta

Leaché, A. D. y Oaks, J. R. 2017. The Utility of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Data in Phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 48: 69-84

Li, H. A. 2011. Statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 27(21): 2987-2993

Liberles, D. A. y Chang, B., Geiler-Samerotte, K., Goldman, A., Hey J, Kaçar B, Meyer M, Murphy W, Posada D, Storfer A. 2020. Emerging Frontiers in the Study of Molecular Evolution. *Journal Molecular and Evolution*. 88 (3): 211-226

Linneo, C. 1735. Systema naturae, sive regna tria naturae systematice proposita per classes, ordines, genera y species ("Systema Naturae"). Lugduni Batavorum: Apud Theodorum Haak, ex Typographia Joannis Wilhelmi de Groot

López, U. 2016. Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales.* 64: 7- 31

Lozano-Fernandez, J. 2022. A practical guide to design and assess a phylogenomic study. *Genome Biology and Evolution*. 14(9): 37-49.

Lucas, S. G., Garcia, R., Espinoza, E., Alvarado, G., Hurtado-de Mendonza, L y Vega, E. 2008. The fossil mammals of Nicaragua. *Museum of Natural History and Science*. 44: 417-430.

Lundberg, J. G. y L. A. McDade. 1986. On the South American catfish Brachyrhamdia imitator Myers (Siluriformes, Pimelodidae), with phylogenetic evidence for a large intrafamilial lineage. *Notulae Naturae*. 463: 1-24.

Lundberg, J.G., Bornbusch A.H. y Mago-Leccia F. 1991. Gladioglanis conquistador n. sp., from Ecuador with diagnoses of the subfamilies Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodinae n. subf. (Siluriformes, Pimelodidae). *Copeia*. 1: 190-209.

Lundberg, J.G., Sabaj Pérez, M.H., Dahdul, W.M. and Aguilera, O.A. 2009. The Amazonian Neogene Fish Fauna. En: Amazonia: Landscape and Species Evolution: A look into the past (Eds C. Hoorn and F.P. Wesselingh). Pp 281-301.

Maddison, W., y Knowles, L. 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*. 55(1): 21-30.

Mank, J. E., y Avise, J. C. 2006. Supertree analyses of the roles of viviparity and habitat in the evolution of atherinomorph fishes. *Journal of Evolutionary Biology*. 19(3): 734-740.

Manthey JD, Campillo LC, Burns KJ, Moyle RG. 2016. Comparison of target-capture and restriction-site associated DNA sequencing for phylogenomics: a test in cardinalid tanagers (Aves, Genus: Piranga). *Systematics and Biology*. 4(65): 4640-50

Marko P.B. 2002. Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. *Molecular Biology and Evolution*. 19: 2005-2021

Matzke, N. J. 2013. Probabilistic historical biogeography: new models for founderevent speciation, imperfect detection, and fossils allow improved accuracy and modeltesting. *Frontiers of Biogeography*. 5(4): 242-248

McLean, B. S., Bell, K. C. y Cook, J. A. 2022. SNP-based phylogenomic inference in Holarctic ground squirrels (Urocitellus). *Molecular phylogenetics and Evolution*. (169): 174-188

Marshall, J.S. 2007. The geomorphology and physiographic provinces of Central America. En: Bundschuh, J. y Alvarado, G. E. (Eds.).Central America: Geology, Resources, and Natural Hazards. Taylor & Francis. Pp. 5-21

Miller, R. R. 1984. *Rhamdia reddelli*, new species, the first blind pimelodid catfish from MiddleAmerica, with a key to the Mexican species. *Transactions of the San Diego Society of Natural History*. (20): 135-144.

Miller, R. R. 2005. Freshwater fishes of México (with the collaboration of WL Minkley and SM Norris). Chicago: The University of Chicago Press. Estados Unidos

Morrone, J. 2000, Sistemática, biogeografía y evolución: Los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio. Universidad Nacional Autónoma de México. México

Morrone, J., 2013. Sistemática. Fundamentos, métodos, aplicaciones: México, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Pp. 508.

Nürk, N. M., Linder, H. P., Onstein, R. E., Larcombe, M. J., Hughes, C. E., Piñeiro Fernández, L., Schlüter, P. M., Valente, L., Beierkuhnlein, C., Cutts, V., Donoghue, M. J., Edwards, E. J., Field, R., Flantua, S. G. A., Higgins, S. I., Jentsch, A., Liede-Schumann, S., Pirie, M. D. 2020. Diversification in evolutionary arenas Assessment and synthesis. *Ecology and Evolution*. 10(12): 6163-6182.

O'Dea, A., Lessions, H. A., Coates, A. G., Eytan, R. I., Restrepo-Moreno, S. A., Cione, A. L., Collins, L. S., de Queiroz, A., Farris, R. D., Norris, R. F., Stallard, R. F., Woodburne, M. O., Aguilera, O., Aubry, M. P., Berggren, W., Budd, A. F., Cozzuol, M. A., Coppard, S. E., Duque-Caro., Hernan., Finnegan., S., Gasparini, G. M., Grossman., E. L., Johnson, K. G., Keigwin, L. D., Knowtoln, N., Leigh, E. G., Pingel-Leonard, J. S., Marko, P. B., Pyenson, N. D., Rachello-Dolmen., P., Soibelzon, E. Soiblenzon, L., Todd, J. A., Veirmej, G. J., Jackson, J. B. C. 2016. Formation of the Isthmus of Panama. *Science advances*. 2(8): 1-11

Ortiz, E.M. 2019. vcf2phylip v2.0: convert a VCF matrix into several matrix formats for phylogenetic analysis. DOI:10.5281/zenodo.2540861

Pace, N. R., Sapp, J. y Goldenfeld, N. 2012. Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life. *Classic Perspective*. 109(4): 1011–1018

Pante, E., Abdelkrim, J., Viricel, A., Gey, D., France, S. C., Boisselier, M. C., y Samadi, S. 2015a. Use of RAD sequencing for delimiting species. *Heredity*. 114(5): 450-459.

Pante, E., Puillandre, N., Viricel, A., Arnaud-Haond, S., Aurelle, D., Castelin, M., Chenuil, A., Destombe, C., Forcioli, D., Valero, M., Viard, F., y Samadi, S. 2015b. Species are hypotheses: Avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Molecular Ecology*. 24(3): 525-544.

Papakostas, S., Michaloudi, E., Proios, P., Brehm, M., Verhage, L., Rota, J., Peña, C., Stamou, G., Pritcz, V. L. Fontaneto, D. y Declerck, S. A. J .2016. Integrative Taxonomy Recognizes Evolutionary Units Despite Widespread Mitonuclear Discordance: Evidence from a Rotifer Cryptic Species Complex. *Systematic Biology*. 3(65): 508-524

Pérez-Rodríguez, Beltrán-López, R. G., Domínguez-Domínguez, O., Rivas-González, J. M. 2023. Los peces de cuevas de México a través de la sistemática filogenética. *Ciencia Nicolaita.* 89: 53-70

Perea, S., Souza-Santos, C., Robalo, J. y Doadrio, I. 2020. Multilocus phylogeny and systematics of Iberian endemic *Squalius* (Actinopterygii, Leuciscidae). *Zoologica Scripta*. 49(4): 440-457

Pie, M. R., Bornschein, M. R., Ribeiro, L. F., Faircloth, B. C., y McCormack, J. E. 2019. Phylogenomic species delimitation in microendemic frogs of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (141): 1-8

Protti, R. 1997. Evidencias de glaciacion en el valle del general (Costa Rica) durante el pleistoceno tardio. *Revista Geologica de America Central*. 20(19): 75-85

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller. J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J., Sham, P. C. 2007. PLINK: a tool set for wholegenome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 81(3):559-75.

R Core Team 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <u>https://www.R-project.org/</u>.

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., y Suchard, M. A. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 67(5): 901-904.

Rabosky D. L. 2009. Heritability of extinction rates links diversification patterns in molecular phylogenies and fossils, Systematic Biology. 58(6):629-40.

Reich, D., Price, A. L., y Patterson, N. 2008. Principal component analysis of genetic data. Nature Genetics. 40(5): 491-492

Romero, A. y Paulson. 2001. It's a wonderful hypogean life: a guide to the troglomophic fishes of the World. *Environmental Biology of Fishes*: 62: 13-41

Perdices, A., Bermingham, E., Montilla, A., y Doadrio, I. 2002. Evolutionary history of the genus Rhamdia (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 25(1): 172-189

Petzold, A., y Hassanin, A. 2020. A comparative approach for species delimitation based on multiple methods of multi-locus DNA sequence analysis: A case study of the genus Giraffa (Mammalia, Cetartiodactyla). *PLoS ONE*. 15(2): 1-28.

Sanderson M. J., Donoghue, M. J. 1996. Reconstructing shifts in diversification rates on phylogenetic trees. *Trends Ecology and Evolution*. 11(1):15-20.

Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., y Malonia, S. K. 2023. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology (Basel)*. 12(7): 1-25.

Shauna, P., Blanchard, B. D., Powell, S., Blaimer, B. B. Moreau, C. S. 2022. Phylogenomics and fossil data inform the systematics and geographic range evolution of a Diverse Neotropical Ant Lineage. *Insect Systematic and Diversity*. 1(6): 1-13

Silfvergrip, A. M. C. 1996. A systematics revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Stockholm University. Stockholm

Silva, G. S. C., Roxo, F. F., Melo B. F., Ochoa, L. E., Bockmann F. A., Sabaj M. H., 2021. Evolutionary history of Heptapteridae catfishes using ultraconserved elements (Teleostei, Siluriformes). *Zoologica Scripta*. 5(50): 543–554.

Sites, J. W., y Marshall, J. C. 2003. Delimiting species: A Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*. 18(9): 462-470.

Solís, A., Kohlmann, B., Alvarado, G.E. 2024. A Costa RicaBiological Puzzle. The Geological, Landscape, and Vicariance History as a Conditioning of the Past and Present Biogeography. En: Quesada-Román, A. (Eds.). Landscapes and Landforms of Costa Rica. World Geomorphological Landscapes. Springer

Stange, M., Sanchez-Villagra, M. R., Salzburger, W., Matschiner, M. 2018. Bayesian Divergence-Time Estimation with Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphism Data of Sea Catfishes (Ariidae) Supports Miocene Closure of the Panamanian Isthmus. *Systematic Biology*. 4(67): 681-699

Stuessy, T. F. 2020. Challenges facing systematic biology. Taxon. 69 (4): 655-667.

Sullivan, J. P., Lundberg, J. G., y Hardman, M. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catWshes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Molecular phylogenetic and evolution*. 41(3): 636-662

Swofford, D. L. 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Weber, A. y Wilkens, H. 1998. *Rhamdia macuspanensis*: a new species of troglobitic pimelodid catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from a cave in Tabasco, México. *Copeia* (4): 1998-1004

Weirauch, C., Schuh, R. T., Cassis, G. y Wheeler, W. C. 2018. Revisiting habitat and lifestyle transitions in Heteroptera (Insecta: Hemiptera): insights from a combined morphological and molecular phylogeny. *Cladistics*. 35(1): 67-105

Wilkens, H. 1993. A new species of *Rhamdia* (Pisces: Pimelodidae) from a cave in the Sierra de Zongolica (Veracruz, México). *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut* 90: 375-378

Wilkens, H. 2001. Convergent Adaptations to Cave Life in the *Rhamdia laticauda* Catfish Group (Pimelodidae, Teleostei). *Environmental Biology of Fishes*. 62: 251-261

Woese, C. R. y Fox, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(11): 5088-5090.

Wright, B. R., Grueber, C. E., Lott, M., Belov, K., Johnson, R. N., y Hogg, C. J. 2019. Impact of reduced-representation sequencing protocols on detecting population structure in a threatened marsupial. *Molecular Biology Reports*. 46(5): 5575-5580

Yang, Z., y Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics*. 13: 303-314

Yi, X. y Latch, E. K. 2021. Nonrandom missing data can bias Principal Component Analysis inference of population genetic structure. *Molecular Ecology Resources*. 22(2): 602-611

Zhang, J., Shen, J., Cong, Q. y Grishin, N.V. 2019. Genomic analysis of the tribe Emesidini (Lepidoptera: Riodinidae). *Zootaxa*. 4668(4): 475-488.

Zuckerkandl, E., y Pauling, E. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*. 8(2): 357-366.
## XII. ANEXOS

Anexo 1. Individuos empleados en este estudio para las especies de *Rhamdia* trans-Andina y el grupo externo.

No	Especie	ID	Cuenca	Pais	Latitud	Longitud
1	Imparfinis stictonotus	FMNH149655	-	-	-	-
2	Pimellodela macturki	FMNH149659	-	-	-	-
3	Pimelodella chagresi	LSUMZ-F1386	Coto	Costa Rica	8,60475	-82,90025
4	Pimelodus tetramerus	FMNH145220.1	Nacaome	NA	NA	NA
5	Rhamdia quelen	ROM-T19729	Sucumbios	Ecuador	0,02624	-77,46209
6	Rhamdia quelen	ROMI-T28260	Pastaza	Ecuador	-2,444718	-77,008391
7	Rhamdia quelen	ROMI-T28261	Pastaza	Ecuador	-2,444718	-77,008391
8	Rhamdia cinerascens	RW701	Guayas	Ecuador	-1,640133	-79,802364
9	Rhamdia quatemalensis	SLU-3119	Moho	Belize	16,09807	-88,96148
10	Rhamdia guatemalensis	SLU-3120	Moho	Belize	16,09807	-88,96148
11	Rhamdia guatemalensis	IAvH-CT-24685	MagdalenaCauca	Colombia	67012111	- 741495806
12	Rhamdia guatemalensis	IAvH-CT-24727	MagdalenaCauca	Colombia	60891389	- 742434806
13	Rhamdia quatemalensis	IAvH-CT-24955	MagdalenaCauca	Colombia	47290833	-7585475
14	Rhamdia quatemalensis	IAvH-CT-30776	MagdalenaCauca	Colombia	41616111	- 749273056
15	Rhamdia quatemalensis	IAvH-CT-32791	MagdalenaCauca	Colombia	71316194	-73529575
16	Rhamdia guatemalensis	IAvH-CT-37700	MagdalenaCauca	Colombia	73895636	-7324635
17	Rhamdia guatemalensis	ROMI-19467	Pacífico	Colombia	5,19078	-76,9585
18	Rhamdia guatemalensis	ROMI-24420	Pacífico	Colombia	3,7802	-76,75986
19	Rhamdia guatemalensis	ROMI-24471	Pacífico	Colombia	3,91666	-76,48123
20	Rhamdia guatemalensis	ROMI-24772	Pacifico	Colombia	3,64914	-76,69291
21	Rhamdia guatemalensis	ROMI-24553	Pacífico	Colombia	2,01265	-77,1739
22	Rhamdia guatemalensis	ROMI-24554	Pacífico	Colombia	2,01265	-77,1739
23	Rhamdia quatemalensis	IAvH-CT-33164	Caribe	Colombia	8,024778	-77,193611
24	Rhamdia quatemalensis	FMNH-131170	Cahabón	Guatemal	15,46053	-90,38104
25	Rhamdia quatemalensis	FMNH-131823	Grijalva- Usumacinta	Guatemal	15,9981	-90,62079
26	Rhamdia	FMNH-134245	Peten Lake	Guatemal	16,923093	-89,881795
27	Rhamdia quatemalensis	JA1228	Yucatan Norte, Yucatan Este	México	21,152639	-90,022972
28	Rhamdia guatemalensis	JA1296	Grijalva- Usumacinta	México	16,830194	-93,526028

29	Rhamdia	JA1314	Grijalva-	México	16,825917	-93,270472
	guatemalensis	14.40.45			0 700000	
30	Rhamdia	JA1645	Alajuela	Costa	8,708099	-82,980963
	guatemalensis			Rica		
31	Rhamdia	JA183	Yucatan Norte,	México	20,681389	-89,178333
	guatemalensis		Yucatan Este			
32	Rhamdia	JA2003	Limón	Costa	10,128	-83,602806
	guatemalensis			Rica		
33	Rhamdia	JA460	Yucatan Norte,	México	20,153611	-88,816111
	quatemalensis		Yucatan Este		,	,
34	Rhamdia	JA053	Yucatan Norte.	México	20.678611	-89.816667
•	quatemalensis		Yucatan Este			
35	Rhamdia	14706	Vucatan Norte	México	20.953611	-87 176667
00	quatemalensis	0/1/00	Vucatan Este	MCXICO	20,000011	-07,170007
26	Bhomdia	14960	Depeleenen	Máxiaa	10 400550	06 630000
30	Rildillula	JA00Z	Рараюарап	IVIEXICO	16,400550	-90,032222
07	guatemalensis	14.000	<u> </u>		10 100550	
37	Rhamdia	JA863	Papaloapan	México	18,460556	-96,632222
	guatemalensis					
38	Rhamdia	LSUMZ-F2835	Prinzapolka	Nicaragua	14,30511	-83,63761
	guatemalensis					
39	Rhamdia	LSUMZ-F2837	Prinzapolka	Nicaragua	14,30511	-83,63761
	quatemalensis			Ū		
40	Rhamdia	LSUMZ-F3150	Goascoran	Honduras	13,590909	-87,749154
	quatemalensis				,	01,110101
11	Rhamdia	L SUM7-F4365	Choluteca	Honduras	13/1061	-87 11236
	quatemalansis		Onoluteda	Tionuluas	10,41301	-07,11200
40	Dhamdia		Detuce	Llandunaa	45 45400	05 40700
42	Rhandia	LSUMZ-F4018	Paluca	Honduras	15,15499	-85,40733
- 10	guatemaiensis	<b>DOL</b> # 40000	5 /2			
43	Rhamdia	ROMI-19282	Pacifico	Colombia	5,18	-76,99162
	guatemalensis					
44	Rhamdia	LSUMZ-F4619	Patuca	Honduras	15,15499	-85,46733
	guatemalensis					
45	Rhamdia	SLU-3134	Mopán	Belize	17,17211	-89,1131
	guatemalensis					
46	Rhamdia	SLU-3135	Mopán	Belize	17,17211	-89,1131
	quatemalensis		•		,	,
47	Rhamdia	SI U-4556	Pumpuapa	México	14 90991	-92 33231
	quatemalensis	020 1000	1 unipudpu	moxico	11,00001	02,00201
18	Rhamdia	L SUM7-F3023	San luan	Nicaraqua	12 20872	-86 09078
40	quatemalensis		Gan gaan	Niodragua	12,20072	-00,00070
40	Phamdia		Son luon	Nicoroguo	10 00070	96 00079
49	Rilalilula	L301VIZ-F3024	Sali Juan	Nicaragua	12,29072	-00,09070
50	guatemaiensis	144770	0	0	40.4	05 004444
50	Rnamola	JA1770	Guanacaste	Costa	10,4	-85,081111
	guatemaiensis		-	Rica		
51	Rhamdia	JA1771	Guanacaste	Costa	10,4	-85,081111
	guatemalensis			Rica		
52	Rhamdia	JA2002	Limón	Costa	10,128	-83,602806
	guatemalensis			Rica		
53	Rhamdia laluchensis	JA908	Grijalva-	México	17,059167	-93,895556
			Usumacinta			
54	Rhamdia laluchensis	JA909	Grijalva-	México	17.059167	-93.895556
.			Usumacinta		,	
55	Rhamdia laluchensis	14910	Grijalva	México	17 050167	-03 805556
00		5/10/10	Usumacinta	MCAIOO	17,000107	50,00000
56	Rhamdia laticoudo	EMNH_H120810	Monán	Guatamal	16 30/11	-80 11063
50			inopan	Guaternal	10,39411	-09,44003
57	Dhamdia latiaanda		Manán	a Ouetawa'	40 40457	00.440
5/	Rinamula laticauda	FIVINH-131821	wopan	Guatemai	10,10157	-90,416
				a		
58	Rnamdia laticauda	FMNH-143572	Grijalva-	Guatemal	15,347796	-90,736146
1	1		Usumacinta	а	1	

59	Rhamdia laticauda	JA1272	Grijalva- Usumacinta	México	16,831389	-93,274722
60	Rhamdia laticauda	JA1312	Grijalva- Usumacinta	México	16,831389	-93,274722
61	Rhamdia laticauda	JA805	Papaloapan	México	18,914444	-96,783333
62	Rhamdia laticauda	JA864	Papaloapan	México	18,460556	-96,632222
63	Rhamdia laticauda	LSUMZ-F2152	Chiriquí	Panama	9,153778	-82,15964
64	Rhamdia laticauda	LSUMZ-F2153	Chiriquí	Panama	9,153778	-82,15964
65	Rhamdia laticauda	JA1646	Alajuela	Costa	10,226111	-83,901111
66	Rhamdia laticauda	JA1647	Alajuela	Costa Rica	10,226111	-83,901111
67	Rhamdia laticauda	JA1748	Alajuela	Costa Rica	10,454167	-84,639722
68	Rhamdia laticauda	JA1749	Alajuela	Costa Rica	10,454167	-84,639722
69	Rhamdia laticauda	JA1982	Limón	Costa Rica	10,133333	-83,6025
70	Rhamdia laticauda	JA1983	Limón	Costa Rica	10,133333	-83,6025
71	Rhamdia laticauda	JA1961	Alajuela	Costa Rica	10,5025	-84,593889
72	Rhamdia laticauda	JA1915	Alajuela	Costa Rica	10,554722	-84,766944
73	Rhamdia laticauda	JA1916	Alajuela	Costa Rica	10,554722	-84,766944
74	Rhamdia laticauda	FMNH- 129592 1	Motagua	Guatemal a	15,18182	-89,30196
75	Rhamdia laticauda	FMNH- 129592 2	Motagua	Guatemal a	15,18182	-89,30196
76	Rhamdia laticauda	LSUMZ-F3096	Motagua	Honduras	14,88467	-89,09372
77	Rhamdia laticauda	LSUMZ-F3097	Motagua	Honduras	14,88467	-89,09372
78	Rhamdia laticauda	LSUMZ-F3172	Goascoran	Honduras	13,89107	-87,6831
79	Rhamdia laticauda	LSUMZ-F3437	Cangrejal	Honduras	15,67178	-86,65589
80	Rhamdia laticauda	LSUMZ-F3619	Cangrejal	Honduras	15,65214	-86,70744
81	Rhamdia laticauda	LSUMZ-F4038	Patuca	Honduras	14,4398	-86,05311
82	Rhamdia laticauda	LSUMZ-F4039	Patuca	Honduras	14,4398	-86,05311
83	Rhamdia laticauda	USM-34122	Nacaome	Honduras	14,119471	-87,509588
84	Rhamdia laticauda	WAM06-339	Lancetilla	Honduras	15,72201	-87,45741
85	Rhamdia laticauda	WAM06-343	Lancetilla	Honduras	15,72201	-87,45741
86	Rhamdia laticauda	JA1793	Guanacaste	Costa Rica	10,683333	-85,088056
87	Rhamdia laticauda	JA1794	Guanacaste	Costa Rica	10,683333	-85,088056
88	Rhamdia macuspanensis	JA933	Grijalva- Usumacinta	México	17,621667	-92,473889
89	Rhamdia macuspanensis	JA934	Grijalva- Usumacinta	México	17,621667	-92,473889
90	Rhamdia macuspanensis	JA932	Grijalva- Usumacinta	México	17,621667	-92,473889
91	Rhamdia nicaraguensis	FMNH-T179125	Parismina	Costa Rica	10,15513	-83,519581
92	Rhamdia nicaraguensis	FMNH-T179130	Parismina	Costa Rica	10,15513	-83,519581

93	Rhamdia nicaraguensis	JA1715	Alajuela	Costa Rica	10,476944	-84,771111
94	Rhamdia nicaraguensis	JA1716	Alajuela	Costa Rica	10,476944	-84,771111
95	Rhamdia nicaraguensis	JA1768	Guanacaste	Costa Rica	10,4	-85,081111
96	Rhamdia nicaraguensis	JA2037	Limón	Costa Rica	10,116389	-83,598333
97	Rhamdia nicaraguensis	JA2038	Limón	Costa Rica	10,116389	-83,598333
98	Rhamdia nicaraguensis	JA1769	Guanacaste	Costa Rica	10,4	-85,081111
99	Rhamdia nicaraguensis	JA1931	Alajuela	Costa Rica	10,554722	-84,755556
100	Rhamdia nicaraguensis	JA1932	Alajuela	Costa Rica	10,554722	-84,755556
101	Rhamdia nicaraguensis	JA1960	Alajuela	Costa Rica	10,5025	-84,593889
102	Rhamdia parryi	SLU-4558	Costa de Chiapas	México	14,90991	-92,33231
103	Rhamdia parryi	SLU-4557	Costa de Chiapas	México	14,90991	-92,33231
104	Rhamdia parryi	JA1628	Costa de Chiapas	México	15,211944	-92,562278
105	Rhamdia parryi	JA1629	Costa de Chiapas	México	15,211944	-92,562278
106	Rhamdia parryi	JA1633	Costa de Chiapas	México	15,877222	-93,472222
107	Rhamdia reddelli	JA856	Papaloapan	México	18,475556	-96,639722
108	Rhamdia reddelli	JA857	Papaloapan	México	18,475556	-96,639722
109	Rhamdia reddelli	JA858	Papaloapan	México	18,475556	-96,639722
110	Rhamdia zongolicensis	JA789	Papaloapan	México	18,611944	-96,887222
111	Rhamdia zongolicensis	JA786	Papaloapan	México	18,611944	-96,887222
112	Rhamdia zongolicensis	JA787	Papaloapan	México	18,611944	-96,887222

Anexo 2. Filogenia realizada con el 60% Min\_samples\_locus y 470 523 pb de longitud.



0.007

Anexo 3. Filogenia realizada con el 80% Min\_samples\_locus y 91 803 pb de longitud.



- I\_stictonotus\_FMNH\_149655

Anexo 4. Filogenia realizada con el 90% Min samples locus y 239 pb de longitud.



0.004

P tetramerus FMNH-145220 1



Anexo 5. Diagrama de cajas y bigotes que representa la profundidad para cada muestra, es decir, la cantidad de veces que se secuenció cada posición.

Anexo 6. De acuerdo con la función find.clusters, el criterio de información bayesiana (BIC) apoyó ocho grupos genéticos.



Value of BIC

Anexo 7. Individuos de *Rhamdia* trans-Andina con asignación de grupos de acuerdo con el análisis DAPC.

Especie	ID	Localidad	Cuenca	Grupo
Rhamdia laluchensis	JA908	Sótano de La Lucha	Grijalva-Usumacinta	1
Rhamdia laluchensis	JA909	Sótano de La Lucha	Grijalva-Usumacinta	1
Rhamdia laluchensis	JA910	Sótano de La Lucha	Grijalva-Usumacinta	1
Rhamdia guatemalensis	JA1645	Río Frío	Alajuela	2
Rhamdia guatemalensis	JA2003	Lago (Finca Las Brisas)	Limón	2
Rhamdia guatemalensis	LSUMZ- F2835	La Moskitia	Prinzapolka	2
Rhamdia guatemalensis	LSUMZ- F2837	La Moskitia	Prinzapolka	2
Rhamdia guatemalensis	LSUMZ- F4365	Rio Choluteca, Orocrina	Choluteca	2
Rhamdia guatemalensis	LSUMZ- F4618	Rio Wampu	Patuca	2
Rhamdia guatemalensis	LSUMZ- F4619	Rio Wampu	Patuca	2
Rhamdia guatemalensis	LSUMZ- F3023	Farm close to Lake Managua	San Juan	2
Rhamdia guatemalensis	LSUMZ- F3024	Farm close to Lake Managua	San Juan	2
Rhamdia laticauda	FMNH- H130810	Rio Mopan	Mopán	3
Rhamdia laticauda	FMNH- 131821	Aldea el Caribe	Mopán	3
Rhamdia laticauda	FMNH- 143572	Uspantan, Rio La Concepcion	Grijalva-Usumacinta	3
Rhamdia laticauda	SLU-3119	Moho River	Moho	3
Rhamdia laticauda	SLU-3120	Moho River	Moho	3
Rhamdia laticauda	LSUMZ- F3097	Creek outside Santa Rita	Motagua	4
Rhamdia laticauda	LSUMZ- F3172	Valle, Rio Goascoran	Goascoran	4
Rhamdia laticauda	LSUMZ- F4038	Rio Guayambre	Patuca	4
Rhamdia laticauda	LSUMZ- F4039	Rio Guayambre	Patuca	4
Rhamdia laticauda	USM-34122	Lepaterique, W Tegucigalpa	Nacaome	4
Rhamdia guatemalensis	FMNH- 131170	Rio Cahabon, south of Coban on Hwy. 5	Cahabón	5

Rhamdia guatemalensis	FMNH- 131823	Rio Salado	Grijalva-Usumacinta	5
Rhamdia guatemalensis	FMNH- 134245	Lago Peten-Itza, south of Flores	Peten Lake	5
Rhamdia guatemalensis	JA1228	Cenote Sirena	Yucatan Norte, Yucatan Este	5
Rhamdia guatemalensis	JA1296	Cueva Los Bordos (Río La Venta)	Grijalva-Usumacinta	5
Rhamdia guatemalensis	JA1314	Río Santo Domingo, Pozas de Berriozabal (Río Sabinal)	Grijalva-Usumacinta	5
Rhamdia guatemalensis	JA183	San Miguel	Yucatan Norte, Yucatan Este	5
Rhamdia guatemalensis	JA460	Cenote Papacal	Yucatan Norte, Yucatan Este	5
Rhamdia guatemalensis	JA053	Cenote X'baba	Yucatan Norte, Yucatan Este	5
Rhamdia guatemalensis	JA706	Cenote Popol Vuh	Yucatan Norte, Yucatan Este	5
Rhamdia guatemalensis	JA862	Río San Antonio	Papaloapan	5
Rhamdia guatemalensis	JA863	Río San Antonio	Papaloapan	5
Rhamdia guatemalensis	SLU-3134	Mopan River	Mopán	5
Rhamdia guatemalensis	SLU-3135	Mopan River	Mopán	5
Rhamdia guatemalensis	SLU-4556	River on Hwy. 200, W Tapachula	Pumpuapa	5
Rhamdia laticauda	JA805	Río Atoyac	Papaloapan	6
Rhamdia laticauda	JA864	Río San Antonio	Papaloapan	6
Rhamdia macuspanensis	JA933	Grutas de Agua Blanca	Grijalva-Usumacinta	6
Rhamdia macuspanensis	JA934	Grutas de Agua Blanca	Grijalva-Usumacinta	6
Rhamdia reddelli	JA856	Cueva del Nacimiento del Río San Antonio	Papaloapan	6
Rhamdia zongolicensis	JA789	Cueva Ostoc (Ostok)	Papaloapan	6
Rhamdia laticauda	JA1272	Cueva Paso Burro	Grijalva-Usumacinta	6
Rhamdia laticauda	101212			
Rhamdia macuspanensis	JAIJIZ	Cueva Paso Burro	Grijalva-Usumacinta	6
Rhamdia nicaraauensis	JA932	Grutas de Agua Blanca	Grijalva-Usumacinta Grijalva-Usumacinta	6 6
j	JA932 JA1715	Cueva Paso Burro Grutas de Agua Blanca Quebrada La Fortuna	Grijalva-Usumacinta Grijalva-Usumacinta Alajuela	6 6 7
Rhamdia nicaraguensis	JA1312 JA932 JA1715 JA1716	Cueva Paso Burro Grutas de Agua Blanca Quebrada La Fortuna Quebrada La Fortuna	Grijalva-Usumacinta Grijalva-Usumacinta Alajuela Alajuela	6 6 7 7
Rhamdia nicaraguensis Rhamdia nicaraguensis	JA1312 JA932 JA1715 JA1716 JA1768	Cueva Paso Burro Grutas de Agua Blanca Quebrada La Fortuna Quebrada La Fortuna Río Jabillo	Grijalva-Usumacinta Grijalva-Usumacinta Alajuela Alajuela Guanacaste	6 6 7 7 7
Rhamdia nicaraguensis Rhamdia nicaraguensis Rhamdia nicaraguensis	JA1312 JA932 JA1715 JA1716 JA1768 JA2037	Cueva Paso Burro Grutas de Agua Blanca Quebrada La Fortuna Quebrada La Fortuna Río Jabillo Quebrada "Freddy"	Grijalva-Usumacinta Grijalva-Usumacinta Alajuela Alajuela Guanacaste Limón	6 6 7 7 7 7 7
Rhamdia nicaraguensis Rhamdia nicaraguensis Rhamdia nicaraguensis Rhamdia nicaraguensis	JA1312 JA932 JA1715 JA1716 JA1768 JA2037 JA2038	Cueva Paso Burro Grutas de Agua Blanca Quebrada La Fortuna Quebrada La Fortuna Río Jabillo Quebrada "Freddy" Quebrada "Freddy"	Grijalva-Usumacinta Grijalva-Usumacinta Alajuela Alajuela Guanacaste Limón	6 7 7 7 7 7 7 7
Rhamdia nicaraguensis Rhamdia nicaraguensis Rhamdia nicaraguensis Rhamdia nicaraguensis Rhamdia nicaraguensis	JA1312 JA932 JA1715 JA1716 JA1768 JA2037 JA2038 FMNH- T179130	Cueva Paso Burro Grutas de Agua Blanca Quebrada La Fortuna Quebrada La Fortuna Río Jabillo Quebrada "Freddy" Quebrada "Freddy" Rio Parismina, west of Tres Millas	Grijalva-Usumacinta Grijalva-Usumacinta Alajuela Alajuela Guanacaste Limón Limón Parismina	6 7 7 7 7 7 7 7 7

Rhamdia guatemalensis	ROMI-24533	Rio Patía	Pacífico	8
Rhamdia guatemalensis	ROMI-19282	Caño Membá	Pacifico	8
Rhamdia guatemalensis	LSUMZ- F3150	Valle, Rio Goascoran	Goascoran	8
Rhamdia guatemalensis	ROMI-19467	Quebrada Salao	Pacífico	9
Rhamdia guatemalensis	ROMI-24420	Rio Dagua	Pacífico	9
Rhamdia guatemalensis	ROMI-24471	Quebrada Santa Elena	Pacífico	9
Rhamdia guatemalensis	ROMI-24772	Sardina River	Pacífico	9
Rhamdia guatemalensis	ROMI-24554	Rio Patía	Pacífico	9
Rhamdia guatemalensis	IAvH-CT- 33164	vereda Arquía-Limón, cerro Tacarcuna, Rio Arquia	Caribe	9
Rhamdia guatemalensis	IAvH-CT- 24685	Caño NN, vereda Riberas del San Juan	MagdalenaCauca	9
Rhamdia guatemalensis	IAvH-CT- 24727	Caño NN, vereda Guíneales	MagdalenaCauca	9
Rhamdia guatemalensis	IAvH-CT- 24955	Río Barbas	MagdalenaCauca	9
Rhamdia guatemalensis	IAvH-CT- 30776	Quebrada El Espinal	MagdalenaCauca	9
Rhamdia guatemalensis	IAvH-CT- 32791	San Vicente de Chucurí, Quebrada La Lizama	MagdalenaCauca	9
Rhamdia guatemalensis	IAvH-CT- 37700	Caño Angustias	MagdalenaCauca	9
Rhamdia laticauda	FMNH- 129592_1	Rio Motagua	Motagua	10
Rhamdia laticauda	FMNH- 129592_2	Rio Motagua	Motagua	10
Rhamdia laticauda	LSUMZ- F3096	Creek outside Santa Rita	Motagua	10
Rhamdia laticauda	JA1646	Río Frío	Alajuela	11
Rhamdia laticauda	JA1647	Río Frío	Alajuela	11
Rhamdia laticauda	JA1748	Río Burro	Alajuela	11
Rhamdia laticauda	JA1749	Río Burro	Alajuela	11
Rhamdia laticauda	JA1982	Quebrada Estrella (Finca Las Brisas)	Limón	11
Rhamdia laticauda	JA1983	Quebrada Estrella (Finca Las Brisas)	Limón	11
Rhamdia laticauda	JA1961	Río Arenal	Alajuela	11
Rhamdia laticauda	JA1915	Caverna de Gabinarraca	Alajuela	11
Rhamdia laticauda	JA1916	Caverna de Gabinarraca	Alajuela	11
Rhamdia laticauda	LSUMZ- F3437	La Ceiba, creek at Nueva Suyapa	Cangrejal	12

Rhamdia laticauda	LSUMZ- F3619	Rio El Padre outside La Ceiba	Cangrejal	12
Rhamdia laticauda	WAM06-339	S. of Tela	Lancetilla	12
Rhamdia laticauda	WAM06-343	S. of Tela	Lancetilla	12
Rhamdia cinerascens	RW701	Vinces River	Guayas	13
Rhamdia laticauda	LSUMZ- F2152	Rio Chiriqui, Bocas del Toro	Changuinola y Cricamola	13
Rhamdia laticauda	LSUMZ- F2153	Rio Chiriqui, Bocas del Toro	Changuinola y Cricamola	13
Rhamdia parryi	SLU-4558	River on Hwy. 200, W Tapachula	Costa de Chiapas	14
Rhamdia parryi	SLU-4557	River on Hwy. 200, W Tapachula	Costa de Chiapas	14
Rhamdia parryi	JA1628	Rio Fortuna	Costa de Chiapas	14
Rhamdia parryi	JA1629	Río Fortuna	Costa de Chiapas	14
Rhamdia parryi	JA1633	Puente Jesús	Costa de Chiapas	14