

## POLIMORFISMO MOLECULAR DE LA VARIACIÓN DE LA LONGITUD DE LOS INTRONES (EPIC-PCR) EN *Apistogramma* sp., PECES ORNAMENTALES DE LA AMAZONÍA PERUANA

Susana Sirvas<sup>1</sup>, Evelyn Briceño<sup>1</sup>, Betty Gamero<sup>1</sup>, Jesús Nuñez<sup>2</sup>, Fabrice Duponchelle<sup>2</sup>, Catalina Díaz<sup>1</sup> & Jean François Renno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNFV-FOPCA, 350 Calle Roma, Miraflores, Lima, Perú.  
E-mail: sirvascornejo@yahoo.com

<sup>2</sup>Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR175-CAVIAR, F-34000 Montpellier, France

### INTRODUCCIÓN

La Cuenca Amazónica involucra países sudamericanos como Guyana, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Brasil y Bolivia. Debido a su gran diversidad biológica muchas especies podrían presentar dificultad para ser identificadas morfológicamente. Tal es el caso de ciertos peces ornamentales como aquellos del género *Apistogramma* perteneciente al grupo de cíclidos enanos, compuesto por aproximadamente 14 géneros, según Romer (2006). Hasta la fecha se han descrito 64 especies, pero estima en 250 el número potencial de especies en este género.

El género *Apistogramma* es un grupo promisorio para el desarrollo económico de la región Amazónica ya que se comercializa tanto en el mercado nacional como internacional. Este grupo presenta una gran similitud morfológica y gama de colores entre y dentro de las especies, razón por la cual además de las técnicas tradicionales, se requiere utilizar modernas técnicas moleculares de identificación de especies, que contribuyan a determinar las relaciones genéticas entre ellas.

La técnica de EPIC-PCR (Exon-Primed Intron Crossing) consiste en el anillado de los iniciadores a los exones que flanquean a un intron para su subsecuente amplificación. Varios trabajos han demostrado que la técnica EPIC-PCR, ha sido muy útil para evidenciar el polimorfismo genético en poblaciones de varios vertebrados (Palumbi & Baker 1994, Chow & Takeyama 1998, Ibáñez 2002, Quatro *et al.* 2001) e invertebrados (Bierne *et al.* 2000, Daguin 2000). Más recientemente Hubert *et al.* (2007) utilizaron esta técnica para el estudio intraespecífico en *Serrasalmus* (pirañas).



**Figura 1.** Distribución del género *Apistogramma* en la cuenca Amazónica (Römer 2000, 2006).



**Figura 2.** Variedades "Azul" y "Rojo" de *Apistogramma agassizii*.

En el caso de *Apistogramma* se pretende utilizar la técnica EPIC-PCR para esclarecer los límites taxonómicos y las relaciones filogenéticas entre taxa, definidos como grupos monofiléticos. Para eso, se generó información sobre el polimorfismo de la longitud de los intrones de especies y variedades del género *Apistogramma*. Inicialmente 14 especies/variedades fueron identificadas morfológicamente y diferentes intrones fueron probados para determinar los más polimórficos a través de la técnica EPIC-PCR.

## MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 14 especies/variedades de *Apistogramma* cuya situación en la literatura sobre el tema se presenta en la tabla 1.

**Tabla 1.** Situación de la identificación de las especies/variedades de *Apistogramma* estudiadas.

Especie/Variiedad	Situación	Autor
<i>A. sp.</i> Melgar	Especie no descrita	(Romer 2002, 2004)
<i>A. eunotus</i>	Especie descrita	Kullander 1981
<i>A. sp.</i> Púrpura	Especie/variedad No mencionada	-
<i>A. agassizii</i> variedad Yellow	Especie descrita	Steindacher 1875
	Variiedad no descrita	-
<i>A. agassizii</i> variedad blue	Especie descrita	Steindacher 1875
	Variiedad no descrita	-
<i>A. agassizii</i> variedad Red pale	Especie descrita	Steindacher 1875
	Variiedad no descrita	-
<i>A. bitaeniata</i> variedad Blue	Especie descrita	Pellegrin 1936
	Variiedad no descrita	-
<i>A. bitaeniata</i> variedad Red Pale	Especie descrita	Pellegrin 1936
	Variiedad no descrita	-
<i>A. sp.</i> Arlequín	Especie/variedad no mencionada	-
<i>A. eremnopyge</i>	Especie descrita	Ready & Kullander 2004
<i>A. nijseni</i>	Especie descrita	Kullander 1979
<i>A. sp.</i> Apache	Especie/variedad no mencionada	-
<i>A. sp.</i> Roter	Especie/variedad no mencionada	-
<i>A. sp.</i> "Diamante"	Especie/variedad no mencionada	-

**Colecta.** Los puntos de colecta fueron tres cuencas: Nanay (quebradas Tachananay y Challua), Ucayali (quebradas Pradera, Jenaro Herrera y Jenaro Herrera km 4), Itaya (quebrada sin nombre). Las especies colectadas fueron: *A. agassizii* (variedades Blue, y Red Pale), *A. bitaeniata* (variedades Blue y Red Pale), *A. nijseni*, *A. eremnopyge*, *A. sp.* Apache, *A. sp.* Diamante, *A. sp.* Roter.

**Extracción de ADN total.** Se utilizó el método estándar CTAB (Doyle & Doyle 1987), para extraer ADN del músculo de *Apistogramma*.

**Amplificación del ADN por EPIC-PCR.** Se amplificó los intrones PMOPSI, RPEX, CK, ALDO C, y ALDO B) en cada uno de los individuos estudiados. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 92°C durante 2 min; 30 ciclos (95°C 1 min, hibridación 1 min a 45,4°C para PMOPSI, 41°C para Aldolasa B, 49,4°C para RPEX y Aldolasa C, y 52,8°C para CK, elongación 72°C, 1 min); elongación final 72°C, 5 min.

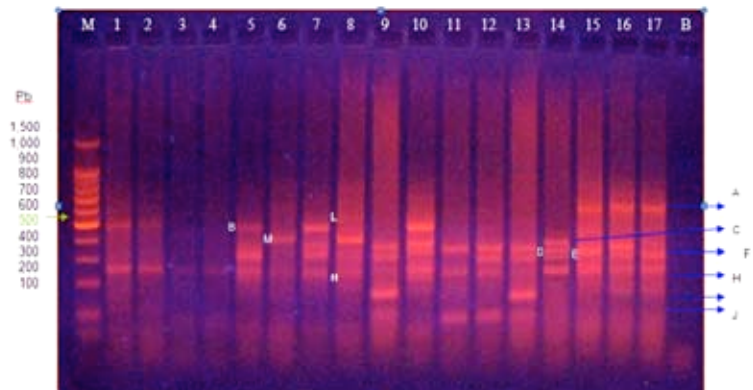
**Construcción del Árbol Filogenético.** El genotipo de cada individuo fue definido como la combinación entre todos los intrones analizados de las bandas de los fragmentos de ADN definidas por sus tallas. El árbol filogenético fue construido considerando la presencia o ausencia de cada banda por cada individuo a cada intrón según un algoritmo de parsimonia. Para probar la fuerza de cada nodo del árbol una prueba de bootstrap fue realizada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

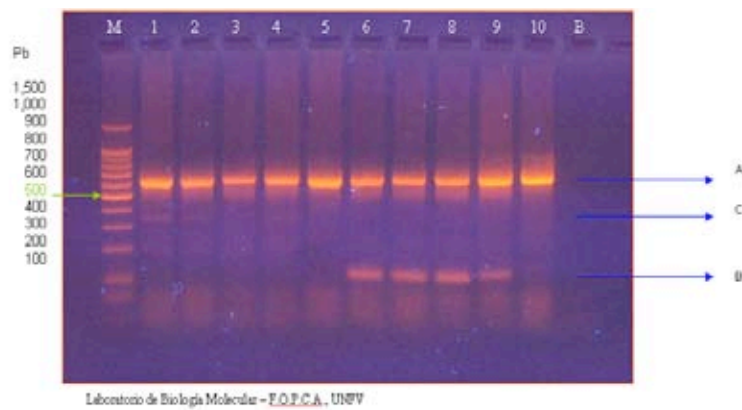
Se observó un polimorfismo molecular entre los intrones de las especies y variedades estudiadas. Los más informativos fueron PMOPSI y ALDOLASA B.

Se mostraron variaciones moleculares entre las especies *A. agassizii* y *A. bitaeniata*, con los intrones PMOPSI, CK, y ALDO B. También se observaron diferencias entre *A. bitaeniata* y *A. nijseni*; asimismo entre *A. nijseni* y *A. eremnopyge* con PMOPSI.

El polimorfismo de la longitud de los intrones ha permitido separar varias especies ya científicamente descritas o identificadas empíricamente en base a su morfología. Más aún, dentro de especies morfológicas, *A. agassizii*, las variedades blue y red ubicadas en simpatria fueron separadas molecularmente con los intrones ALDO C y CK. Esto podría permitir suponer que la cantidad de especies biológicas en *Apistogramma* es mayor a la que se presume cuando se usa únicamente la identificación morfológica.



**Figura 3.** Perfiles de especies/variedades de *Apistogramma* obtenidos con el intrón PMOPSI.

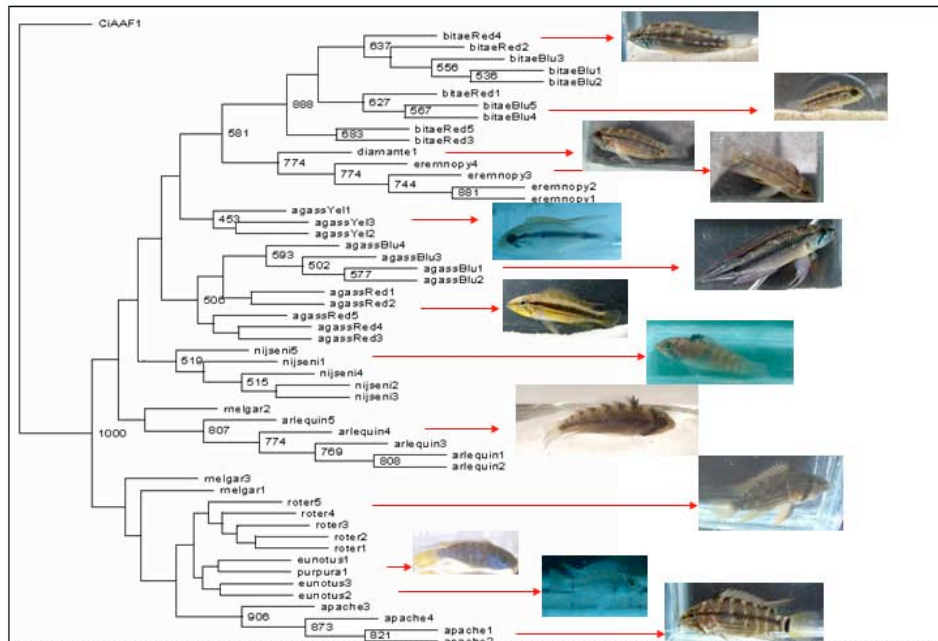


**Figura 4.** Perfiles de especies /variedades de *Apistogramma* obtenidos con el intrón RPEX.

Se evidenciaron 7 grupos monofiléticos: 1) *A. bitaeniata* , 2) *A. eremnopyge* con *A. sp. Diamante*, 3) *A. agassizii* variedad Blue, 4) *A. agassizii*, variedad Red Pale, 5) *A. nijsseni* , 6) *A. sp. Arlequín*, y 7) *A. sp. Apache*.

El intrón más informativo para la identificación molecular de especies *Apistogramma* fue PMOPSI y el menos informativo fue RPEX. La posición filogenética de *A. agassizii* variedad Yellow, *A. eunotus*, *A. sp. Roter*, *A. sp. Púrpura* y *A. sp. Melgar* aún no está resuelta (nodo  $\leq 50\%$ ).

#### AGRADECIMIENTOS



**Figura 5.** Cladograma de 14 especies / variedades de *Apistogramma* estimadas por el método de Santou & Nei (1987), a partir de los perfiles obtenidos con los intrones PMOPSI, Aldo B, CK, RPEX y Aldo C. El cladograma muestra la fuerza de los nodos (bootstrap) analizada para un valor de 1000 sorteos.

## REFERENCIAS

- Bierne N., Lehnert E., Bedier E., Bonhomme F. & Moore S. 2000. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed introncrossing (EPIC)-PCR. *Molecular Ecology*, 9:233-235.
- Chow S. & Takeyama H. 1998. Intron length variation observed in the cretine kinase and ribosomal protein genes of the Swordfish *Xiphias gladius*. *Fisheries Science*, 64: 397-402.
- Daguin C. 2000. Phylogéographie des moules du complexe d'espèces *Mytilus edulis*. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de L'université de Montpellier II. Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc. U.F.R. Sciences. Montpellier, France.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1987. A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.

- Hubert N., Duponchelle F., Nuñez J., García-Dávila C., Paugy D. & Renno J. F. 2007. Phylogeographie of the piranha *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* 16(10) 2115-2136.
- Ibáñez C. 2002. Structure génétique et écologie des populations de *Cichla monoculus* (Téléostéen, Cichlidés) en Amazonie Bolivienne. Diplôme d'Études Approfondies (DEA), Biologie de l'Évolution et Écologie. Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc. U.F.R. Sciences. Montpellier, France.
- Palumbi S. & Baker R. 1994. Contrasting Populations Structure from Nuclear Intron Sequences and mtDNA of Humpback Whales. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 426-435.
- Quatro J., Jones W. J. & Oswald K. J. 2001. PCR primers for an aldolase-B intron in acanthopterygians fishes. *BMC Evolutionary Biology*, 1:9.
- Römer U. 2000. Natural History of South American Dwarf Cichlids Part 1. *Cichlid Atlas*.
- Römer U. 2006. Natural History of South American Dwarf Cichlids Part 2. *Cichlid Atlas*.
- Stæk W. 2003. *Apistogramma spec. Tucucruí*. *Aquaristik Fachmagazin* 37(171): 58-60.
- Santou N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.





Los principales objetivos científicos de la Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica (RIIA), conformada por investigadores de varios países amazónicos (Bolivia, Colombia, Ecuador, Brasil, Perú), se centran en el estudio de la diversidad de los peces amazónicos, su evolución, sus estrategias de historia de vida y en el desarrollo de una piscicultura sostenible para las especies más prometedoras.

Además de las aplicaciones en el campo de la piscicultura, los resultados obtenidos son útiles para la gestión, manejo y conservación de estas especies en su medio natural.

En este libro el lector encontrará los resúmenes extendidos del segundo coloquio de la RIIA que se llevó a cabo en el INPA (Manaus, Brasil).

BIOLOGÍA DE LAS POBLACIONES DE PECES AMAZÓNICOS Y PISCICULTURA, Manaus, Brasil, 2009

## II COLOQUIO DE LA RED DE INVESTIGACIÓN SOBRE LA ICTIOFAUNA AMAZÓNICA

### BIOLOGÍA DE LAS POBLACIONES DE PECES AMAZÓNICOS Y PISCICULTURA

Comunicaciones del II Workshop Internacional  
28-30 de octubre 2009  
Manaus, Brasil

Editores:  
Jesús Núñez Rodríguez  
Fred Chu Koo  
Jorge Rebelo Porto  
Carmen R. García Dávila

ISBN: 978-612-46077-0-7



9 786124 607707



# **Biología de las Poblaciones de Peces Amazónicos y Piscicultura**

**II COLOQUIO DE LA RED DE INVESTIGACIÓN SOBRE LA ICTIOFAUNA  
AMAZÓNICA  
(RIIA)**

<http://www.riiaamazonia.org>

28-30 de Octubre 2009 - Manaus (Brasil)

Coloquio financiado por el IRD, el INPA y el IIAP con la participación de la Cooperación Francesa Regional para los países Andinos.



Institut de recherche  
pour le développement



Institut de Recherche pour le Développement – IRD, 44 boulevard de  
Dunkerque, CS 90009  
F-13572 Marseille Cedex 02, France. <http://www.ird.fr>

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Av. André Araújo,  
2936, 69060-001 Manaus (Brasil). <http://www.inpa.gov.br>

Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana – IIAP, Av Abelardo  
Quiñones Km. 2.5 Iquitos – Perú. <http://www.iiap.org.pe>

Cita bibliográfica:

Jesús Núñez, Fred Chu-Koo, Jorge Porto & Carmen R. García-Dávila, (editores)  
(2011). Biología de las Poblaciones de Peces Amazónicos y Piscicultura.  
Comunicaciones del Segundo Coloquio Internacional de la Red de  
Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica (RIIA), Manaus, Brasil. 201 p.

© IRD – Lima, Agosto 2011  
Institut de Recherche pour le Développement  
357 Calle Teruel, Miraflores, Lima 18, Perú.

Editores:

Jesús Núñez Rodríguez, Fred Chu Koo,  
Jorge Rebelo Porto & Carmen R. García Dávila

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2011-11428  
ISBN: 978-612-46077-0-7

Impresión: *Punto & Grafía S.A.C.* Av. Del Rio 113, Pueblo Libre T: 332-2328

## Contenido

### GENÉTICA Y EVOLUCIÓN

#### **BIODIVERSIDAD Y EVOLUCIÓN DE LOS PECES EN AMAZONÍA ..... 11**

Jean-François Renno, Fernando Carvajal-Vallejos, Juan Pablo Torrico, Fabrice Duponchelle, Jesus Nuñez, Carmen García-Dávila, Susana Sirvas, François Bonhomme, Erick Desmarais & Nicolas Hubert

#### **EVIDÊNCIA DE LINHAGENS GENÉTICAS DISTINTAS EM *Nannostomus eques* (LEBIASINIDAE), *Carnegiella strigata* E *C. marthae* (GASTEROPELECIDAE) DA BACIA DO RIO NEGRO-AM ..... 21**

Maria Leandra Terencio, Carlos Henrique Schneider & Jorge Ivan Rebelo Porto

#### **POLIMORFISMO MOLECULAR DE LA VARIACIÓN DE LA LONGITUD DE LOS INTRONES (EPIC-PCR) EN *Apistogramma sp.*, PECES ORNAMENTALES DE LA AMAZONÍA PERUANA ..... 29**

Susana Sirvas, Evelyn Briceño, Betty Gamero, Jesús Nuñez, Fabrice Duponchelle, Catalina Díaz & Jean François Renno

#### **VARIABILIDADE GENÉTICA DO GÊNERO *Brachyplatystoma* NA AMAZÔNIA. .... 37**

K. Formiga-Aquino, J. S. Batista, G. C. M. P. Huergo, S. R. Brígida-Ferreira, F. C. Rodrigues & J. A. Alves-Gomes

#### **FILFOGENIA MOLECULAR DEL GENERO *Pseudoplatystoma* (BLEEKER, 1862): IMPLICACIONES BIOGEOGRÁFICAS Y EVOLUTIVAS ..... 47**

J.P. Torrico; N. Hubert, E. Desmarais, F. Duponchelle, J. Nuñez-Rodríguez, J. Montoya-Burgos, C. García-Dávila, F.M. Carvajal-Vallejos, A.A. Grajales, F. Bonhomme & J.F. Renno

#### **VARIACIÓN HAPLOTÍPICA (DNAMT) DEL DORADO -*Brachyplatystoma rousseauxii* - EN EL ALTO MADERA, BOLIVIA..... 53**

Fernando M. Carvajal-Vallejos, Fabrice Duponchelle, Juan Pablo Torrico, Jesús Nuñez Rodríguez, Carmen García-Dávila, Sophie Quérouil, Susana Sirvas & Jean-François Renno

#### **AVANCES DEL USO DEL “BARCODING” EN LA IDENTIFICACIÓN DE LARVAS DE BAGRES (SILURIFORMES) EN LA AMAZONIA PERUANA ..... 61**

Carmen García-Dávila, Werner Chofa-Macuyama, Diana Castro-Ruiz, Gian-Carlo Vásquez, Mike Corazón, Juan García, Fernando Carvajal, Homero Sánchez, Fabrice Duponchelle, Jesús Núñez, Fred Chu-Koo & Jean-François Renno



## **BIOLOGÍA - ECOLOGÍA**

### **ESTRATÉGIAS DE VIDA E CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES DE PEIXES NA AMAZÔNIA CENTRAL ..... 73**

Nidia Noemi Fabré & Vandick da Silva Batista

### **PADRÃO DE VARIAÇÃO TEMPORAL DE PARÂMETROS REPRODUTIVOS DA ASSEMBLÉIA DE PEIXES DA AMAZÔNIA CENTRAL ..... 81**

Sidínea Amadio & Jansen Zuanon

### **CICLO DE VIDA, MERCADO EM REDE E CONSERVAÇÃO DOS GRANDES BAGRES MIGRADORES DA AMAZÔNIA NO RIO SOLIMÕES, BRASIL ..... 87**

André de Oliveira Moraes & José A. Alves-Gomes

### **SOBREEXPLORACIÓN PESQUERA DEL DORADO EN LA AMAZONÍA PERUANA ..... 93**

Fabrice Duponchelle, Aurea García, Fernando Carvajal, Jesus, Nuñez, Salvador Tello, Fred-Chu-Koo & Jean-François Renno

### **CONTEXTO DE LA PESCA TRANSFRONTERIZA DE LOS BAGRES EN LA REGION SUR-ORIENTAL DE LA AMAZONIA COLOMBIANA ..... 101**

Edwin Agudelo Córdoba & Juan Carlos Alonso González

### **UMA ABORDAGEM EVOLUTIVA SOBRE A ATIVIDADE ESPONTÂNEA DA DESCARGA DO ÓRGÃO ELÉTRICO DE *Microsternarchus* (GYMNOTIFORMES: HYPOPOMIDAE) ..... 117**

A. Nogueira & J.A. Alves-Gomes

### **UTILIZAÇÃO DE *Microsternarchus bilineatus* COMO BIOMONITOR: O EFEITO DE COMBUSTÍVEIS AUTOMOTIVOS DERIVADOS DO PETRÓLEO NA DESCARGA DO ÓRGÃO ELÉTRICO ..... 125**

Diana José dos Santos Ferreira & José Antônio Alves-Gomes

### **IMPACTS OF PHENANTHRENE ON TAMBAQUÍ *Colossoma macropomum*: LC<sub>50</sub>, GROWTH AND HEMATOLOGY ..... 131**

Carlos Chávez V. & Adalberto Val

## **PISCICULTURA**

### **PISCICULTURA AMAZÓNICA: POTENCIALIDADES E DESAFIOS PARA O DESENVOLVIMENTO EM REDE..... 137**

Evoy Zaniboni-Filho

### **AVANCES EN EL SEXAJE DEL PAICHE O PIRARUCU..... 143**

Jesús Núñez, Rémi Dugué, Miriam Alván-Aguilar, Fabrice Duponchelle, Jean François Renno, Carlos Chávez & Fred Chu-Koo

### **CRECIMIENTO, CONVERSIÓN ALIMENTICIA Y SOBREVIVENCIA DE PACO (*Piaractus brachypomus*) CULTIVADO EN ESTANQUES CON Y SIN REVESTIMIENTO DE GEOMEMBRANAS EN LA AMAZONÍA PERUANA ..... 151**

Astrid Dañino Pérez, Omar Nash Ramírez, Fred Chu-Koo & Luis Mori-Pinedo

### **RENDIMIENTO PRODUCTIVO DE LA GAMITANA (*Colossoma macropomum*) CULTIVADA EN ESTANQUES CON Y SIN REVESTIMIENTO DE GEOMEMBRANAS EN LA AMAZONÍA PERUANA ..... 159**

Astrid Dañino Pérez, Omar Nash Ramírez, Fred Chu-Koo

### **ZUNGARO TIGRINUS *Brachyplatystoma tigrinum* (Britsky, 1981): NOTAS SOBRE SU CULTIVO EN EL IIAP ..... 167**

Carlos Chávez V., Fernando Alcántara B., Germán Murrieta M., Teddy Barbarán R., Alfonso Bernuy R., Fred Chu K., Homero Sánchez R., Salvador Tello M. & Jesús Núñez R.

### **CARACTERIZACIÓN DE UN ALIMENTO TIPO PARA *Apistogramma* sp. .... 175**

Catalina Díaz, Jesús Núñez, Fabrice Duponchelle, Jean-François Renno & Susana Sirvas

### **AVANCES DE LA PISCICULTURA CON ESPECIES AMAZÓNICAS EN BOLIVIA Y LA DISYUNTIVA DE INCORPORAR HÍBRIDOS..... 181**

Hernán Navil Corcuy Arana

### **TECNOLOGIA DO PESCADO APLICADA À VALORIZAÇÃO DA PRODUÇÃO PESQUEIRA DO ESTADO DO AMAZONAS ..... 189**

Nilson Luiz de Aguiar Carvalho & Maria Auxiliadora Fonseca Carvalho