

Universidad Mayor de San Andrés

**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO**



“VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Pseudoplatystoma fasciatum* Y *Pseudoplatystoma tigrinum* EN EL ALTO MADERA DE LA AMAZONÍA BOLIVIANA POR ANÁLISIS COMPARATIVO DEL POLIMORFISMO DE LONGITUD DE SECUENCIA DE INTRONES (EPIC-PCR) Y ELECTROFORESIS ENZIMÁTICA”

Tutor: Dr. Jean Francois Rennó

Programa Interacción Genoma Población y Medio Ambiente de los peces de la Amazonía boliviana IBMB-IRD

Postulante: Julia Barreta Pinto

Tesis de Post-Grado para optar el Título de Magíster Scientiarum en Ciencias Biológicas y Biomédicas en la Mención de Genética de Poblaciones

**La Paz – Bolivia
2005**

DEDICATORIA

A mi familia por todos los valores que me han sido enseñados y por su invaluable apoyo en cada momento de mi vida.....

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parte del Proyecto "Interacción Genoma Población y Medio Ambiente de peces de la Amazonía boliviana" del Institut de Recherche pour le Développement (IRD), dirigido por el Dr. Jean Francois Rennó, tutor del presente trabajo cuyas enseñanzas, apoyo y orientación fueron determinantes para la ejecución del mismo, para quién van mis agradecimientos más profundos.

Agradezco al Dr. Jesus Núñez investigador del IRD y a Nicolás Hubert por toda la colaboración que me brindaron.

A la Dra. Volga Iñiguez, Directora del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología que junto a la Unidad de Biología Evolutiva brindaron su apoyo y experiencia en la realización de este trabajo, y del Proyecto en general.

Al Dr. Manuel Ruíz, Dr. Paul Van Damme y Dra. Carmen Dávila, tribunales externos que aceptaron con mucho agrado ser mis revisores, por sus sugerencias y evaluación del presente trabajo.

A mis compañeros de la Unidad de Biología Evolutiva, a Juan Choquecallata de la Universidad Técnica del Beni por su participación en la parte técnica de este trabajo. Al MSc. Rolando Sánchez, Lic. Juan Pablo Torrico, Lic. Rosario Rivera, Lic. Claudia Aliaga y Rosenka Tejerina que de una u otra manera colaboraron en la ejecución de este trabajo.

Asimismo agradecer a mis compañeros del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología: al Lic. Nataniel Mamani, a Rosalia Mamani, Samantha Sánchez, Oscar Condori, Luis Miguel Guachalla, Claudia Rodas, José Sandoval, Shirley Aramayo, Ana Encinas, Don Natalio Medrano por su aliento y compañía permanentes.

Finalmente, y en especial a toda mi familia: a mis papás Francisco y Guadalupe por su paciencia, y por haberme dado la educación y formación que gracias a ellos tengo, a mis hermanos Bertha, Lidia, Saúl, Eddy, Mirka, Camila, Gabriela, Orlando's, Norma, Angela y Daniela por su apoyo moral y toda la confianza que siempre me brindaron.

RESUMEN

Este estudio trata sobre la variabilidad genética de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum*, especies de alto valor comercial de la región amazónica boliviana. Se analizaron 10 sistemas enzimáticos por electroforesis y 12 sistemas intrónicos por EPIC-PCR, obteniéndose 18 loci para los primeros, de los cuales sólo uno (10%) fue marcador diagnóstico de especie y 19 loci para intrones, donde 9 (75%) fueron marcadores de especie. Por ambos marcadores, éstas dos especies fueron diferenciadas genéticamente. El análisis de F_{st} (0.56 a $p < 5\%$) indica un nivel significativo de diferenciación interespecífica. Los valores de polimorfismo y heterocigosidad genética encontrados en *P. fasciatum* y *P. tigrinum* por isoenzimas, fueron de $P(0.95)=0.67$ y $H=0.13$ y $P(0.95)=0.67$ y $H=0.20$, respectivamente. Por intrones, los mismos parámetros fueron relativamente superiores. Todos estos valores son considerados elevados respecto a otros estudios sobre las mismas especies, debido probablemente a los sistemas enzimáticos utilizados y/o la historia evolutiva de estas especies en la cuenca amazónica boliviana. Respecto a la variabilidad genética en cada cuenca, para *P. tigrinum*, el valor de F_{st} muestra una diferencia significativa para las poblaciones del Manuripi, representado una subcuenca particular respecto a las demás cuencas (Mamoré e Iténez). La causa de esta estructuración puede ser la calidad de agua que proporciona un ecosistema particular en la Cuenca del Manuripi, sin embargo, los fenómenos paleoecológicos también pueden explicar su origen. El análisis genético intracuenca en *P. tigrinum*, demostró la conformación de dos clusters en el río San Joaquín ($F_{st} = 0,39$) lo que supone un probable proceso de estructuración genética incipiente en relación con los rasgos de vida (comportamiento migratorio, estructuras familiares). Respecto a la información por intrones se observó una mayor variabilidad genética intraespecie en relación a las isoenzimas; pero sin estructuración genética. Este estudio coadyuva la comprensión de los mecanismos evolutivos de estas especies en la Amazonía boliviana; asimismo, sirve como una guía para la bioconservación, el manejo de la pesca y la elección de cepas para la acuicultura.

ABSTRACT

This study is about the genetic variability of *P. fasciatum* and *P. tigrinum*, both considered as the most important fishing resources from bolivian amazonic region. Analysis of 10 enzymatic systems by electrophoresis and 12 intronic systems by EPIC-PCR, obtaining revealed 18 loci enzymatics of which only one (10%) was the diagnosis marker of species and 19 loci intronics, where 9 (75%) were species markers. In both markers, these 2 species were genetically differentiated. The F_{st} analysis (0.56 to $p < 5\%$) indicates a significant range of interspecific differentiation. The polymorphism and genetic heterocigosity values found in *P. fasciatum* and *P. tigrinum* were $P(0.95) = 0.07$ and $H = 0.13$ and $P(0.95) = 0.67$ and $H = 0.20$ respectively. By introns, same values were more high. This values are considered high respect other studies about same species, because the enzymatic system and/or the evolutive history of these species in the bolivian amazonic river basin. About the genetic variability in each river basin for *P. tigrinum* the F_{st} value showed a significant difference for Manuripi populations, representing a river basin particular of the rest of Mamoré and Iténez. The water quality differences indicate a particular ecosystem in Manuripi and it can be the cause present of this type of structuration, however, the paleoecologist phenomenon can explain its origin. The intra river basin genetic analysis demonstrated the conformation of 2 clusters in San Joaquin river ($F_{st} = 0.39$) which supposed a genetic structuration process related with life features (migratory behavior, familiar structures). About the information by introns, it was observed a bigger intraspecies variability between isoenzymes but a lack of genetic structuration. This study allows the understanding of evolutionary mechanisms in bolivian Amazonia, also, it has application as a guide for bioconservation, the fishing managment and the strain selection for aquiculture.

Key words: EPIC-PCR, *P. fasciatum*, *P. tigrinum*, variabilty genetic, polimorphism

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
III. OBJETIVOS	3
III.1 OBJETIVO GENERAL	3
III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
IV. HIPÓTESIS.....	3
V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
V.1 HISTORIA DE LA AMAZONÍA	4
V.1.1 <i>Paleoarcos del terciario</i>	4
V.1.2 <i>Refugios cuaternarios</i>	4
V.1.3 <i>Ríos barreras</i>	5
V.1.4 <i>Especiación simpátrica</i>	5
V.2 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ÁREA GEOGRÁFICA DE ESTUDIO	5
V.2.1 <i>Dinámica de las zonas húmedas en la cuenca amazónica boliviana</i>	7
V.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA FAMILIA PIMELODIDAE	8
V.3.1 <i>Descripción general del género Pseudoplatystoma</i>	10
V.4 GENÉTICA EVOLUTIVA	15
V.4.1 <i>Estructura genética de poblaciones</i>	16
V.5 EL ADN NUCLEAR EN LA BIOLOGÍA EVOLUTIVA	18
V.5.1 <i>Electroforesis enzimática</i>	19
V.5.2 <i>Análisis por EPIC-PCR</i>	21
VI. METODOLOGÍA.....	23
VI.1 LOCALIZACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO	23
VI.2 ESPECIES EN ESTUDIO Y NÚMERO DE MUESTRAS	24
VI.3 TÉCNICAS MOLECULARES.....	26
VI.3.1 <i>Electroforesis de Isoenzimas</i>	26
VI.3.2 <i>Interpretación de los zimogramas</i>	27
VI.3.3 <i>EPIC-PCR (Exon Primed Intron Crossing Polymerization Chain Reaction)</i> ...	28
VI.4 ANÁLISIS DE DATOS	29
VI.4.1 <i>Estimación de los niveles de variabilidad genética</i>	29
VI.4.2 <i>Análisis del equilibrio Hardy - Weinberg</i>	30
VI.4.3 <i>Diferenciación entre poblaciones</i>	31
VI.4.4 <i>Flujo génico</i>	32
VI.4.5 <i>Distancia genética</i>	32
VI.4.6 <i>Análisis factorial de correspondencia</i>	32
VI.4.7 <i>Asignamiento Poblacional</i>	33
VII. RESULTADOS.....	34

VII.1 RESULTADO DE LOS DATOS ELECTROFORÉTICOS Y PERFILES INTRÓNICOS OBTENIDO	34
¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
VII.2 DIFERENCIACIÓN INTER-ESPECÍFICA ENTRE <i>PSEUDOPLATYSTOMA FASCIATUM</i> Y <i>PSEUDOPLATYSTOMA TIGRINUM</i>	34
VII.2.1 Comparación de la variabilidad genética entre especies.....	34
VII.2.2 Diferencia a la panmixia (F_{it}):	38
VII.2.3 Diferencia Inter-sitios (F_{st}):.....	38
VII.2.4 Análisis factorial de correspondencia	38
VII.3 POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO <i>PSEUDOPLATYSTOMA FASCIATUM</i>	39
VII.3.1 Variabilidad genética.....	39
VII.3.2 Diferencia a la panmixia.....	42
VII.3.3 Diferencia Inter-sitios.....	42
VII.3.4 Distancia genética entre sitios y flujo génico	43
VII.3.5 Análisis factorial de correspondencia	43
VII.3.6 Distribución de individuos entre los clusters definido por Asignamiento Poblacional para <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	45
VII.4 POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO: <i>PSEUDOPLATYSTOMA TIGRINUM</i>	47
VII.4.1 Variabilidad genética.....	47
VII.4.2 Diferencia a la panmixia.....	50
VII.4.3 Diferencia Inter-sitios.....	50
VII.4.4 Distancia genética entre sitios y flujo génico	51
VII.4.5 Análisis factorial de correspondencia	51
VII.4.6 Distribución de individuos entre los clusters definido por Asignamiento Poblacional en <i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	52
VII.5 POLIMORFISMO INTRACUENCA: CUENCA DEL ITÉNEZ: RÍO SAN JOAQUÍN (<i>PSEUDOPLATYSTOMA TIGRINUM</i>).....	54
VII.5.1 Variabilidad genética.....	54
VII.5.2 Diferencia a la panmixia.....	55
VII.5.3 Diferencia Intra-sitios.....	55
VII.5.4 Distancia genética entre sitios y flujo génico	56
VII.5.5 Análisis factorial de correspondencia	56
VIII. DISCUSIÓN.....	57
VIII.1 VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE ESPECIES	57
VIII.2 VARIABILIDAD GENÉTICA EN CADA ESPECIE.....	58
VIII.3 VARIABILIDAD GENÉTICA INTRACUENCA	59
IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	61
X. BIBLIOGRAFÍA.....	62
XI. ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Número y ubicación de las muestras utilizadas para el análisis por isoenzimas e intrones	25
Tabla 2.	Sistemas enzimáticos. Lista de enzimas analizadas, número de enzima (EC), Tejido estudiado y Sistema de Tampón usado	27
Tabla 3.	Número y secuencia de primers utilizados en el análisis por EPIC-PCR	28
Tabla 4.	Frecuencias alélicas observadas para cada especie (Isoenzimas)	36
Tabla 5.	Variabilidad genética en dos poblaciones de <i>Pseudoplatystoma</i> (Isoenzimas)	37
Tabla 6.	Frecuencias alélicas observadas para cada especie (Intrones)	37
Tabla 7.	Variabilidad genética en dos poblaciones de <i>Pseudoplatystoma</i> (Intrones)	38
Tabla 8.	Resumen de los datos interespecie obtenidos por isoenzimas e intrones.....	38
Tabla 9.	Frecuencias alélicas para 3 poblaciones de <i>P. fasciatum</i> (Isoenzimas)	40
Tabla 10.	Variabilidad genética de 3 poblaciones de <i>P. fasciatum</i> (Isoenzimas)	41
Tabla 11.	Frecuencias alélicas para 6 poblaciones de <i>P. fasciatum</i> (Intrones)	41
Tabla 12.	Variabilidad genética de 6 poblaciones de <i>P. fasciatum</i> (Intrones)	42
Tabla 13.	Estimación del F_{st} para las 3 poblaciones (Isoenzimas).....	42
Tabla 14.	Estimación del F_{st} para las 6 poblaciones (Intrones).....	43
Tabla 15.	Frecuencias alélicas para 3 poblaciones de <i>P. tigrinum</i> (Isoenzimas)	48
Tabla 16.	Variabilidad genética de 3 poblaciones de <i>P. tigrinum</i> (Isoenzimas).....	48
Tabla 17.	Frecuencias alélicas para 5 poblaciones de <i>P. tigrinum</i> (Intrones).....	49
Tabla 18.	Variabilidad genética de 5 poblaciones de <i>P. tigrinum</i> (Intrones).....	50
Tabla 19.	Cálculo del F_{st} para tres poblaciones de <i>P. tigrinum</i> (Isoenzimas).....	50
Tabla 20.	Cálculo del F_{st} para 5 poblaciones de <i>P. tigrinum</i> (Intrones).....	51
Tabla 21.	Frecuencias alélicas para cada grupo	55
Tabla 22.	Variabilidad genética de los dos grupos.....	55
Fig. 1.	Mapa de los principales ríos de la cuenca amazónica boliviana.....	23
Fig. 2.	Análisis Factorial de Correspondencia para los individuos de dos especies de Pimelodidae.....	39

Fig. 3.	Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) por Isoenzimas de poblaciones pertenecientes a tres cuencas para <i>P. fasciatum</i>	44
Fig. 4.	Análisis gráfico del AFC de poblaciones por intrones pertenecientes a cuatro cuencas para <i>P. fasciatum</i>	44
Fig. 5.	Dendograma realizado a partir de los datos de distancias genéticas para <i>P. fasciatum</i>	46
Fig. 6.	Análisis gráfico del AFC de poblaciones pertenecientes a tres cuencas para <i>P. tigrinum</i> por obtenido isoenzimas.....	51
Fig. 7.	Análisis gráfico del AFC de poblaciones pertenecientes a cuatro cuencas para <i>P. tigrinum</i> obtenido por intrones.....	52
Fig. 8.	Dendograma realizado a partir de las distancias genéticas para <i>P. tigrinum</i>	53
Fig. 9.	Análisis Factorial de Correspondencia distingue a dos clusters genéticos	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Técnica de electroforesis enzimática en geles de almidón.....	73
Anexo 2	Preparación del Buffer para electrodo y gel.....	76
Anexo 3	Preparación de los sistemas enzimáticos: Tinción y Revelado	78
Anexo 4	Preparación de las soluciones para Revelado.....	79
Anexo 5	Preparado de solución de extracción con CTAB	80
Anexo 6	Condiciones de reacción para cada PCR.....	82
Anexo 7	Condiciones de alineamiento	84
Anexo 8	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	85
Anexo 9	Condiciones de migración en PAGE.....	86
Anexo 10	Revelado del gel. Tinción Rabat	86
Anexo 11	Representación esquemática de patrones electroforéticos obtenidos por isoenzimas e intrones	88

I. INTRODUCCIÓN

La amplia diversidad biológica observada en la región del Amazonas ha llevado a generar varias hipótesis que intentan explicar este fenómeno, entre éstas la biogeografía explica de manera parcial la diversidad piscícola por la extensión territorial del Amazonas – 2,5 millones de millas que representa el 30 % de la superficie de Sudamérica – (Bernachtez & Wilson, 1998).

La diversidad biológica de los peces de la amazonía boliviana constituye un considerable potencial para la acuicultura de la región, puesto que algunas especies son de alto valor comercial. Dentro de estas especies *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) y *Pseudoplatystoma tigrinum* (Valenciennes, 1840) son consideradas económicamente importantes. Estas especies pertenecen a la familia Pimciodidae que es la más grande y diversa dentro de los Siluriformes (Lauzanne, 1997).

Así, por mecanismos alopátricos, es decir por accidentes geográficos o varias fragmentaciones consecutivas del bosque tropical hace más de dos millones de años y que continuaron a través del Pleistoceno, seguidas de contactos secundarios habrían dado lugar a la flora y fauna a una especiación y desarrollo de diferencias genéticas conseguidas por la adaptación a las condiciones locales. La diversidad genética que surge por mutación, o por deriva genética al azar, queda reflejada en la presencia de nuevos alelos, cambios en las frecuencias alélicas o por la presencia de nuevas ordenaciones cromosómicas. Finalmente se alcanza un punto en el cual las poblaciones tienen suficientes diferencias genéticas como para que puedan identificarse como razas distintas o semiespecies. Este proceso puede continuar hasta que se formen dos o más especies (Cummings, 1997).

De acuerdo a esto el estudio de estas especies requiere un conocimiento previo de su biología y en particular de su genética. De esta manera, este trabajo intenta aportar conocimientos acerca de la estructuración genética, interacción y flujo génico para determinar si estas especies constituyen una sola población distribuida a lo largo de la cuenca, o si están estructuradas como poblaciones genéticamente distintas.

II. ANTECEDENTES

La estructura genética de las poblaciones puede ser analizada por dos tipos de marcadores: los de origen nuclear y los de origen mitocondrial. Muchos genes nucleares codifican proteínas enzimáticas que en su gran mayoría son polimórficas dando evidencia de la variación génica para identificar la estructura poblacional (Ayala *et al*, 1983). Los marcadores nucleares dan una información bipaternal que permiten analizar eficientemente los cruzamientos intrapoblacionales y las hibridaciones interespecie para verificar la panmixia (Gazel, 1999).

Los marcadores mitocondriales proporcionan información de transmisión a través de la vía materna. El ADN mitocondrial presenta una tasa de evolución mayor que los marcadores nucleares. El polimorfismo del ADN mitocondrial permite el análisis de eventos de colonización, siendo además un buen marcador de diferenciación genética para analizar las relaciones filogenéticas intraespecíficas (Gazel, 1999), así como flujos migratorios. En estudios anteriores se observaron diferenciación de especie entre *P. fasciatum* y *P. tigrinum* y baja diferenciación intraespecífica en *P. fasciatum*, información obtenida por marcadores nucleares en determinados ríos del Amazonas – Ichilo y Beni – (Coronel, 2000). Asimismo, por marcadores mitocondriales en individuos de todas las cuencas del Amazonas se observó una clara diferenciación genética entre las poblaciones de *P. tigrinum* y *P. fasciatum* y dentro de cada especie la topología concensus del árbol filogenético fue débil (Rivera, 2002). Sin embargo, la forma más directa para estimar la variación y estructura genética es comparar las regiones nucleotídicas de los genes que llevan los individuos de una población (información poco conocida), es decir utilizar marcadores nucleares.

En el presente trabajo se trata de determinar la variabilidad genética en relación a los determinantes ambientales que condujeron a la estructuración genética actual de estas dos especies de alto interés comercial como el surubí (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y la chuncuina (*Pseudoplatystoma tigrinum*) utilizando dos descriptores moleculares.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo General

- Evaluar y comparar la variabilidad genética de las poblaciones de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* de la Cuenca amazónica boliviana a través de dos descriptores moleculares: isoenzimas e intrones.

III.2 Objetivos Específicos

- Conocer la estructuración genética de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum*.
- Comparar la información obtenida por electroforesis enzimática e intrones.
- Establecer las hipótesis que expliquen la estructura genética evidentes por los análisis filogeográficos.
- Determinar el flujo génico entre las poblaciones hacia una panmixia.
- Investigar los eventuales híbridos interespecíficos.
- Determinar las entidades de reproducción en las poblaciones genéticas.
- Deducir los factores paleoecológicos que influyen en la estructuración intraspecífica.

IV. HIPÓTESIS

Las especies estudiadas presentan una estructuración genética en relación con la distribución geográfica de las poblaciones.

V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

V.1 Historia de la Amazonía

La amazonía se constituye en uno de los medios más ricos en cuanto a diversidad piscícola se refiere, con 7 millones de metros de longitud es el mayor sistema hidrográfico (Lundberg, 2001), contiene las dos terceras partes del agua dulce disponible. Entre las principales hipótesis que fueron emitidas para explicar esta gran diversidad están las siguientes:

V.1.1 Palcoarcos del terciario

Según esta teoría el fenómeno de especiación se debería a las modificaciones geomorfológicas que existieron durante la era terciaria (Patton, 1997). Debido al levantamiento de la Cordillera de los Andes en el Terciario se produjo la formación de relieves en forma de arco en la Cuenca Amazónica que modificaron los sistemas de los ríos originando una especiación alopátrica. La Amazonía boliviana fue aislada por paleoarcos (Lundberg, 1998), lo que puede explicar en gran parte su ictiofauna particular pero no su estructuración interna.

V.1.2 Refugios cuaternarios

Esta teoría de refugios forestales cuaternarios (Haffer, 1982), explica de alguna manera la gran diversidad de las especies en los ecosistemas tropicales por las fluctuaciones climáticas del cuaternario (alternancia de periodos glaciales e interglaciales). Las poblaciones dependientes de bosques tropicales llegaron a ser aisladas a partir de su primer hábitat fragmentado durante el máximo glacial (época seca en la zona tropical). Estas zonas de bosques habrían constituido los diferentes refugios para las especies causando así su división en poblaciones. Dicho aislamiento es un mecanismo que puede conducir a especiación, es decir, la evolución de una nueva especie. La alternancia de períodos secos y húmedos aumentaría la necesidad de los animales de desarrollar nuevas adaptaciones.

V.1.3 Ríos barreras

Propuesta por Wallace (1852), según esta hipótesis los grandes ríos amazónicos formados al principio de la era cuaternaria se constituirían en verdaderas barreras físicas, separando las poblaciones en dos ríos. Este aislamiento causa la diferenciación de las poblaciones principalmente cuando existen especies diferentes del mismo género en los afluentes de cada lado del río principal (Bush, 1994).

V.1.4 Especiación simpátrica

La especiación alopátrica de alguna manera ha explicado la formación de nuevas especies a partir de una misma especie ancestral. Sin embargo, se tienen evidencias de una especiación simpátrica en la cual nuevas especies surgen sin aislamiento geográfico. Existen modelos para explicar la especiación simpátrica: modelo por competencia sexual para el apareamiento (Almeida *et al*, 2003) y el modelo por competencia de recursos que es esencial para la adquisición de una selección disruptiva.

Cada uno de estos fenómenos coincide para explicar la gran diversidad amazónica en muchas especies de peces, por ejemplo, la teoría de los refugios fue propuesta para explicar la estructuración genética del género *Leporinos* en Guyana Francesa (Rennó, 1989, 1990). Es probable que los refugios hayan jugado un rol en la estructuración de la ictiofauna de la cuenca amazónica boliviana debido a la dependencia de las especies, los bosques tropicales para su protección, la alimentación de las larvas o de los adultos y su reproducción.

V.2 Descripción general del área geográfica de estudio

La amazonia boliviana comprende cuatro ríos de origen distinto y de caudal más o menos semejante e importantes ya sea por su navegabilidad o aprovechamiento potencial: el Madre de Dios (2.715 Km²), el río Beni (122.400 Km²), Mamoré (222.100 Km²) de origen andino y el Iténez o Guaporé (303.300 Km²) propio del escudo brasileño, los cuales se unen para formar el río Madera, afluente mayor del río Amazonas (Lauzanne, *et al*, 2000; Guyot, 1993; Bourges, 1995).

La diversidad de la amazonía boliviana se refleja en su clima, ecuatorial al norte hasta un clima tropical seco al sur con una temperatura promedio anual de 24°C. Su vegetación en bosques y pastos conservan grados de humedad según la naturaleza de los suelos, estación lluviosa en verano con precipitaciones promedio anuales desde 1800 mm para las cuencas del Beni y Mamoré y más de 2000 mm para el Madre de Dios (Bourges, 1995). Posee una variada característica geológica (precámbrica del escudo brasileño y series sedimentarias cuaternarias de la altitud) una planicie amazónica situada entre 100 y 200 m de altitud y una extensa red hidrográfica con zonas de inundación temporales que determinan la presencia de una de las faunas de peces de agua dulce más variadas de la región neotropical (Guyot, 1993; Bourges, 1995).

En Bolivia, para un sistema hidrológico de 14.197 Km², viven 340 especies ictiológicas descritas, de estas 320 viven en lagos y ríos del oriente (Montes de Oca 1997, cerca de 380 especies son referidas por Lauzanne, *et al.*, 1991). Sarmiento y Barrera, (1997) mencionan aproximadamente 550 especies para Bolivia. Considerando la poca información de las cuencas del Iténez, Pilcomayo, Beni y del Alto Paraguay se estima que el número de especies en Bolivia alcanza aproximadamente a las 600 especies.

El área de estudio para el presente trabajo de investigación comprende a dos subcuencas del departamento del Beni: Mamoré e Iténez. El río Mamoré pertenece a los sistemas “río-planicie de inundación” de aguas blancas. Se origina de la unión de tributarios que emergen de los andes y de la planicie central, fluye hacia el norte hasta la frontera con Brasil donde se une al río Beni el cual confluye al río Madera. En su recorrido, a través de la llanura beniana, su curso describe una infinidad de meandros los cuales pueden aislarse del curso principal para formar numerosas lagunas de diferente tamaño y profundidad de muy poco a medianamente transparentes conectadas a los ríos madre a través de arroyos (Navarro y Maldonado, 2002). Tiene como principales afluentes a los ríos Ichilo, Grande, Chapare, Sécure, Isiboro, Apere, Yacuma y otros de menor caudal que junto con su tributario mayor, el río Grande, atraviesa 1770 Km del territorio boliviano. Lauzanne *et al.* (1991) mencionan 329 especies en 36 familias para la cuenca del Mamoré. Navarro y Maldonado (2002) indica una lista de 273 especies para los ríos Ichilo, Mamoré Central y Yacuma-Apere.

El río Iténez o Guaporé se origina en las cumbres del Mato Grosso, fluye al noroeste a través de bosques tropicales estableciendo una frontera natural entre Bolivia y Brasil, tiene un recorrido de 1207 Km (Montes de Oca, 1997). Las llanuras Aluviales de la Hidroecoregión del Escudo Brasileño se extiende sobre las cuencas de los ríos Iténez y Paraguay así como sus afluentes principales Paraguá, San Martín, Negro y otros que forman cauces con amplios valles meandriformes y una llanura de inundación compleja donde se encuentran numerosas lagunas conocidas como “bahías” conectadas todo el año y “bahías centrales” aisladas en época seca. El Iténez es llamado río de aguas claras (Bourrel, et al., 1999) en conjunto muestran un predominio de “aguas negras” aunque no presentan características típicas de este tipo de aguas. Los ambientes lacustres no son muy desarrollados y tienen una transparencia casi total. El número de especies registradas para distintos tipos de aguas: negras, blancas y claras varía entre 97 y 115 según Navarro y Maldonado, 2002.

La red hidrográfica del departamento de Pando está conformada por los siguientes ocho ríos mayores: Madre de Dios, Beni, Tahuamanu, Manuripi, Orthón, Abuná, Madera y Acre. El Manuripi es un río de aguas negras, nace en la república del Perú, bajando en dirección suroeste-noroeste, en territorio boliviano recibe el aporte de innumerables arroyos, entre los cuales destacan el Malcón, Maniruma, Bayo, Florida, Tulupa, Supaymanu y el río Buyuyo. Juntamente con el río Tahuamanu conforman el Orthón el cual desemboca en el río Beni con una extensión de 32.260 Km². En un área de 18000 Km² (RNA Manuripi-Heath) se registraron 237 especies de las cuales 16 fueron registradas por primera vez para Bolivia (Salm & Marconi, 1992). Sarmiento et al, (1999) menciona a 354 especies para la cuenca Orthón-Madre de Dios, ya que reúne especies de las tierras bajas, del escudo brasileño y de las cabeceras fluviales. La zona más rica en especies es la del río Manuripi con más de 220 especies, las lagunas poseen una fauna similar al de los ríos por su conexión con ellos (Navarro & Maldonado, 2002).

V.2.1 Dinámica de las zonas húmedas en la cuenca amazónica boliviana

Una de las principales características de la Amazonía boliviana reside en el hecho que una gran parte de su zona central (los llanos) esta inundada durante 4 a 6 meses en una superficie de 100.000 a 150.000 Km². Según la variabilidad del ciclo hidrológico anual, ríos, lagunas, pantanos las sabanas inundadas se conectan en un sistema funcional único que

ofrecen zonas diversificadas de características ecológicas favorables para el crecimiento y desarrollo de la fauna íctica (Bourrel, *et al.*, 1999; Wasson, 2001). Los sistemas palustres (pantanos, curichis, yomomos) y la amplia llanura de inundación durante el periodo de lluvias son formaciones de gran importancia por la superficie que ocupan y su papel en la dinámica hídrica local (Sarmiento, 2000). La importancia de conocer los procesos que se desarrollan en estos ecosistemas acuáticos y las complejas relaciones de los ciclos de las aguas altas (época de inundación) y bajas (época seca) determinan variaciones en los sistemas tróficos, por tanto, en la distribución y composición de las especies (Corvin & Guyot, 1988).

En Bolivia la estación lluviosa es en verano, un total de 60 a 80% de las precipitaciones se presentan durante los cuatro meses más lluviosos de diciembre a marzo (Montes de Oca, 1997). La región de los llanos húmedos amazónicos comprende gran parte de las llanuras benianas y se halla sujeta a dos fenómenos claramente diferenciables, una época seca y otra de inundaciones. El ciclo hidrológico es bastante sencillo, se puede observar claramente la sucesión entre una época de inundación, las abundantes lluvias del verano causan la formación de meandros por los ríos que se desbordan e inundan la planicie con un máximo en febrero-marzo y una época de estiaje con un mínimo en agosto-septiembre (Pouilly, 1999). En el Mamoré, las inundaciones ocurren entre noviembre y junio con períodos y frecuencias variables (90-199 días). Durante este periodo, una amplia superficie de los bosques ribereños queda cubierta por el agua y muchas especies ocupan temporalmente este tipo de sistemas como áreas de alimentación o de refugio. La estacionalidad también determina la condición física de los peces: un rápido engorde durante las aguas altas y reducción de grasa durante el descenso de las aguas, prolongándose hasta la mitad de la crecida siguiente (Loubens & Panfili, 1997). Como consecuencia de estos ciclos, se presenta marcas en los otolitos y vértebras que pueden ser usadas para determinar la edad. Especies predatoras como *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* utilizan estacionalmente los bosques inundables como áreas de alimentación.

V.3 Características generales de la familia Pimelodidae

La fauna íctica de la Amazonía boliviana consta de 153 especies de Siluriformes constituyendo un 39.5% del conjunto de peces (Loubens & Panfili, 2000). Las diferentes especies que componen este orden, se distribuyen desde las zonas más bajas hasta los 3.000 m

de altitud (Sarmiento & Barrera, 1997). La familia Pimelodidae agrupa cerca de 300 especies reunidas en más de 50 géneros repartidos en tres subfamilias: Pimelodinae, Pseudopimelodinae y Rhamdiinae (Le Bail, *et al.*, 2000). La clave describe 15 géneros de las 30 especies halladas en la cuenca del Mamoré (Lauzanne & Loubens 1985).

A pesar de la semejanza superficial de los Pimelodidae con los Bagridae de África y Asia, ambas familias se las considera polifiléticas (Lowe-McConnell, 1987). Los Pimelodidos corresponden a niveles tróficos altos en su mayoría predadores, ictiófagos y omnívoros. Su alimentación se compone predominantemente de cardúmenes de carácidos (Dahl, 1971). Una de las características más llamativas de las especies comerciales de pimelodidos es su enorme tamaño, razón por la cual se les denomina “grandes bagres” (Reid, 1983; Sánchez, *et al.*, 1998). Las tallas, en algunos casos, llegan a sobrepasar los dos metros, la longitud estándar está relacionada con los estados reproductivos y es diferente para hembras y machos, siendo ellas las que mayores tallas alcanzan (Le Bail, *et al.*, 2000).

Las tres especies de este género: *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudoplatystoma tigrinum* y *Pseudoplatystoma coruscans* se distribuyen en la mayor parte de Sudamérica tropical y subtropical, donde se distinguen por su gran tamaño y valor comercial (Reid, 1983; Loubens & Panfili, 2000). En Bolivia, el surubí (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y la chuncuina (*Pseudoplatystoma tigrinum*) son dos especies comunes y comercialmente importantes, clasificado como “clase A” por la Misión Británica (Lauzane & Loubens, 1985). Ambas especies genéticamente son distintas y presumiblemente diferenciadas en el Plioceno, al borde del Pleistoceno (Coronel, 2000).

V.3.1 Descripción general del género *Pseudoplatystoma*

V.3.1.1 Sistemática y biología de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum*

V.3.1.1.1 Sistemática

Según descripciones de Lauzanne y Loubens en 1985 basada en trabajos realizados por Norman y revisado por Greenwood (1975) se clasifica de la siguiente manera:

Superclase:	Gnathostomata, peces con mandíbula.
Clase:	Teleostomi, peces con mandíbula completa, verdadero hueso en el esqueleto y presencia de vejiga natatoria.
Subclase:	Actinopterygil, incluye la totalidad de los peces actuales, aletas con radios.
Grupo:	Teleostei Euteletoei
Superorden:	Ostariophysi, incluye a la gran mayoría de los peces de agua dulce.
Orden:	Siluriformes
Familia:	Pimelodidae
Género:	<i>Pseudoplatystoma</i>
Especie:	<i>fasciatum</i> <i>tigrinum</i>

V.3.1.1.2 Morfología

Los *Pseudoplatystoma* se caracterizan por tener el cuerpo cubierto por una piel desnuda y lisa, presencia de tres pares de barbillones alrededor de la boca (un par maxilar y dos pares mentonianos), maxilar inferior más corta que el maxilar superior, dientes (villiformes) pequeños y curvos agrupados en fajas o placas semejantes a una lija en las mandíbulas (Muñoz & Van Damme, 1998; Britsk, 1999). Las narinas anteriores y posteriores son bien separadas, aletas pectorales y dorsal guarnecidas con espinas previstas de sierras muy desarrolladas cubiertas de una piel fina, las branquiespinas (<10) son a menudo rudimentarias, la aleta caudal es fuerte y lobulado (Ferreira, 1998; Le Bail, *et al.*, 2000). Si bien las características morfológicas del *P. fasciatum* y *P. tigrinum* son muy semejantes y presentan cierta confusión, la identificación es relativamente fácil, precisa y difícilmente son confundidos.

V.3.1.1.3 Alimentación

Pseudoplatystoma fasciatum y *Pseudoplatystoma tigrinum* son especies predadoras, exclusivamente ictiófagas, representando más del 99% el peso total de alimento (Reid, 1983; Lowe-McConnell, 1987; Loubens & Panfili, 2000; Salm & Marconi, 1992; Boujard *et al.*, 1998). Las presas seleccionadas por ambas especies son diversas. En los estómagos de estos “bagres” se hallaron muchas especies de importancia comercial, entre ellas: *Prochilodus nigricans*, especies de Curimatidae, Mylossomas., Anastomidae, *Colossoma duriventris*, Brycom, *P. squamosissimus*, gymnotidés, Loricaridés, especies de Siluriformes, cíclidos así como las peligrosas pirañas. Éstas especies son capaces de tragar presas que miden hasta por lo menos el 30% de su largo estándar y miembros de su mismo género. Esto indica una alimentación variada de tipo oportunista y aprovechan cualquier concentración de peces apropiados (Reid, 1983; Loubens & Panfili, 2000; Boujard *et al.*, 1998).

A partir de los 40 cm. de longitud, las dos especies tienen hábitos alimenticios ictiófagos (Loubens & Panfili, 2000). A tamaños inferiores, los camarones se encuentran en una proporción significativa en la dieta de ambas especies constituyéndose en el alimento primario para la mayoría de los juveniles de esta familia. La presencia de insectos es significativa tan solo en los juveniles menores de 10 cm y el material vegetal que comprende

en su mayoría fragmentos de hojas y detritos vegetales que parece ser capturada al azar junto con las presas, suele ser incidental (Reid, 1983). La observación del *P. fasciatum* ha demostrado que es un depredador activo, que busca su presa desplazándose y probando los alrededores con sus largas barbillas. Tienen ojos notablemente más activos que muchos de los demás bagres. Tradicionalmente se considera que los miembros del género *Pseudoplatystoma* se alimentan durante la noche. Sin embargo, se ha demostrado que *P. fasciatum* está activo y caza durante el día, especialmente en la mañana (Reid, 1983; Ferreira, 1998). Entre los bagres de esta especie cuyos contenidos estomacales estaban frescos, el 67% había sido colectado en la mañana y otro 23% a principios de la tarde. Este comportamiento es diferente al *P. tigrinum* que tiene alimentación nocturna (Reid, 1983, Le Bail, *et al.*, 2000).

V.3.1.1.4 Crecimiento

Se estima la edad individual por la observación de cortes frontales de las vértebras, estos enseñan una alternancia de anillos hialinos estrechos y de zonas opacas anchas depositándose cada uno al ritmo de un año. Los anillos hialinos se forman durante el estiaje y la crecida, se trata de un periodo de crecimiento muy débil. Las zonas opacas se forman principalmente durante la decrecida, entonces el crecimiento resulta rápido y se acompaña de un mejoramiento de la condición y de acumulación de grasa en la cavidad abdominal (Reid, 1983; Loubens & Panfili, 2000). En pescas realizadas en el río Mamoré por Lauzanne & Loubens (1985), la chuncuina registró un peso de hasta 22 Kg y el surubí no sobrepasó los 15 Kg. Las dimensiones que alcanzan estas especies en las lagunas son, en algunos casos, superiores a los registrados en los ríos (Torres, *et al.*, 1992). Se observa una clara diferencia entre los sexos de ambas especies, las hembras son más grandes que los machos. El crecimiento durante el primer año es de 29 cm para *Pseudoplatystoma fasciatum* y una longevidad de por lo menos 10 años. Para *Pseudoplatystoma tigrinum* el crecimiento durante el primer año es de 36 cm y una longevidad de unos 15 años (Loubens & Panfili, 2000). En pruebas de cría extensiva, en presencia de peces forrajeros, *P. tigrinum* revela sus fuertes potencialidades de crecimiento, 10g/día (Le Bail *et al.*, 2000).

V.3.1.1.5 Comportamiento migratorio y reproducción

Los patrones de movimiento y migración de los peces, a pesar de ser complejos y contar con insuficientes estudios, son bien conocidos por los pobladores locales. Estos movimientos están relacionados a procesos fundamentales como la alimentación, reproducción y dispersión (Sarmiento, 2000). El comienzo de la época lluviosa marca cronológicamente el inicio del desove de muchas especies y el aumento de caudal de los ríos es una señal fuerte que parece motivar el desplazamiento de muchas especies y acelerar el desarrollo gonadal. Un lento aumento del nivel de los ríos puede reducir y demorar este proceso reproductivo (Junk, *et al.*, 1997). Las migraciones de reproducción del *P. fasciatum* y *P. tigrinum* se relacionan en función de la reproducción y alimentación, se inician en septiembre y termina a principios de enero (Goulding, 1997). La mayoría de los adultos de las dos especies aparentemente realizan largos recorridos desde las zonas más bajas (ríos brasileños y bolivianos de llanura) hacia zonas de reproducción aún no conocidos río arriba (Muñoz & Van Damme, 1998), hacia las estribaciones de la zona preandina de enero a febrero durante la primera parte de las aguas altas. Tienen un desove corto y la parte que no migra queda en descanso sexual. Esta estrategia de reproducción durante las aguas altas, favorece mucho a las larvas y alevines los cuales encuentran un medio ambiente diverso y extenso proporcionándoles protección natural y buenas condiciones de alimentación (Lauzanne, *et al.*, 1990; Muñoz & Van Damme, 1998). Torres *et al.*, (1992) observaron que el periodo reproductivo del *P. fasciatum* se alarga en dos meses (enero-abril) en comparación con el Mamoré. Ambas especies se encontraron en estado de desove dentro de la laguna, determinando que sólo entran en época de subidas de agua desde el Mamoré hasta la posibilidad de salir en años posteriores. A finales de la estación seca, ambas especies pueden migrar al mismo tiempo que sus presas (Le Bail, *et al.*, 2000). Entre las dos especies los machos alcanzan la madurez sexual con más precocidad y las hembras crecen con más velocidad. Las tallas mínimas de maduración observado varían según los autores de 39 a 56 cm en machos y de 39 a 65 cm en hembras (Reyes, *et al.*, 1990; Loubens & Panfili, 2000; Le Bail, *et al.*, 2000)

V.3.1.1.6 Repartición ecológica

Las especies del género *Pseudoplatystoma* se encuentran en ambientes muy diversos: ríos grandes de aguas turbias y canales de menos de un metro de profundidad, lagunas y

planos de inundación de la selva lluviosa, aguas limpias y pedregosas del pie de monte andino, tanto en aguas corrientes como tranquilas (Reid, 1983; LoweMcConnell, 1987; Muñoz & Van Damme, 1998; Le Bail, *et al.*, 2000), pie de monte andino para el río Beni, Chapare-Ichilo (Navarro & Maldonado, 2002), aunque no son característicos de las corrientes y raudales fuertes, si pasan por ellos en tránsito. Sin embargo, las dos especies tienden a separarse por hábitat, el *P. fasciatum* suele ocupar sitios protegidos por troncos, excavaciones y vegetación acuática, mientras que *P. tigrinum* prefiere zonas arenosas menos profundas (Le Bail *et al.*, 2002), es más común sobre sustratos abiertos y limpios, playas, zonas centrales de los lagos. Se advierte dos fenómenos de repartición heterogénea durante el tiempo de aguas bajas: *P. fasciatum* prefiere los medios lóticos mientras *P. tigrinum* está difundida. Para las dos especies los machos son más abundantes en los ríos y las hembras en las lagunas. *P. fasciatum* capturado en pescas exploratorias hasta los 300 m de altitud (Villa Tunari) presenta una coloración diferente, sin embargo las incluyen como una misma población conjuntamente los individuos de la planicie (Loubens & Panfili, 2000).

V.3.1.1.7 Importancia económica

Los peces son la principal fuente de proteína en la alimentación de las poblaciones originarias y como recurso alternativo de subsistencia para colonos, migrantes y poblaciones amazónicas que en cierto grado son dependientes de los recursos pesqueros ya que representan cerca del 70% de proteína animal consumida (Ferreira, 1998). Un análisis de contenido nutritivo mostró que el pez completo contiene el 17,0% de proteína y solamente el 2,0% de grasa (Junk, 1976). Estudios realizados en el *P. coruscans* afirman que su carne blanca de agradable sabor es una importante fuente de proteínas y un alimento de un buen valor energético por su alto contenido de grasa (Molina, *et al.*, 2000).

Los Pimelodidae son una de las tres primeras familias por orden de importancia comercial, siendo las dos otras las de los Curimatidae y de los Serrasalmidac. El grupo más importante para la pesca comercial esta compuesto por: *Sorubimichthys planiceps* (Paleta) sobrepasa los 10 Kg, *Phractocephalus hemiliopterus* (General) alcanza hasta 20 kg, *Paulicea lutkeni* (Muturo, Chanana) hasta 61 kg, *Brachyplatystoma filamentosum* (Piraiba) sobrepasan los 100 kg, *Brachyplatystoma flavicans* (Saltador o Dorado de piel) alcanza 5 a 10 kg El

tándem de mayor importancia lo conforman el *Pseudoplatystoma fasciatum* (surubí) no sobrepasa los 15 Kg y *Pseudoplatystoma tigrinum* (chuncuina) alcanza un peso de hasta 22 Kg.

El porcentaje de pesca comercial es alto durante la mayor parte del año debido a la calidad de su carne alcanzando precios altos en el mercado local y nacional, no tienen espinas en la carne, son de fácil conservación y el pescado preparado para la venta pierde poco con relación al pez vivo entero (Lauzanne & Loubens, 1985). Como especies deportivas son muy populares y su pesca es sumamente emocionante por el gran tamaño y fuerza del pez (Reid, 1983). Actualmente *Pseudoplatystoma* no está explotado para piscicultura en nuestro medio, debido a la facilidad con la que se consigue en su estado natural; no obstante, es de esperarse que en el futuro sea aprovechado como pez cultivable.

V.4 Genética Evolutiva

La evolución es un hecho histórico completamente establecido, es ante todo un proceso genético, y la genética de poblaciones es la disciplina biológica que proporciona los principios teóricos de la evolución. Esta ciencia parte del supuesto de que los cambios evolutivos a pequeña escala, los que se dan dentro de las poblaciones de las especies, contienen todos los elementos necesarios para explicar la evolución, puesto que la macroevolución, o evolución a gran escala, no sería más que la extrapolación en el espacio y en el tiempo de los procesos básicos de las poblaciones. Casi todas las especies están formadas por una o más poblaciones de individuos que se cruzan entre sí, formando una comunidad de intercambio genético denominada población mendeliana. Esta población es la base donde se forja la evolución. En el seno de la población se da el hecho inevitable de que algunos individuos dejan más descendientes que otros. Como el único componente que se transmite de generación en generación es el material genético (los genes), el que un individuo deje más descendientes implica que sus genes están más representados en la siguiente generación. De este modo, las frecuencias de los distintos genes cambian de una generación a otra, y este cambio será irreversible cuando se considera el conjunto de los genes de la población, pues es muy improbable que se vuelva a una configuración previa en todos los genes. Por tanto, desde el punto de vista de la población, la evolución es en último término un cambio acumulativo e irreversible de las proporciones de las diferentes variantes de los genes, o alelos, en las poblaciones.

V.4.1 Estructura genética de poblaciones

V.4.1.1 Fuerzas de la evolución

Los agentes que cambian las frecuencias génicas de las poblaciones, o sea los factores de evolución son la deriva genética, la selección natural, la mutación y la migración.

V.4.1.1.1 Deriva genética

La deriva genética ocurre en poblaciones relativamente pequeñas donde algunos alelos pueden cambiar su frecuencia simplemente debido al azar. La mayoría de los organismos son diploides, es decir, tienen dos ejemplares de cada gen. Los gametos de estos organismos portan solo uno de las dos ejemplares (alelos) de cada gen. El que un gameto lleve un alelo u otro es una cuestión de azar, por lo que la formación de gametos y su consiguiente unión para formar los cigotos de la siguiente generación solo puede describirse como un proceso probabilístico. En cada generación esperamos una fluctuación al azar de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Si en algún momento durante esta conducta fluctuante un tipo de los alelos no llega a transmitirse a la siguiente generación, entonces este alelo se habrá perdido para siempre. El resultado de la deriva suele ser la pérdida de variabilidad genética, siendo un proceso que contrarresta la entrada de variabilidad genética por mutaciones.

V.4.1.1.2 Selección natural

La selección natural es uno de los factores de evolución. Es el proceso que permite explicar la complejidad de la evolución, las adaptaciones de los organismos, y por eso ocupa una posición central en la biología evolutiva. En esencia, la selección natural es reproducción diferencial de unas variantes genéticas respecto de otras. Podemos definirla como el proceso que resulta del cumplimiento de las tres condiciones siguientes: (1) variación fenotípica entre los individuos de una población, (2) supervivencia o reproducción diferencial asociada a la variación, y (3) herencia de la variación. Si en una población de organismos se dan estas tres condiciones, entonces se sigue necesariamente un cambio en la composición genética de la población por selección natural.

Además la selección natural explicaría las adaptaciones que son aquellas características que aumentan su frecuencia en la población por su efecto directo sobre la supervivencia o el

número de descendientes de los individuos que la llevan. La adaptación no es una propiedad invariante, absoluta, sino contingente, dependientes de cada contexto ecológico. La selección natural puede producir pequeños ajustes adaptativos como el mimetismo del melanismo industrial, pero también es capaz de crear órganos tan complejos como un ojo. Los biólogos suecos D. E. Nilsson y S. Pelger han estimado que el tiempo necesario para la evolución de un ojo como el de los vertebrados es un breve instante comparado con la magnitud del tiempo geológico.

V.4.1.1.3 Mutación

La variación es la materia prima de la evolución. Sin variación genética no es posible la evolución. La fuente última de toda variación genética es la mutación. Una mutación es un cambio estable y heredable en el material genético. Las mutaciones alteran la secuencia del ADN y por tanto introducen nuevas variantes. Muchas de estas variantes pueden ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de estas variantes pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie. La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética. La tasa de mutación de un gen o una secuencia de ADN es la frecuencia en la que se producen nuevas mutaciones en ese gen o la secuencia en cada generación. Una alta tasa de mutación implica un mayor potencial de adaptación en el caso de un cambio ambiental, pues permite explorar más variantes genéticas, aumentando la probabilidad de obtener la variante adecuada necesaria para adaptarse al ambiente. A su vez, una alta tasa de mutación aumenta el número de mutaciones perjudiciales o deletéreas de los individuos, haciéndolos menos adaptados, y aumentando la probabilidad de extinción de la especie. Las mutaciones no tienen ninguna dirección respecto a la adaptación, son como un cambio al azar. Este cambio puede producir una falta de significado, y por eso la mayoría de las mutaciones son deletéreas. Pero a veces ciertos cambios pueden introducir nuevos significados, permitiendo nuevas funciones. Cada especie tiene una tasa de mutación propia que ha sido modulada por la selección natural para que la especie pueda lograr estabilidad que le impone el ambiente.

V.4.1.1.4 Migración

El intercambio de genes entre poblaciones debido a la migración de los individuos entre poblaciones es otro factor importante de cambio genético en las poblaciones. Si dos

poblaciones difieren en las frecuencias de los alelos de alguno de sus genes, entonces el intercambio de individuos entre las poblaciones producirá un cambio de las frecuencias de los genes en cada una de las poblaciones.

V.5 El ADN nuclear en la biología evolutiva

Tradicionalmente los estudios de la ictiofauna del Amazonas a nivel genético con estudios evolutivos y de biodiversidad, han sido realizados a partir de la citogenética, continuando con la identificación de los productos finales del ADN como son las proteínas o isoenzimas, posteriormente se han utilizado marcadores moleculares como los microsatélites, PCR, RFLP, RAPD, intrones y secuenciamiento del ADN (Porto, Alves Gomes, 2002).

Los marcadores moleculares son biomoléculas que pueden relacionarse con un rasgo genético. Los marcadores genéticos pueden distinguirse en dos grupos: los basados en el análisis de proteínas (análisis enzimático) y los basados en el análisis del ADN (ADNmt, ADNr, intrones, minisatélites y microsatélites). Los marcadores proteicos son generalmente codominantes y permiten el análisis a la vez de varios loci. Los genotipos resultantes se pueden procesar como cualquier clase de datos mendelianos codominantes. Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. Los primeros marcadores desarrollados a fines de los '70 para estudiar la variación a nivel molecular se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida (Ayala, 1984; Richardson, 1987).

La información genética codificada por la secuencia de nucleótidos del ADN de un gen estructural se traduce en una secuencia de aminoácidos que forman un polipéptido. Un gen es un segmento de una de las moléculas largas de ADN de la célula que almacenan en su estructura la información genética del organismo. Las moléculas de ADN se hallan asociadas a proteínas, se encuentran empaquetadas en unos cuerpos densos denominados cromosomas, estas pueden contener muchos miles de loci génicos. Un gen en un locus determinado puede presentar formas variantes denominadas alelos. En una población grande y diploide pueden existir varios alelos en un locus, aunque solo puede haber dos en un individuo. Cuando ambos

alelos de un locus determinado son idénticos en los cromosomas homólogos de un individuo se dice que el individuo es homocigoto para dicho locus; cuando ambos alelos son distintos se dice que el individuo es heterocigoto para dicho locus (Ayala, 1984; Ridley, 1996).

Los marcadores moleculares nos dan una estimación de la diversidad genética, esto se logra a partir de cada una de las variantes (alelos). Estos permiten generar una gran cantidad de información sobre la diversidad genética de las poblaciones, detectar niveles de heterocigosidad y polimorfismo (variabilidad) existente en poblaciones naturales, relaciones inter e intrapoblacionales, taxonomía, caracterización de la estructura poblacional, análisis de distancia genéticas en estudios evolutivos, análisis de parentesco, estudio de ligamientos e identificación de híbridos. Estos estudios genéticos tienen una aplicación en manejo de programas de conservación de biodiversidad y en monitoreo de ambientes así como en programas de mejoramiento genético (Ayala, 1984; Richardson, 1987). Los datos moleculares constituyen una aproximación adecuada para determinar la estructura genética de una especie, proporcionando información sobre la distribución actual de la diversidad genética y los procesos que actúan sobre ella (flujo génico, deriva, endogamia), como sobre la historia de la población, en particular sobre los patrones geográficos y la importancia del aislamiento geográfico (Moritz, 1999).

V.5.1 Electroforesis enzimática

A partir de los años 70 se desarrollaron técnicas para estudiar la variación a nivel molecular y con ellos se abrió la posibilidad de estudiar caracteres con un control sencillo, las diferencias de movilidad en proteínas. La técnica del análisis enzimático se basa en la separación de enzimas con la misma función y que se diferencian en tamaño, carga o conformación (Rydley, 1996). El extracto proteico se obtiene por trituración del tejido en estudio y se obtiene la separación de las isoenzimas mediante la acción de un campo eléctrico que produce un desplazamiento de las proteínas en función de su carga y tamaño. De este modo se separan enzimas codificadas por genes diferentes o productos de diferentes alelos de un mismo gen. Como soporte, donde se produce dicha separación se pueden utilizar geles de poliacrilamida o de almidón, para la visualización de las enzimas se recurre al teñido histoquímico aprovechando su actividad catalítica provocando una reacción en la que intervienen el sustrato específico y un producto coloreado o fluorescente (Ayala, 1984). El

genotipo del locus génico que codifica a la enzima puede ser inferido para cada individuo a partir del número y las posiciones de las manchas observadas en los geles.

Las principales características de la electroforesis de isoenzimas, además de la cantidad de información que puede aportar, incluye simplicidad, mínima cantidad de material en estudio, bajo costo y una cobertura del genoma de 10-20 loci por especie, ausencia de epístasis e influencias ambientales. La expresión alélica es de tipo codominante, lo que permite establecer comparaciones entre especies, entre poblaciones de una misma especie, detectar la presencia de híbridos, investigar problemas de sistemática, medir los niveles de variación genética inter e intraespecíficas, estructura de poblaciones, reconstrucción filogenética, organización del genoma, mapeamiento genético (Hoelzel, 1994; Richardson, 1987; Paredes & Gepts, 1995). Entre sus desventajas, dependiendo del objetivo del estudio, presenta un reducido número de sistemas enzimáticos polimórficos, bajos niveles de polimorfismo, 10 a 20 % (Ridley, 1996), aproximadamente 30% de las variaciones genéticas no son descubiertas por esta técnica (Pasteur, et al., 1987, citado por Gazel, 1999), lo que la limita para algunos usos (análisis de parentesco, identificación de material) (Jiménez & Collada, 2000). Las proteínas siendo un producto del ADN, pueden ser afectadas cualitativa y cuantitativamente en su nivel de expresión por factores ambientales. Las isoenzimas pueden no detectar los cambios genéticos que ocurren en el ADN, además solo un set de genes estructurales están representados en estas proteínas, es decir, sólo una parte del genoma se puede evaluar. Las técnicas electroforéticas muestran lo que son los genotipos de los individuos de una muestra: cuántos son homocigotos, cuántos son heterocigotos y para qué alelos. Estas técnicas han hecho posible obtener estimas de la variación genética en poblaciones naturales (Ayala, 1984). La cuantificación de la variación genética puede hacerse de diversas formas: el polimorfismo que es la proporción de loci polimórficos en una población y la heterocigosidad, es la frecuencia promedio de individuos heterocigotos por locus, probabilidad de que dos alelos de un mismo locus, tirados al azar, sean diferentes (Ridley, 1996; Maynard, 1999).

V.5.1.1 Utilización de enzimas como marcadores

En la década de 1960, un nuevo tipo de marcador genético denominados marcadores bioquímicos fue descubierto. C.L. Markert y F. Moller en 1959 las llamaron isoenzimas. Las isoenzimas son definidas como formas moleculares (variantes) de una misma enzima,

presentando funciones idénticas o similares presentes en un mismo individuo (Maynard, 1998). Muchas enzimas existen en múltiples formas moleculares cuya actividad puede ser detectada a través de electroforesis. Con el avance tecnológico ocurrido en los años 70, el uso de geles de almidón y la tinción histoquímica de las proteínas, las isoenzimas han sido extremadamente importantes para la investigación en el área de la biología, experimentos en variados tipos de organismos. El efecto de una modificación alélica puede ser detectado con certeza debido a un cambio de movilidad electroforética. La literatura sobre estudios de isoenzimas en peces es muy extensa, lo que revela su utilidad en estudios de caracterización de la diversidad genética (Maynard, 1998).

Las poblaciones naturales presentan gran cantidad de variabilidad genética, como muchos genes codifican proteínas puede inferirse la variabilidad del material genético a partir de la variabilidad existente en las proteínas. Si se encuentra una proteína que no varía entre los individuos, se deduce que el gen que codifica la proteína es invariable, si la proteína es variable, el gen lo es también y se puede medir su variabilidad. Existe una técnica sencilla: la electroforesis en gel que permite estudiar la variabilidad proteica invirtiendo una cantidad moderada de tiempo y de recursos. Existen marcadores que constituyen la expresión del ADN nuclear, estos se denominan alozimas o isoenzimas, que son las variantes proteicas controladas por variantes alélicas en un solo locus génico. El descubrimiento de las isoenzimas ha favorecido la creación de marcadores moleculares genéticos más eficientes que los morfológicos ya que por lo general permite distinguir genotipos homocigotos de heterocigotos, son constantes dentro de un individuo, no son afectadas directamente por factores ambientales y a menudo muestran una diferenciación considerable entre poblaciones de individuos (Ayala, 1984; Richardson, 1987; Maynard, 1998).

V.5.2 Análisis por EPIC-PCR

Esta técnica tiene menos de 10 años en su aplicación. La particularidad de los intrones es la de acumular mutaciones rápidamente por inserción o delección y muchas veces éstos muestran alta variabilidad genética, incluyendo polimorfismo de tamaño (Palumbi, 1995). Esta variante de PCR llamada Exon Primed Intron Crossing ha sido la estrategia para demostrar polimorfismo de ADN en genomas eucariotas y se constituyen en marcadores codominantes apropiados para el análisis de estructuras poblacionales intraespecíficas así como de especies

estrechamente relacionadas (He & Haymer, 1997) como es el caso de las especies estudiadas en este trabajo. Este método ha servido para detectar variaciones alélicas a nivel nucleotídico en mamíferos (Palumbi & Baker, 1994), aves (Heslewood *et al*, 1998), insectos (Gomulski *et al*, 1998), crustáceos (Bierne *et al.*, 2000), moluscos (Corte Real *et al.*, 1994; Daguin *et al.*, 2001) y peces teleósteos (Hassan *et al.*, 2002).

Esta técnica consiste en amplificar los intrones de genes nucleares utilizando dos cebadores ubicados sobre los exones adyacentes. Los cebadores de carácter universal pueden alinearse en regiones exónicas altamente conservadas flanquendo a los intrones no codificantes. El tamaño de los intrones varía entre 80 a 10 000 nucleótidos o a veces más.

Las ventajas de esta técnica demuestran la amplificación en diferentes especies con los mismos primers, además los alelos nulos son menos frecuentes que por otros marcadores moleculares (Bierne *et al.*, 2000).

V.5.2.1 Limitaciones de la técnica

Las desventajas de la técnica radican en la amplificación simultánea de varios loci, que pueden revelar la presencia de pseudogenes en las especies en las cuales se observa esta multiplificación lo que interfiere en la calidad del PCR y dificulta la lectura de los genotipos porque los perfiles suplementarios no muestran bandas parásitas o la variación de tamaño entre los sistemas de bandas sea mayor que el polimorfismo de tamaño de cada locus (Hassan *et al.*, 2002).

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Localización de los puntos de muestreo

Las muestras de peces para el análisis por electroforesis enzimática, fueron colectadas de las tres principales cuencas del Mamoré e Iténez en el departamento del Beni y la sub cuenca del río Orthón en el departamento de Pando, pertenecientes todos a la cuenca alta del Madera (Fig. 1). Para el análisis por intrones se tomaron en cuenta las cuencas del Mamoré, Manuripi, Beni e Iténez.

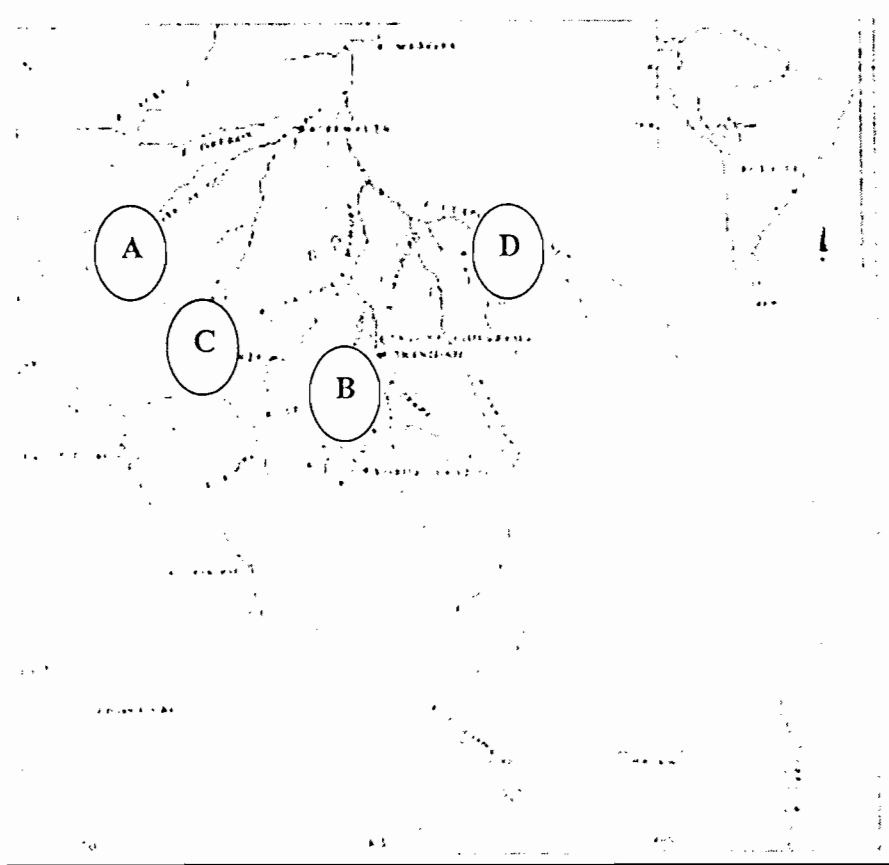


Fig. 1. Mapa de los principales ríos de la cuenca amazónica boliviana indicando la localización geográfica de los sitios de muestreo de las dos especies de *Pseudoplatystoma* para isoenzimas e intrones
Ref.: (A) Río Manuripi-Orthón; (B) Río Isiboro-Mamoré; (C) Río Beni; (D) Río San Martín y San Joaquín-Iténez.

VI.2 Especies en estudio y número de muestras

Para el análisis por electroforesis isoenzimática, se colectaron muestras de tejidos de dos especies de la familia Pimelodidae: *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum*. Un total de 123 peces fueron capturados en 18 sitios de muestreo (tabla 1), distribuidos de la siguiente manera: *Pseudoplatystoma fasciatum* 43 para la cuenca del Mamoré, 15 para la cuenca del Iténez y 20 para el río Manuripi. Para *Pseudoplatystoma tigrinum*, 22 para la cuenca del Mamoré, 18 para la cuenca del Iténez y 5 para el río Manuripi. Las muestras utilizadas para el estudio constituyeron pequeños trozos de tejido muscular y hepático extraídos por individuo para las dos especies y conservados en nitrógeno líquido hasta el momento de su procesamiento.

Para el análisis por intrones se colectaron muestras de tejido muscular de ambas especies un total de 210 individuos conservadas en alcohol absoluto. *Pseudoplatystoma fasciatum* 14 para Beni, 15 para Mamoré-Ichilo, 42 para la cuenca del Iténez, 21 para Manuripi-Orthon, 21 para la cuenca del Mamoré-Sécure, 1 individuo del Perú, 9 de Yata. Para *Pseudoplatystoma tigrinum* se colectaron 87 muestras: 10 para Beni, 14 para Mamoré-Ichilo, 23 para la cuenca del Iténez, 15 para Manuripi, 21 para la cuenca del Mamoré-Sécure, 2 individuos del Perú y 2 para Yata. Cabe resaltar que al tratarse de un estudio comparativo, se escogieron las mismas muestras en las cuencas respectivas, excepto en aquellas donde no se contaban con las mismas.

Tabla 1. Número y ubicación de las muestras utilizadas para el análisis por isoenzimas e intrones

Especie	Cuenca	Rio	Localidad	Coordenadas	Nº Isoenzimas	Nº Intrones
P.F	Iténez	San Martín	Bahia Sala	S13°20,069/W63°26,529	5	6
			Arroyo. S. Martincito	S13°19'20,3"/W 063°25'32,2"	1	
			California	S13°17'45,2"/W 063°33'21,3"	8	7
		San Joaquín	Río San Joaquín	S13°18'00,8" /W 063°33'31,6"	1	2
		Bella Vista				25
		Mamoré	Isiboro	Arroyo Chasmota	S15°47'06,4" /W 065°13'09,3"	2
	Arroyo Chimimita			S15°37'28,5" /W 065°08'53,7"	1	10
	Dos Lagunas			S15°21'55,1 /W 065°02'48,8"	6	7
	Laguna Asicusa			S15°46'20,7" /W 065° 12'04,2"	30	8
	Lag. Concepcion			S15°24'09,6" /W 065°04'39,5"	3	3
	Santa Maria			S15°35'41,2" /W 065°08'24,1"	1	1
	Yata		Yata 3	S11°07'04,7" /W 065°40'01,3"		9
	Ichilo		Río Vic	S17°02'44,8" /W 064°41'24,3"		3
			Lag. UMSS			1
			Río viejo del mono			1
			Panton undido			1
			Río la quince			4
			Río Ichilo			1
				Bella Vista		
		Río Ababo				1
Río Izarsama					4	
Orthon		Manuripi	Cardenas	S11°20'41,6" /W 067°45'00,8"	4	1
			Manchester	S11°28'28,3" /W 067°59'45,5"	12	1
			Lago Bay	S11°57'18,3" /W 068°39'35,5"	4	8
Beni		Opuerto Salinas	S14°16'36,7" /W 067°28'32,0"		14	
Perú					1	
TOTAL					78	123
Especie		Cuenca	Rio	Localidad	Coordenadas	Nº ind
P.T	Iténez	San Martín	California Sitio 3	S13°17'45,2" /W 063°33'21,3"	1	1
			Laguna Larga	S13°18'00,8" /W 063°33'31,6"	1	10
			San Martín	S13°18'26,8" /W 063°38'47,7"	2	2
			Laguna Sala	S13°20'28,1" /W 063°26'62,5"	1	
		San Joaquín	San Joaquín Sitio 1	S13°21'45,7" /W 063°32'50,5"	6	1
			Sitio 4	30' arriba de la desembocadura	2	6
	Sitio 5		Entre Bahía Peta y Redonda	5	5	
	Bella Vista				6	
	Mamoré	Isiboro	Nueva Canaan	S15°19'15,8" W 65°00'17,6"	16	12
			Dos Lagunas	S15°21'55,1" W 65°02'48,8"	3	3
Concepción Lag. 2			S15°25'24,3" W 65°04'41,4"	1	10	

		Laguna Asicusa	S15°46'41,6" W 65°12'04,2"	3	10
		Sto. Domingo	Proche confluence, à reprendre	2	2
	Yata	Yata 3	S11°07'04,7" /W 065°40'01,3"		2
Orthon	Manuripi	Cardenas	S11°20'41,7" /W 067°45'00,8"	5	5
Beni	Puerto Salinas		S14°16'36,7" /W 067°28'32,0"		10
Perú					2
TOTAL				45	87

VI.3 Técnicas moleculares

VI.3.1 Electroforesis de Isoenzimas

Los tejidos fueron analizados electroforéticamente en geles de almidón para un total de 10 sistemas enzimáticos (tabla 2). La técnica de electroforesis enzimática en gel de almidón (anexo 1), comprende los siguientes pasos:

- Extracción, de enzimas de las muestras de tejido muscular y hepático.
- Separación, cada proteína situada en el gel migra en un sentido y a una velocidad que depende de la carga eléctrica neta.
- Tinción, el gel es teñido con una solución química adecuada para visualizar la posición de las proteínas o enzimas específicas.
- Interpretación, de los zimogramas.
- Aplicación, la información obtenida permite determinar la variabilidad proteica y las frecuencias genotípicas y alélicas de cada locus en poblaciones naturales.

Los detalles técnicos y soluciones para el revelado son descritos en los anexos 2,3 y 4.

Tabla 2. Sistemas enzimáticos. Lista de enzimas analizadas, número de enzima (EC), Tejido estudiado y Sistema de Tampón usado

Nombre de la enzima	Abrev.	Nº EC	Locus	Buffer	Tejido
Adenilato kinasa	Ak	2.7.4.3	Ak	A	M
Aspartato aminotransferasa	Aat	2.6.1.1	Aat-1	A	H
			Aat-2	A	H
Malato deshidrogenasa	Mdh	1.1.1.37	Mdh-1	A	M
			Mdh-2	A	M
			Mdh-3	A	H
Isocitrato deshidrogenasa	Idh	1.1.1.42	Idh-1	B	M
			Idh-2	B	H
Lactato deshidrogenasa	Ldh	1.1.1.27	Ldh-1	B	M
			Ldh-2	B	H
Creatin kinasa	Ck	2.7.3.2	Ck	C	M
Fosfoglucoasa isomerasa	Pgi	5.3.1.9	Pgi-1	C	M
			Pgi-2	C	H
Fosfoglucomutasa	Pgm	5.4.2.2	Pgm	C	M
Enzima málica	Me	1.1.1.40	Me-1	D	M
			Me-2	D	M
6-fosfogluconato deshidrogenasa	6-Pgdh	1.1.1.44	6-Pgdh	D	H

EC: El número asignado por la Comisión de Enzimas (IUBNC, 1984)

Buffer: A: TC (Tris Citrato) Electrodo pH 6.3, Gel pH 6.7; B: PC (Fosfato Citrato)

Electrodo pH 6.3, Gel pH 6.3; C: TCB (Tris Citrato Borato) Electrodo pH 8.0, Gel pH 8.3; D: IP (Tris Fosfato) Electrodo pH 7.4, Gel pH 7.4

Tejido: M = músculo, H = hígado

VI.3.2 Interpretación de los zimogramas

Las bandas observadas en el gel después del revelado permiten visualizar las isoenzimas, éstas constituyen los fenotipos que posteriormente se traducen en genotipos. Para la lectura e interpretación de los geles, los alelos fueron nombrados en orden creciente de su movilidad electroforética. El alelo más frecuente en una población de referencia para cada locus se designó como 100. Los otros alelos fueron nombrados según su distancia de migración en relación al alelo 100. Luego de asignar el eventual genotipo para cada individuo de cada población, se crea una matriz en base a los alelos encontrados en cada uno de los locus isoenzimáticos, estos datos se manejaron en el programa EXCEL 2000, los que son posteriormente analizados con el programa GENETIX versión 4.05.

VI.3.3 EPIC-PCR (Exon Primed Intron Crossing Polymerization Chain Reaction)

VI.3.3.1 Extracción de ADN

Las extracciones fueron realizadas a partir de tejido muscular conservadas en etanol absoluto siguiendo un protocolo estándar con CTAB (Doyle & Doyle, 1987), Ver **anexo 5**.

VI.3.3.2 Amplificación por EPIC-PCR

Para la amplificación de las secuencias intrónicas se utilizaron los siguientes primers:

Tabla 3. Número y secuencia de primers utilizados en el análisis por EPIC-PCR

Gen	Primer	Fuente	Secuencia del primer (5 - 3)
Creatin kinasa	Ck 6F Ck 7R	Chow & Takeyama, 1998	GAC CAC CTC CGA GTC ATC TC CAG GTG CTC GTT CCA CAT GA
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GPD 2F GPD3R	Hassan <i>et al</i> , 2002	GCC ATC AAT GAC CCC TTC ATO GTTG ACC TCA CCC TTG AAG CGG CCG
Aldolase C	Aldoc 1 F Aldoc 2R	Hassan <i>et al</i> , 2002	CCT GGC TGC GGA CGA GTC TGT GGG GGC GGT ACT GTC TGC GGT TCT CC
Aldolase B	Aidob 1 1F Aidob 1 2R	Hassan <i>et al</i> , 2002	GCT CCA GGA AAG GGA ATC CTG GC CTC GTG GAA GAA GAT GAT CCC GCC
Alpha amylase	AM2B 1F AM2B 2R	Hassan <i>et al</i> , 2002	CCT TCA TCT TCC AGG AGG TAC TTC ACC TCC CAG ATC AAT AAC
Htocompatibility Complex Major	MHC 1 F MHC 2 R	Hassan <i>et al</i> , 2002	ACT CTA ATC TGG AGT ACA TGC CAG GAG ATC TTC TCT CCA GCC
S 7 ribosomal Proteine	Rpex 1 F Rpex 2R	Chow & Takeyama, 1998	TGG CCT CTT CCT TGG CCT TC AAC TCG TCT GGC TTT TCG CC
Calmodulin	CALMex 4 F CALMex 5 R	Chow, 1998	CTG ACC ATG ATG GCC AGA AA GTT AGC TTC TCC CCC AGG TT
Opsin	PMO PSI 1F PMOPSI 1R	Bierne, 2000	TTC GGC AOC AGC AGC TCG C CAT GTC CTC AGG CAG TGT GTC C
Actin	Act-F Act-R	Hassan <i>et al</i> , 2002	ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AA GCA TAA CCC TCG TAG ATG GGC AC
Crowth Hormon	GH 2F GH 3R	Hassan <i>et al</i> , 2002	AGC GTT TCT CCA TTG CCG TGA GC TCT TGT TGA GTT GAC GCT GGT CC
Chymotripsin B	PvChymB-F PvChymB-R	Bierne, 2000	ATO GTG TCC GAG GCT GAC TGC AA GCA TGA GGG CTG TGA CTC GGG

Las condiciones de amplificación establecidas para este trabajo tuvieron un volumen final de 25 µl que comprende 5 U/µl de taq polimerasa (Promega), 10 X de Buffer, 2 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl₂ y 5 µl de extracto de ADN (**anexo 6**).

El programa de PCR fue el siguiente: 92°C 2min prehibridación, 95 °C 1 min desnaturalización, 50°C 1min alineamiento, 72 °C 1 min elongación (30 ciclos), 72°C 5 min elongación final. Para la amplificación de los diferentes sistemas de intrones se modificó en este programa las condiciones de alineamiento o concentraciones de ADN (**anexo 7**).

VI.3.3.3 Migración de productos de amplificación

Las migraciones de los productos de amplificación se realizaron en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con bromuro de etidio y visualizados en lámpara de UV para verificar la presencia de los mismos. A continuación se realizaron migraciones en geles de poliacrilamida (**ver anexo 8**) al 8 %, (450 V, 75 mA, 25 W) durante 3 a 6 horas (**anexo 9**). Para determinar el tamaño de los productos de amplificación, se utilizó marcador de peso molecular SMART y el programa Labimage (Kapelan, 1999). El revelado de los geles de poliacrilamida se realizó con nitrato de plata (**anexo 10**).

VI.4 Análisis de datos

El análisis de datos se efectuó primero entre especies y luego para cada especie entre sitios bajo la siguiente secuencia:

VI.4.1 Estimación de los niveles de variabilidad genética

VI.4.1.1 Heterocigosidad

Es la medida de variabilidad genética más simple y ampliamente utilizada. Su importancia radica en que cada heterocigoto lleva diferentes alelos, representando la variabilidad existente. Generalmente en estudios poblacionales se calculan dos heterocigosidades: heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) (Capula, 1996; Fisher, 1997).

VI.4.1.2 Heterocigosidad observada (H_o)

Esta medición de heterocigosidad en una población, se obtiene de la suma del número de individuos heterocigotos observados para cada locus dividido por el número total de individuos y loci analizado en la población.

VI.4.1.3 Heterocigosidad esperada (H_e)

Esta medida de heterocigosidad para una población, se obtiene de la suma del número de individuos heterocigotos esperados para cada locus, considerando el equilibrio de Hardy-Weinberg, y dividido por el número total de individuos y loci analizados en la población.

VI.4.1.4 Polimorfismo (P)

Se obtiene de la suma de todos los loci polimórficos observados, divididos por el número total de loci analizados en una población. Se considera que el polimorfismo genético es la coexistencia de dos o más alelos en un locus de una misma población. Un locus es considerado polimórfico cuando la frecuencia del alelo más frecuente no sobrepasa del 0,99 ó 0,95 según el criterio de polimorfismo adoptado. Caso contrario, se trata de un locus monomórfico (Gazel, 1999).

VI.4.1.5 Diversidad alélica (A)

Es el promedio de alelos por locus (A), obtenido de la suma de los alelos por locus observados, dividido por el número de loci analizados.

VI.4.2 Análisis del Equilibrio Hardy - Weinberg

El índice de fijación F_{is} (Wright, 1951) corresponde a la correlación existente en la unión de dos gametos al azar en relación a la subpoblación, cuyos valores explican las variaciones de la heterocigosidad debido a apareamientos no aleatorios en la subpoblación y a posibles efectos selectivos. El valor de F_{is} mide el déficit total de heterocigotos presentes al interior de una subpoblación.

$$F_{is} = (H_s - H_i) / H_s$$

Donde:

H_i = heterocigosidad promedio observada de un individuo

H_s = heterocigosidad promedio esperada de la subpoblación

El coeficiente de correlación de este índice varía entre - 1 (población compuesta de heterocigotos) y 1 (población compuesta de homocigotos).

Los F_{is} son calculados por el logiciel Genetix (Belkhir, 1997) por el estimador de Weir et Cockerham (Weir & Cockerham, 1984).

$$F = 1 - C / (B + O)$$

Donde:

B es la varianza de las frecuencias alélicas entre individuos al interior de cada población.

C es la varianza de las frecuencias alélicas entre gametos al interior de cada población.

Para hallar la significancia de este test por locus y multilocus se compara el F_{is} real con 1000 estimadores de F_{is} obtenidos de 1000 poblaciones panmícticas obtenidas de manera artificial por permutaciones de los alelos de cada locus. Se considera que la diferencia es significativa ($\alpha = 5\%$) cuando el estimador de F_{is} real es mayor a 97.5 % (test simétrico) en relación a los estimadores del F_{is} artificial.

VI.4.3 Diferenciación entre poblaciones

Llamado índice de fijación que explica los cambios en la heterocigosidad debido a subdivisión poblacional y deriva genética, indicando el grado de diferenciación existente estimado entre las poblaciones (Hartl, 1987; Cuguen *et al.*, 1988).

$$F_{st} = (H_t - H_s) / H_t$$

Donde:

H_s es la heterocigosidad promedio esperada de la subpoblación

H_t es la heterocigosidad promedio esperada de la población total

Los valores del F_{st} varían entre 0 y 1, cuando $F_{st} = 0$, las diferentes subpoblaciones se comportan como una sola población, cuando el $F_{st} = 1$, la estructuración es máxima lo que sugiere que las subpoblaciones presentan diferentes alelos fijados.

Para considerar significativo un valor de F_{st} se compara éste con 1000 estimadores de F_{st} obtenidos de situaciones donde no existe estructuración, eliminando la hipotética estructuración real por las permutaciones de los individuos en el conjunto de las poblaciones. Se considera que la diferencia es significativa ($\alpha = 5\%$) cuando el F_{st} real es mayor a 95 % (test disimétrico) en relación a los F_{st} de las 1000 situaciones sin estructuración.

VI.4.4 Flujo génico

En general los análisis de flujo génico, se basan en la estructura espacial de las poblaciones naturales, a partir de esta se han planteado modelos para explicar el flujo génico como el modelo de isla de Wright (1969), continuo o de aislamiento por distancia o el discontinuo. Sin embargo, en todos estos modelos la estimación del flujo génico se basa en métodos indirectos, tomando en cuenta estimativos como alelos privados como el F_{st} . Así, para la obtención del Nm se basó en el F_{st} estimando el número de migrantes por generación (Nm) bajo una amplia variedad de estructuras poblacionales. El cálculo del flujo génico se resume en:

$$Nm = (1 - F_{st})/4F_{st}$$

VI.4.5 Distancia genética

Los índices de distancia generalmente son utilizados para cuantificar las divergencias genéticas entre unidades taxonómicas, que se obtienen a partir de los datos de frecuencias alélicas.

Donde:
$$D = -\ln(1 - F_{st})$$

VI.4.6 Análisis factorial de correspondencia

El análisis factorial de correspondencia describe las asociaciones entre dos variables cualitativas como los alelos. Se realiza una matriz de alelos de 0, 1 y 2 para el tratamiento de

datos en Genetix. La anotación para un individuo que no presenta el alelo es 0, 1 si es al estado heterocigoto y 2 si es al estado homocigoto para este alelo (She *et al.*, 1987). El AFC también describe la información que contienen los alelos intralocus e interlocus individuo por individuo. Este análisis pone en evidencia diferentes grupos correspondientes a las combinaciones lineales de las variables independientemente de su procedencia geográfica.

VI.4.7 Asignamiento Poblacional

Este es un modelo estadístico muy útil en la identificación de subpoblaciones, y la asignación de los individuos de cada población independientemente de su origen predefiniendo poblaciones, sobre la base de sus genotipos identificados por marcadores codominantes como intrones, isoenzimas, microsatélites, etc.

Bajo el equilibrio de distancia a la panmixia, las frecuencias del genotipo en la muestra deben seguir el equilibrio de Hardy-Weinberg, donde esta el producto de la frecuencia de un genotipo de las frecuencias de los alelos que incluye. La existencia en una muestra de individuos de subpoblaciones con frecuencias distintas de los alelos darán lugar a una pérdida de este equilibrio. Partition ML trata las aplicaciones para la detección de tal estructura de la población y asigna a individuos a su población de origen. Paetkau *et al.* (1995) y Rannala y Mountain (1997) han desarrollado los métodos de la asignación basados en la probabilidad de mostrar un genotipo del multilocus de una gama de poblaciones candidatas. La forma es computar, para cada individuo y cada población del candidato, un índice de la asignación que refleja la probabilidad de que este individuo particular pertenece a una población particular de origen. Estos estimadores de máxima verosimilitud genotípicos calculados para cada población del candidato entonces se comparan y asignan el individuo a la población para quien la probabilidad es más alta. Sin embargo este acercamiento depende del supuesto de que las muestras en el módem son representantes de las poblaciones de la fuente. Esta asunción puede ser violada si el muestreo de individuos se hace independientemente de algún conocimiento a priori del número subyacente de los grupos independientes donde ha ocurrido la reproducción.

VII. RESULTADOS

VII.1 Resultado de los datos electroforéticos y perfiles intrónicos obtenidos

De 10 sistemas enzimáticos examinados para músculo e hígado obtenidos en el marco de mi cotutoría de la tesis de licenciatura de Juan Choquecallata (colaboración UTB-IBMB e IRD), se identificaron 19 loci para las dos especies de *Pseudoplatystoma* estudiadas, de los cuales 9 resultaron polimórficos: *Mdh-2*, *Pgi-1*, *Pgm*, *Me-1*, *Me-2* para músculo y *Aat-2*, *Idh-2*, *Pgi-2* y *6Ppgdh* para hígado. Los loci monomórficos fueron: *Aat-1*, *Mdh-1*, *Mmdh-3*, *Ak-1*, *ldh-1*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Ck-1*, *Ck-2*. El loci *Ak-2* fue descartado por presentar dificultad en su lectura.

Respecto a lo obtenido por intrones, se analizaron 12 sistemas intrónicos para cada especie, para *P. fasciatum* se encontraron 18 loci: *Mhc-1*, *AldoB-1*, *AldoC-2*, *Am2b-1*, *Am2b-2*, *Ck-1*, *Ck-2*, *Gpd-1*, *Rpex-1*, *Calmex-1*, *Calmex-2*, *Pmopsi-2*, *Actin-1*, *Actin-2*, *Gh-1*, *Chy-1*, *Chy-2*, *Chy-3*, de éstos se identificaron 6 loci polimórficos: *Mhc-1*, *Am2b-2*, *Rpex-1*, *Pmopsi-2*, *Actin-1*, *Actin-2*, sin embargo, estos dos últimos fueron eliminados por su difícil interpretación. Asimismo, se obtuvieron 13 loci monomórficos de los cuales 9 son marcadores entre especies: *Aldo B-1*, *Aldo C-1*, *Aldo C-2*, *Calmex-1*, *Calmex-2*, *Gh-1*, *Chy1*, *Chy-2*, *Chy-3*. Para *P. tigrinum*, también se obtuvieron 18 loci: *Mhc-1*, *Aldo B-1*, *Aldo C-2*, *Am2b-1*, *Am2b-2*, *Ck-1*, *Ck-2*, *Gpd-1*, *Rpex-1*, *Calmex-1*, *Calmex-2*, *Pmopsi-2*, *Actin-1*, *Actin2*, *Gh-1*, *Chy-1*, *Chy-2*, *Chy-3*, de éstos se identificaron 3 loci polimórficos: *Am2b-2*, *Rpex-1*, *Pmopsi-1*. La representación esquemática de los patrones electroforéticos obtenidos por isoenzimas e intrones se observan en el **anexo 11**.

VII.2 Diferenciación inter-específica entre *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum*

VII.2.1 Comparación de la variabilidad genética entre especies

Las frecuencias alélicas para los loci polimórficos en las dos especies son expuestas en las **tablas 4 y 6**, tanto para isoenzimas como para intrones.

La tasa de polimorfismo obtenido por isoenzimas muestra valores a un criterio P(95%) de 0.67 y a P(99%) de 0.78 para ambas especies. Para intrones la tasa de polimorfismo a criterio P(95%) y P(99%) es 1.00 para las dos especies en estudio. La diversidad alélica es de 2.33 para *P. fasciatum* y 2.11 para *P. tigrinum*. El promedio de alelos obtenido por intrones es mayor en ambas especies que los obtenidos por isoenzimas, así para *P. fasciatum* es de 7.5 y para *P. tigrinum* de 5.00. Para isoenzimas, los índices de heterocigosidad observada (H_o) en *P. fasciatum* presenta un valor bajo (0.13) en relación a la registrada por *P. tigrinum* (0.20). Para intrones la heterocigosidad observada para *P. fasciatum* es de 0.33 y para *P. tigrinum* de 0.15. En general, los promedios de heterocigosidad esperada son superiores a la heterocigosidad observada con ambos descriptores moleculares (tablas 5 y 7).

Tabla 4. Frecuencias alélicas observadas para cada especie (Isoenzimas)

Loci	<i>P. fasciatum</i>	<i>P. tigrinum</i>
Aat2(N)	77	44
98	0.05	0.09
100	0.95	0.91
H exp.	0.10	0.17
H n.b.	0.10	0.17
H obs.	0.00	0.00
ldh2 (N)	77	42
100	1.00	0.57
118	0.00	0.33
131	0.00	0.10
H exp.	0.00	0.55
H n.b.	0.00	0.56
H obs.	0.00	0.57
	325	0.38
Pgil (N)	75	44
4	0.32	0.64
100	0.68	0.36
H exp.	0.44	0.46
H n.b.	0.44	0.47
H obs.	0.51	0.55
Pgi2 (N)	75	43
82	0.01	0.00
90	0.07	0.02
96	0.01	0.00
100	0.91	0.88
108	0.01	0.09
120	0.01	0.00
H exp.	0.17	0.21
H n.b.	0.17	0.21
H obs.	0.15	0.19

Loci	<i>P. fasciatum</i>	<i>P. tigrinum</i>
Mdh 2 (N)	78	45
85	0.00	0.41
100	1.00	0.59
H exp.	0.00	0.48
H n.b.	0.00	0.49
H obs.	0.00	0.42
Pgm (N)	78	44
100	0.98	0.00
120	0.02	1.00
Hex .	0.04	0.00
H n.b.	0.04	0.00
H obs.	0.04	0.00
Me 1(N)	75	44
100	0.35	0.00
0.00		
400	0.27	0.00
450	0.00	1.00
H ex .	0.66	0.00
H n.b.	0.66	0.00
H obs.	0.32	0.00
Me2 (N)	78	43
100	0.90	0.03
119	0.10	0.97
H exp.	0.17	0.07
H n.b.	0.18	0.07
H obs.	0.10	0.07
6P gdh (N)	34	36
84	0.00	0.06
92	0.44	0.33
100	0.56	0.61
H n.b.	0.49	0.51
H exp.	0.50	0.52
H obs.	0.00	0.00

(N): Número de individuos analizados por loci

Tabla 5. Variabilidad genética en dos poblaciones de *Pseudoplatystoma* (Isoenzimas)

	He	H n.b.	Ho	P (0.95)	P (0.99)	A
<i>P. fasciatum</i>	0.23	0.23	0.13	0.67	0.78	2.33
<i>P. tigrinum</i>	0.27	0.28	0.20	0.67	0.78	2.1

(He): Heterocigosidad esperada; (Ho): Heterocigosidad observada; (P): Tasa de polimorfismo; (A): Diversidad alélica

Tabla 6. Frecuencias alélicas observadas para cada especie (Intrones)

Loci	<i>P. fasciatum</i>	<i>P. tigrinum</i>
Mhc (N)	107	75
350	0.01	0.00
370	0.02	0.00
398	0.35	0.04
450	0.06	0.00
467	0.50	0.03
480	0.02	0.03
584	0.02	0.89
H exp.	0.61	0.20
H n.b.	0.61	0.20
H obs.	0.49	0.05
Rpex (N)	112	78
120	0.01	0.01
136	0.19	0.05
144	0.03	0.00
156	0.03	0.00
169	0.58	0.55
175	0.11	0.28
186	0.03	0.06
603	0.01	0.04
H exp.	0.60	0.60
H n.b.	0.61	0.60
H obs.	0.17	0.24

(N): Número de individuos analizados por loci

Tabla 7. Variabilidad genética en dos poblaciones de *Pseudoplatystoma* (Intrones)

	He	H n.b.	Ho	P (0.95)	P (0.99)	Λ
<i>P. fasciatum</i>	0.60	0.61	0.33	1.00	1.00	7.50
<i>P. tigrinum</i>	0.40	0.40	0.15	1.00	1.00	5.00

(He): Heterocigosidad esperada; (Ho): Heterocigosidad observada; (P): Tasa de polimorfismo; (Λ): Diversidad alélica

Tabla 8. Resumen de los datos interespecie obtenidos por isoenzimas e intrones

	Isoenzimas		Intrones	
	PF	PT	PF	PT
Locus polimórfico por especie	8/19	9/19	6/18	3/18
Promedio de alelos por locus	2.3	2.1	7.0	4.6
Loci diagnóstico	1/19	1/19	9/18	9/18
Loci semidiagnóstico	3/19	3/19	3/18	3/18
Ho	0.13	0.20	0.33	0.15
He	(0.23)	(0.27)	(0.60)	(0.40)

VII.2.2 Diferencia a la panmixia (F_{is}):

La estimación del F_{is} para isoenzimas dentro de cada especie señala un valor significativo de 0.45 para *P. fasciatum* y de 0.28 para *P. tigrinum*, indicando una diferencia a la panmixia dentro de cada una con déficit de heterocigotos sugiriendo la existencia de varias poblaciones. En cuanto a los resultados obtenidos por intrones se observan también valores significativos para ambas especies 0.45 para *P. fasciatum* y 0.63 para *P. tigrinum*.

VII.2.3 Diferencia Inter-sitios (F_{st}):

El análisis con el estimador F_{st} entre las dos especies expresado por ambos marcadores es diferente; sin embargo ellos muestran un valor significativo de 0.56 en isoenzimas y de 0.44 para intrones, demostrando una alta diferenciación genética entre las dos especies ($p < 5\%$).

VII.2.4 Análisis factorial de correspondencia

La información aportada por isoenzimas en cuanto al AFC expresa una fuerte estructuración de las muestras analizadas identificando dos clusters genéticas constituidas por

la especie *Pseudoplatystoma tigrinum* para la entidad A y *Pseudoplatystoma fasciatum* para la entidad B, constituyéndose en dos especies claramente diferenciadas. La misma diferenciación se observa con los EPIC-PCR. Asimismo, se observa la ausencia de híbridos entre las dos especies.

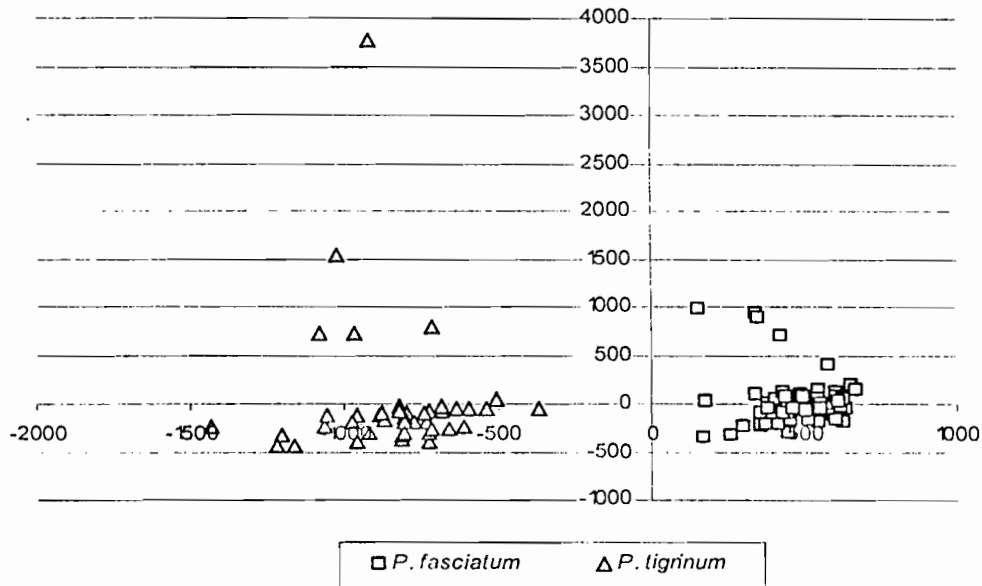


Fig. 2. Análisis Factorial de Correspondencia para los individuos de dos especies de Pimelodidae en función a sus genotipos alélicos. Distribución sobre el plan factorial para los ejes 1 (inercia 27,93%) y 2 (inercia 11,23%)

VII.3 Polimorfismo intraespecífico *Pseudoplatystoma fasciatum*

VII.3.1 Variabilidad genética

Las frecuencias alélicas para los loci polimórficos son expuestas en la **tabla 9** para los resultados obtenidos por isoenzimas. En la **tabla 11** se observan las frecuencias alélicas obtenidas por intrones de los loci polimórficos. Las medidas de variabilidad genética se dan en la **tabla 10** y **12** para isoenzimas e intrones respectivamente. La tasa de polimorfismo P (95%) por isoenzimas muestra valores de 0.44; 0.55 y 0.66 para las poblaciones del Mamoré, Iténez y Manuripi respectivamente. Mientras que a un P (99%) corresponde 0.66 para las tres poblaciones. Para intrones las tasas de polimorfismo criterio (95%) y (99%) es de 1.00 en todas las poblaciones. El número de alelos por locus obtenidos por isoenzimas para el Iténez y Manuripi es de 2.00 y para el Mamoré de 1.78. El promedio de alelos por intrones en las poblaciones estudiadas en todos los casos es mayor observándose valores que oscilan entre

2.75 a 6.00. Los índices de heterocigosidad observada son de 0.11; 0.13 y 0.15 para el Mamoré, Manuripi e Iténez respectivamente. Los resultados de la heterocigosidad esperada son superiores a la heterocigosidad observada por isoenzimas al igual que los valores por intrones en todas las poblaciones analizadas.

Tabla 9. Frecuencias alélicas para 3 poblaciones de *P. fasciatum* (Isoenzimas)

Loci	Iténez	Manuripi	Mamoré
Aat2			
(N)	15	19	43
98	0.00	0.21	0.00
100	1.00	0.78	1.00
H exp.	0.00	0.33	0.00
H n.b.	0.00	0.34	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.00
ldh2			
(N)	15	19	43
100	1.00	1.00	1.00
Hexp.	0.00	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.00
Pgi 1			
(N)	15	19	41
4	0.33	0.37	0.29
100	0.67	0.63	0.71
H exp.	0.44	0.47	0.41
H n.b.	0.46	0.48	0.42
H obs.	0.40	0.53	0.54
Pgi2			
(N)	15	18	42
82	0.00	0.03	0.00
90	0.07	0.03	0.08
96	0.00	0.03	0.00
100	0.87	0.92	0.92
108	0.03	0.00	0.00
120	0.03	0.00	0.00
H exp.	0.24	0.16	0.15
H n.b.	0.25	0.16	0.15
H obs.	0.27	0.11	0.11

Loci	Iténez	Manuripi	Mamoré
Mdh2			
(N)	15	20	43
100	1.00	1.00	1.00
H exp.	0.00	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.00
Pgm			
(N)	15	20	43
100	0.97	1.00	0.98
120	0.03	0.00	0.02
H exp.	0.06	0.00	0.05
H n.b.	0.07	0.00	0.05
H obs.	0.07	0.00	0.05
Me1			
(N)	13	20	42
100	0.27	0.63	0.25
325	0.54	0.23	0.40
400	0.19	0.15	0.34
H exp.	0.60	0.54	0.65
H n.b.	0.62	0.55	0.66
H obs.	0.31	0.45	0.26
Me2			
(N)	15	20	43
100	0.77	0.88	0.97
119	0.23	0.12	0.03
H exp.	0.36	0.22	0.07
H n.b.	0.37	0.22	0.07
H obs.	0.33	0.15	0.07
6Pgdh			
(N)	7	18	9
92	0.71	0.33	0.44
100	0.29	0.67	0.56
H exp.	0.41	0.44	0.49
H n.b.	0.44	0.46	0.52
H obs.	0.00	0.00	0.00

(N): Número de individuos analizados por loci

Tabla 10. Variabilidad genética de 3 poblaciones de *P. fasciatum* (Isoenzimas)

	He	H n.b.	Ho	P(0.95)	P(0.99)	A
Lténez	0.24	0.25	0.15	0.56	0.67	2.00
Manuripi	0.24	0.25	0.14	0.67	0.67	2.00
Mamoré	0.20	0.21	0.12	0.44	0.67	1.78

(He) Heterocigosidad esperada; (Ho) Heterocigosidad observada; (P): Tasa de polimorfismo; (A): Diversidad alélica

Tabla 11. Frecuencias alélicas para 6 poblaciones de *P. fasciatum* (Intrones)

Loci	Beni	Ichilo	Iténez	Manuripi	Mamoré	Yata
Mhc 1 (N)	9	9	41	21	18	6
350	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
370	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00
398	0.44	0.00	0.08	0.02	0.11	0.11
450	0.00	0.00	0.08	0.02	0.11	0.11
467	0.55	0.67	0.38	0.52	0.58	0.46
480	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00
584	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
H exp.	0.49	0.44	0.72	0.52	0.55	0.44
H n.b.	0.52	0.47	0.73	0.53	0.57	0.46
H obs.	0.22	0.44	0.56	0.48	0.50	0.55
Am2b 2(N)	10	13	41	21	18	9
570	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
576	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.00
580	0.00	0.08	0.10	0.09	0.11	0.00
585	0.55	0.42	0.39	0.36	0.55	0.44
587	0.10	0.08	0.07	0.12	0.00	0.05
590	0.35	0.31	0.41	0.40	0.25	0.50
595	0.00	0.11	0.00	0.00	0.03	0.00
584	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
H exp.	0.56	0.70	0.66	0.68	0.61	0.55
H n.b.	0.59	0.73	0.67	0.70	0.63	0.58
H obs.	0.50	0.61	0.44	0.19	0.50	0.55
Rpex 1 (N)	12	13	40	19	19	8
120	0.00	0.00	0.02	0.00	0.03	0.00
136	0.29	0.15	0.17	0.16	0.24	0.25
144	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
156	0.12	0.08	0.00	0.00	0.03	0.00
169	0.46	0.65	0.55	0.66	0.53	0.75
175	0.12	0.00	0.09	0.18	0.18	0.00
186	0.00	0.11	0.04	0.00	0.00	0.00
603	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
H exp.	0.67	0.53	0.64	0.51	0.63	0.37
H n.b.	0.70	0.55	0.65	0.52	0.65	0.40
H obs.	0.17	0.07	0.10	0.26	0.37	0.00
Pmopsi 1(N)	11	11	38	21	19	9
317	0.14	0.09	0.13	0.14	0.18	0.17
320	0.00	0.04	0.01	0.05	0.03	0.00
322	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
326	0.86	0.04	0.10	0.12	0.00	0.11
330	0.00	0.04	0.10	0.12	0.00	0.11

H exp.	0.23	0.32	0.45	0.49	0.34	0.44
H n.b.	0.25	0.33	0.45	0.50	0.35	0.46
H obs.	0.27	0.18	0.39	0.24	0.21	0.44

(N): Número de individuos analizados por loci

Tabla 12. Variabilidad genética de 6 poblaciones de *P. fasciatum* (Intrones)

	He	H n.b.	Ho	P (0.95)	P (0.99)	A
Beni	0.49	0.52	0.29	1.00	1.00	2.75
Ichilo	0.49	0.52	0.33	1.00	1.00	3.75
Iténez	0.62	0.63	0.37	1.00	1.00	6.00
Manuripi	0.55	0.56	0.29	1.00	1.00	3.75
Mamoré	0.53	0.55	0.41	1.00	1.00	4.25
Yata	0.45	0.48	0.39	1.00	1.00	2.75

(He): Heterocigosidad esperada; (Ho): Heterocigosidad observada; (P): Tasa de polimorfismo; (A): Diversidad alélica

VII.3.2 Diferencia a la panmixia

La estimación del F_{is} para las tres poblaciones testadas por isoenzimas, muestra para las poblaciones del Iténez, Manuripi y Mamoré valores significativos ($p < 5\%$) de 0.39, 0.45 y 0.46 respectivamente. En cada cuenca las poblaciones presentan una diferencia a la panmixia con un déficit en heterocigotos. Los resultados de distancia a la panmixia obtenidos por intrones refieren también valores significativos ($p < 5\%$) de 0.41; 0.49; 0.26; 0.45 y 0.38 en Iténez, Manuripi Mamoré Beni e Ichilo respectivamente. En estas poblaciones se observa también un déficit de heterocigotos excepto en Yata donde los valores no son significativos.

VII.3.3 Diferencia Inter-sitios

La estimación del F_{st} para las tres poblaciones (tabla 13) por isoenzimas, muestra valores significativos al comparar las poblaciones del Manuripi con las del Iténez (0.08) y el Mamoré (0.05), equivalente a una moderada diferenciación genética. Por el contrario, la diferencia intersitios obtenidos por intrones (tabla 14) no muestra diferenciación entre las 6 poblaciones estudiadas.

Tabla 13. Estimación del F_{st} para las 3 poblaciones (Isoenzimas)

F_{st}	Manuripi	Mamoré
Iténez	0.08*	0.01
Manuripi		0.05

$p < 5\%$

Tabla 14. Estimación del F_{st} para las 6 poblaciones (Intrones)

F_{st}	Ichilo	Iténez	Manuripi	Mamoré	Yata
Beni	0.03	0.00	0.01	0.03	0.00
Ichilo		0.00	0.01	0.01	0.03
Iténez			0.01	0.01	0.00
Manuripi				0.00	0.01
Mamoré					0.00

VII.3.4 Distancia genética entre sitios y flujo génico

Las mayores tasas de migración se encuentran entre las poblaciones del Iténez y Mamoré (18.15) que entre Iténez y Manuripi (2.73) por los resultados observados en isoenzimas. Existe un flujo génico importante entre las poblaciones estudiadas observadas por intrones con valores entre 63.65 hasta el infinito

VII.3.5 Análisis factorial de correspondencia

Por el análisis factorial de correspondencia obtenido por isoenzimas e intrones se observa claramente la ausencia de clusters dentro las poblaciones estudiadas, excepto en el Manuripi mostrado por isoenzimas. Las gráficas demuestran una similitud de resultados para Iténez y Mamoré por ambos marcadores, por ejemplo donde existe amplia dispersión de puntos.

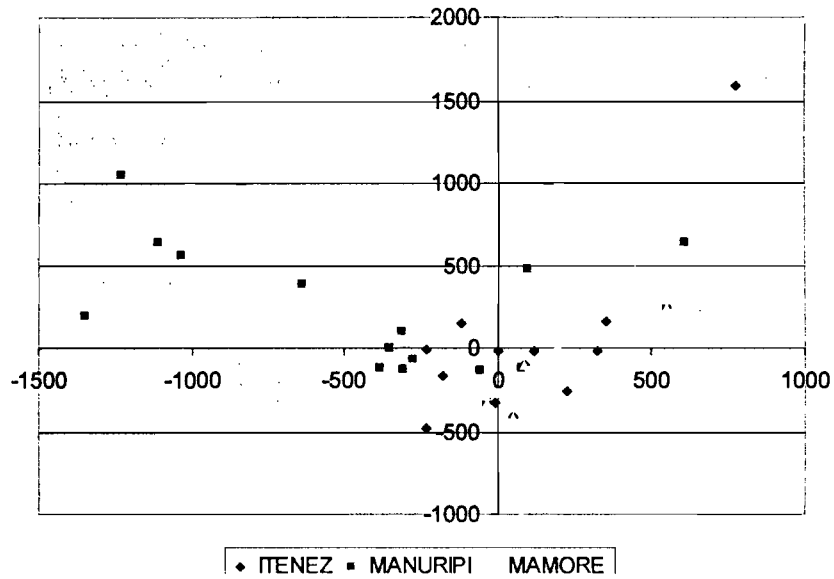


Fig. 3. Análisis factorial de correspondencia (AFC) por isoenzimas de poblaciones pertenecientes a tres cuencas para *P. fasciatum*. distribución sobre un plan factorial para los ejes 1 (inerencia 15,84%) y 2 (inerencia 12,71%). existe en la población de manuripi la formación de un cluster.

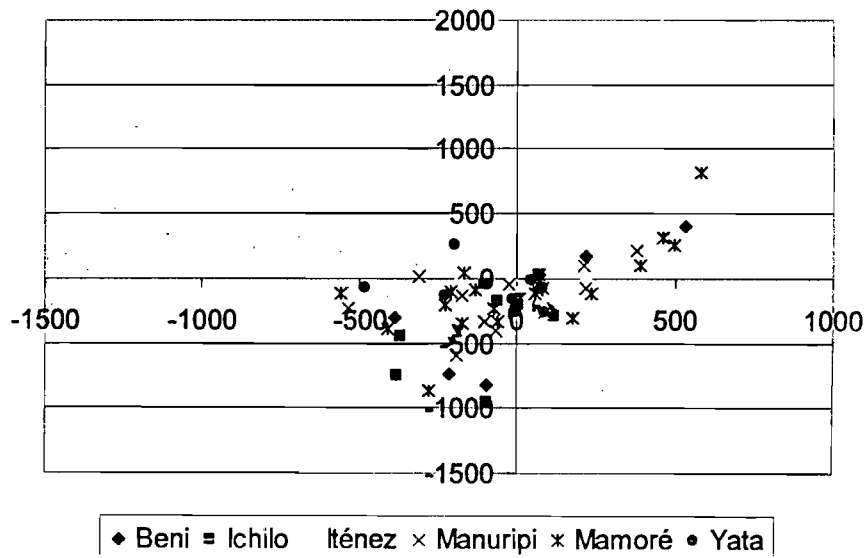


Fig. 4. Análisis gráfico del AFC de poblaciones por intrones pertenecientes a cuatro cuencas para *P. fasciatum* distribución factorial sobre los ejes 1 (inerencia 14,56%) y 2 (inerencia 8,28%). no se observan clusters en las poblaciones geográficas

VII.3.6 Distribución de individuos entre los clusters definido por Asignamiento Poblacional para *Pseudoplatystoma fasciatum*

Bajo el criterio de partición de este modelo, es posible verificar la existencia de tres clusters para *P. fasciatum* con diferencias significativas entre ellos, cada cluster está conformado por individuos de diferentes ríos. En los tres clusters existe gran proporción de individuos del Iténez lo que sugiere la existencia de varias subpoblaciones. Por otra parte individuos de Yata sólo se encuentran en dos clusters probablemente esta población no tenga gran capacidad migratoria. El cálculo de F_{is} para los tres grupos demuestra un desequilibrio de Hardy- Weinberg en cada subpoblación, excepto para Yata del segundo cluster ($F_{is} = - 0.015$).

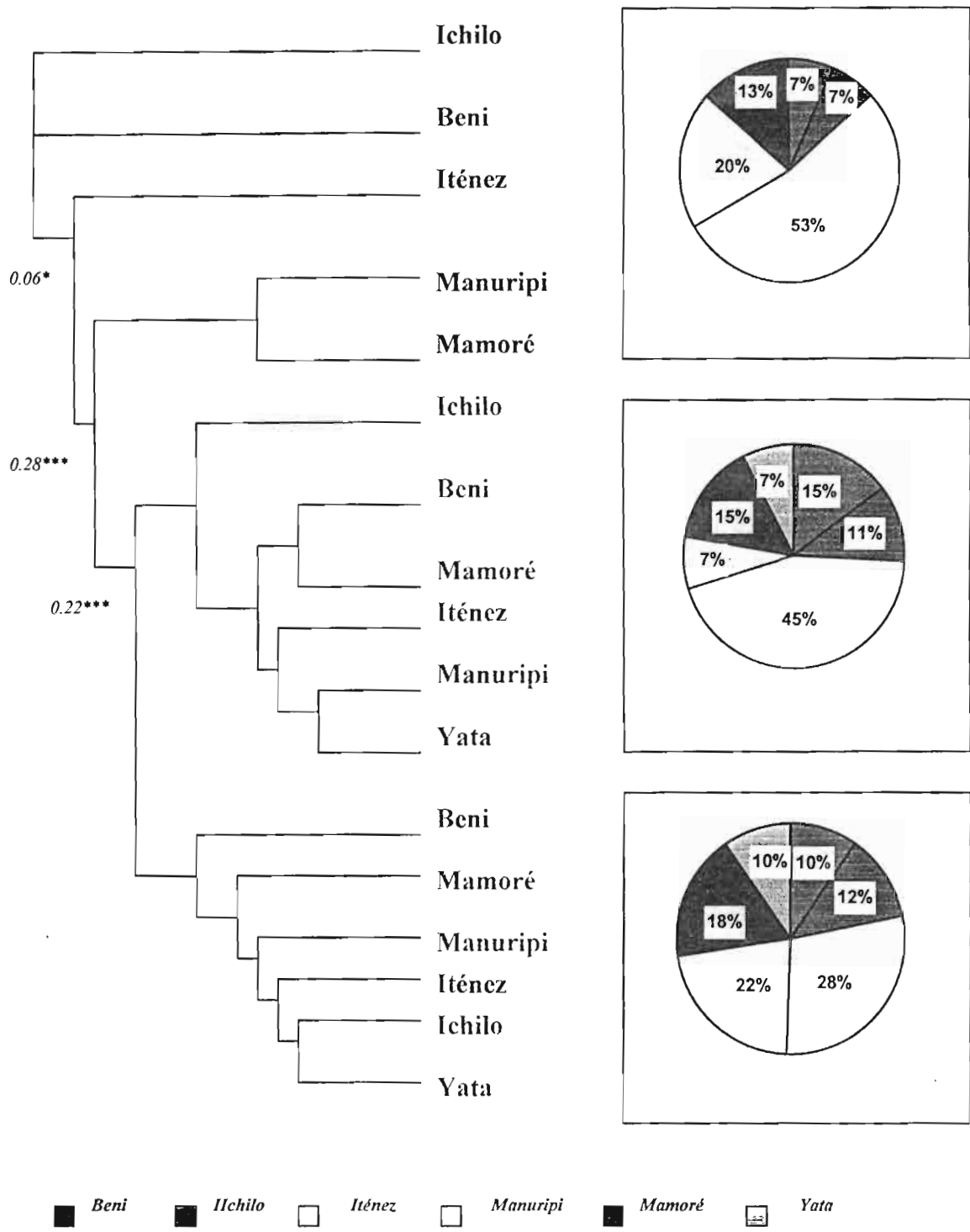


Fig. 5 Dendrograma realizado a partir de los datos de distancias genéticas para *P. fasciatum*. Los valores en cada nudo son valores estimados por F_{st} . Significatividad a (*) $p < 5\%$, (**) $p < 1\%$, (***) $p < 0.1\%$

VII.4 Polimorfismo intraespecífico: *Pseudoplatystoma tigrinum*

VII.4.1 Variabilidad genética

Las frecuencias alélicas para los loci polimórficos son expuestas en la **tabla 15** para isoenzimas, en la **tabla 17** se tienen las frecuencias alélicas obtenidas por intrones.

Las medidas de variabilidad genética obtenidas se dan en la **tabla 16** y **18** por enzimas e intrones respectivamente. La tasa de polimorfismo a la P(95%) es de 0.56 para el Iténez y Mamoré, para el Manuripi es de 0.78; a un P(99%) se tiene 0.67 para el Iténez y 0.78 para el Manuripi y Mamoré. Los valores del polimorfismo por intrones son de 0.67 para Mamoré e Ichilo y de 1.00 para Beni, Iténez y Manuripi. La diversidad alélica por isoenzimas es de 1.89; 1.78 y 2.00 para el Iténez Manuripi y Mamoré respectivamente. Por intrones se obtiene un mayor número de alelos como se observa en la tabla 17 con valores que varían entre 2.00 a 3.60 (Mamoré y Manuripi). La tasa de heterocigosidad observada por isoenzimas va de 0.18; 0.21 y 0.22 para el Mamoré, Manuripi e Iténez respectivamente. Para intrones, las tasas de heterocigosidad observada van de 0.15; 0.16; 0.19 y 0.24 para Mamoré, Manuripi, Ichilo, Iténez y Beni respectivamente. Como se observa los valores de la heterocigosidad esperada (heterocigosidad teórica) son superiores a la heterocigosidad observada por ambos marcadores (valores mayores en intrones) indicando la existencia de varias poblaciones.

Tabla 15. Frecuencias alélicas para 3 poblaciones de *P. tigrinum* (Isoenzimas)

Loci	Iténez	Manuripi	Mamoré
Aat 2 (N)	17	5	22
98	0.00	0.60	0.05
100	1.00	0.40	0.96
H exp.	0.00	0.48	0.09
H n.b.	0.00	0.53	0.09
H obs.	0.00	0.00	0.00
ldh2 (N)	15	5	22
100	0.50	0.70	0.59
118	0.33	0.30	0.34
131	0.16	0.00	0.07
H exp.	0.61	0.42	0.53
H n.b.	0.63	0.47	0.54
H obs.	0.53	0.60	0.59
Pgi 1 (N)	18	4	22
4	0.61	0.62	0.66
100	0.39	0.38	0.34
H exp.	0.48	0.47	0.45
H n.b.	0.49	0.53	0.46
H obs.	0.67	0.25	0.50
Pgi2 (N)	18	4	21
90	0.00	0.00	0.05
100	0.86	0.88	0.90
108	0.14	0.12	0.05
H exp.	0.24	0.22	0.18
H n.b.	0.25	0.25	0.18
H obs.	0.28	0.25	0.10

Loci	Iténez	Manuripi	Mamoré
Mdh2 (N)	18	5	22
85	0.50	0.30	0.36
100	0.50	0.70	0.63
H exp.	0.50	0.42	0.46
H n.b.	0.51	0.47	0.47
H obs.	0.44	0.60	0.36
Pgm (N)	18	4	22
120	1.00	1.00	1.00
H exp.	0.00	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.00
Me 1 (N)	18	5	21
450	1.00	1.00	1.00
H exp.	0.00	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.00
Me 2 (N)	17	5	21
100	0.03	0.10	0.02
119	0.97	0.90	0.98
H exp.	0.06	0.18	0.05
H n.b.	0.06	0.20	0.05
H obs.	0.06	0.20	0.05
6Pgdh (N)	13	5	18
84	0.08	0.20	0.00
92	0.46	0.00	0.33
100	0.46	0.80	0.67
H exp.	0.57	0.32	0.44
H n.b.	0.59	0.36	0.46
H obs.	0.00	0.00	0.00

Tabla 16. Variabilidad genética de 3 poblaciones de *P. tigrinum* (Isoenzimas)

	He	H n.b.	Ho	P(0.95)	P(0.99)	A
Iténez	0.27	0.28	0.22	0.56	0.67	1.89
Manuripi	0.28	0.31	0.21	0.78	0.78	1.78
Mamoré	0.24	0.25	0.18	0.56	0.78	2.00

(He): Heterocigosidad esperada; (Ho): Heterocigosidad observada; (P): Tasa de polimorfismo; (A): Diversidad alélica

Tabla 17. Frecuencias alélicas para 5 poblaciones de *P. tigrinum* (Intrones)

Loci	Beni	Ichilo	Iténez	Manuripi	Mamoré
Mhc 1 (N)	10	9	22	14	20
398	0.10	0.00	0.04	0.07	0.00
467	0.00	0.00	0.07	0.07	0.00
480	0.10	0.00	0.02	0.07	0.00
584	0.80	1.00	0.86	0.78	1.00
H exp.	0.34	0.00	0.25	0.37	0.00
H n.b	0.36	0.00	0.25	0.38	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.09	0.14	0.00
Rpex 1 (N)	10	13	22	13	20
120	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00
136	0.05	0.00	0.16	0.00	0.00
169	0.70	0.31	0.66	0.58	0.52
175	0.20	0.35	0.14	0.38	0.37
186	0.05	0.31	0.00	0.00	0.00
603	0.00	0.04	0.04	0.00	0.10
H exp.	0.46	0.69	0.52	0.52	0.57
H n.b	0.49	0.72	0.53	0.54	0.59
H obs.	0.40	0.15	0.32	0.08	0.25
Pmopsi 1(N)	9	9	20	12	20
200	0.33	0.72	0.72	0.67	0.60
220	0.44	0.28	0.27	0.25	0.40
900	0.05	0.00	0.00	0.04	0.00
990	0.17	0.00	0.00	0.04	0.00
H exp.	0.67	0.40	0.40	0.49	0.48
H n.b	0.70	0.42	0.41	0.51	0.49
H obs.	0.33	0.33	0.15	0.25	0.20

(N): Número de individuos analizados por loci

Tabla 18. Variabilidad genética de 5 poblaciones de *P. tigrinum* (Intrones)

	He.	H n.b.	Ho.	P (0.95)	P (0.99)	A
Beni	0.49	0.51	0.24	1.00	1.00	3.67
Mamoré-Ichilo	0.36	0.38	0.16	0.67	0.67	2.33
Iténez	0.39	0.40	0.19	1.00	1.00	3.33
Manuripi	0.46	0.48	0.16	1.00	1.00	3.67
Mamoré-Sécure	0.35	0.36	0.15	0.67	0.67	2.00

(He): Heterocigosidad esperada; (Ho): Heterocigosidad observada; (P): Tasa de polimorfismo; (A): Diversidad alélica

VII.4.2 Diferencia a la panmixia

La estimación del F_{is} entre las tres poblaciones estudiadas por isoenzimas muestra para la población del Iténez, Manuripi y Mamoré un valor de 0.23, 0.35 y 0.30 respectivamente. En cada cuenca, las poblaciones presentan una diferencia a la panmixia con un déficit en heterocigotos, indicando varias poblaciones. Los valores de F_{is} por intrones nos muestran para Beni, Ichilo, Iténez, Manuripi, Mamoré: 0.54, 0.58, 0.54, 0.68, 0.58 respectivamente, lo que confirma una deficiencia de heterocigotos con la presencia de varias subpoblaciones.

VII.4.3 Diferencia Inter-sitios

La estimación del F_{st} para las tres poblaciones (tabla 19) estimado por isoenzimas muestra valores significativos para población el Manuripi respecto al Iténez 0.13 y un valor de 0.08 respecto al Mamoré, indicando una diferenciación de la población del Manuripi como se observa también en *P. fasciatum*. Sin embargo, los resultados obtenidos por intrones no revelan ningún valor significativo (tabla 20) aunque existe moderada diferenciación entre las poblaciones de Beni e Ichilo mayor que entre Ichilo e Iténez.

Tabla 19. Cálculo del F_{st} para tres poblaciones de *P. tigrinum* (Isoenzimas)

F_{st}	Manuripi	Mamoré
Iténez	0.13*	0.00
Manuripi		0.081

$p < 5\%$

Tabla 20. Cálculo del F_{st} para 5 poblaciones de *P. tigrinum* (Intrones)

F_{st}	Ichilo	Iténez	Manuripi	Mamoré
Beni	0.09	0.03	0.00	0.03
Ichilo		0.07	0.02	0.02
Iténez			0.01	0.03
Manuripi				0.01

VII.4.4 Distancia genética entre sitios y flujo génico

Los valores en las tres poblaciones en cuanto al flujo génico son 1.68 para Manuripi-Iténez. Según el análisis por intrones, el flujo génico muestra valores hasta el infinito entre Manuripi-Mamoré y Manuripi-Iténez.

VII.4.5 Análisis factorial de correspondencia

Este análisis de correspondencia no permite establecer una estructuración genética de esta especie, no se observa la formación de clusters entre las diferentes poblaciones por ambos marcadores moleculares.

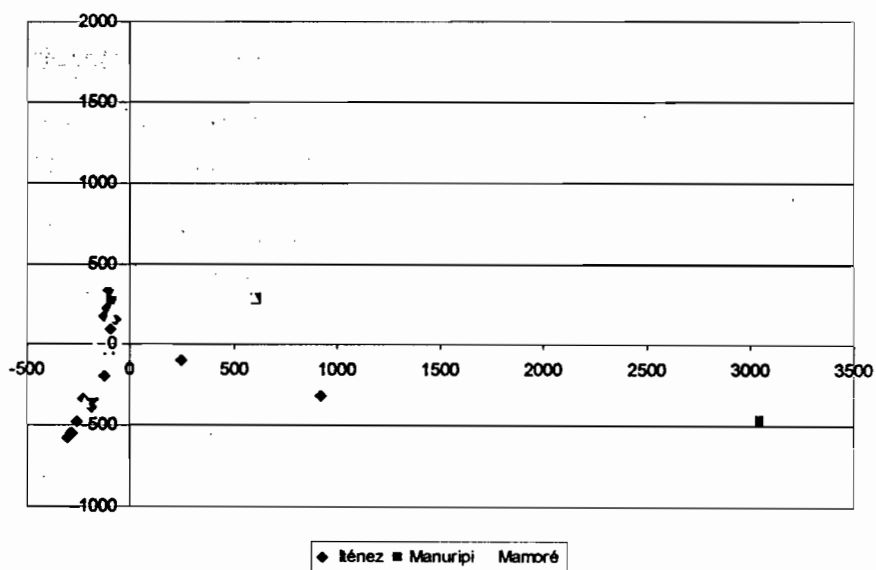


Fig. 6. Análisis gráfico del AFC de poblaciones pertenecientes a tres cuencas para *P. tigrinum* obtenido en función de sus genotipos alélicos por isoenzimas, distribución sobre un plan factorial para los ejes 1 (inercia 24,27%) y 2 (17,29%). No muestra clusters de las poblaciones geográficas.

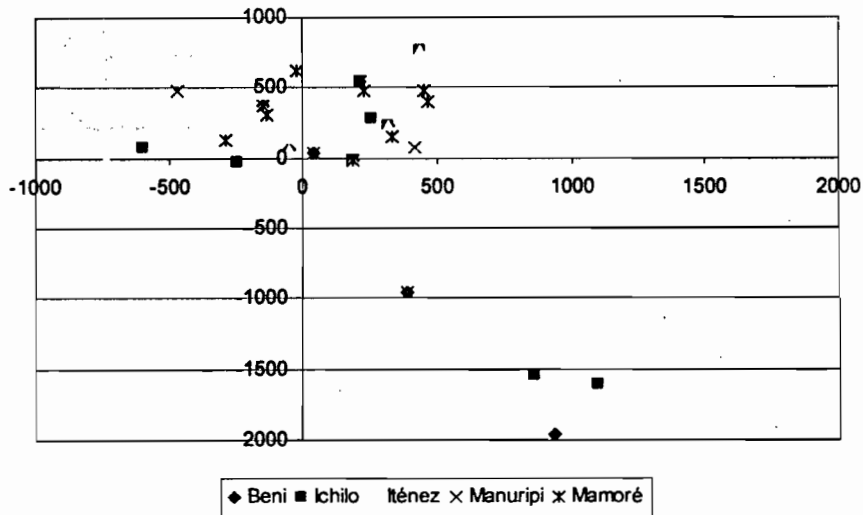


Fig. 7. Análisis gráfico del AFC de poblaciones pertenecientes a cuatro cuencas para *P. tigrinum* obtenido por intrones en función a sus genotipos alélicos. Presenta una distribución sobre un plan factorial de eje 1 (inercia 17%) y 2 (14,43%). No muestra clusters de las poblaciones geográficas

VII.4.6 Distribución de individuos entre los clusters definido por Asignamiento Poblacional en *Pseudoplatystoma tigrinum*

La partición de esta población, ha establecido la existencia de 4 clusters con diferencias significativas, al igual que en *P. fasciatum* los cuatro clusters se hallan conformados por individuos de diferentes ríos. Tres de ellos tienen significativa proporción de individuos de Iténez, Ichilo y Mamoré para el cluster 1, 3 y 4 respectivamente. El cluster 2 está conformado por igual proporción de individuos. Realizando el cálculo de F_{is} para los 4 clusters, se pudo observar que las subpoblaciones se encuentran en desequilibrio con valores de 0.56, 0.57 y 0.43 para las subpoblaciones de Iténez, Manuripi y Mamoré respectivamente del cluster 3.

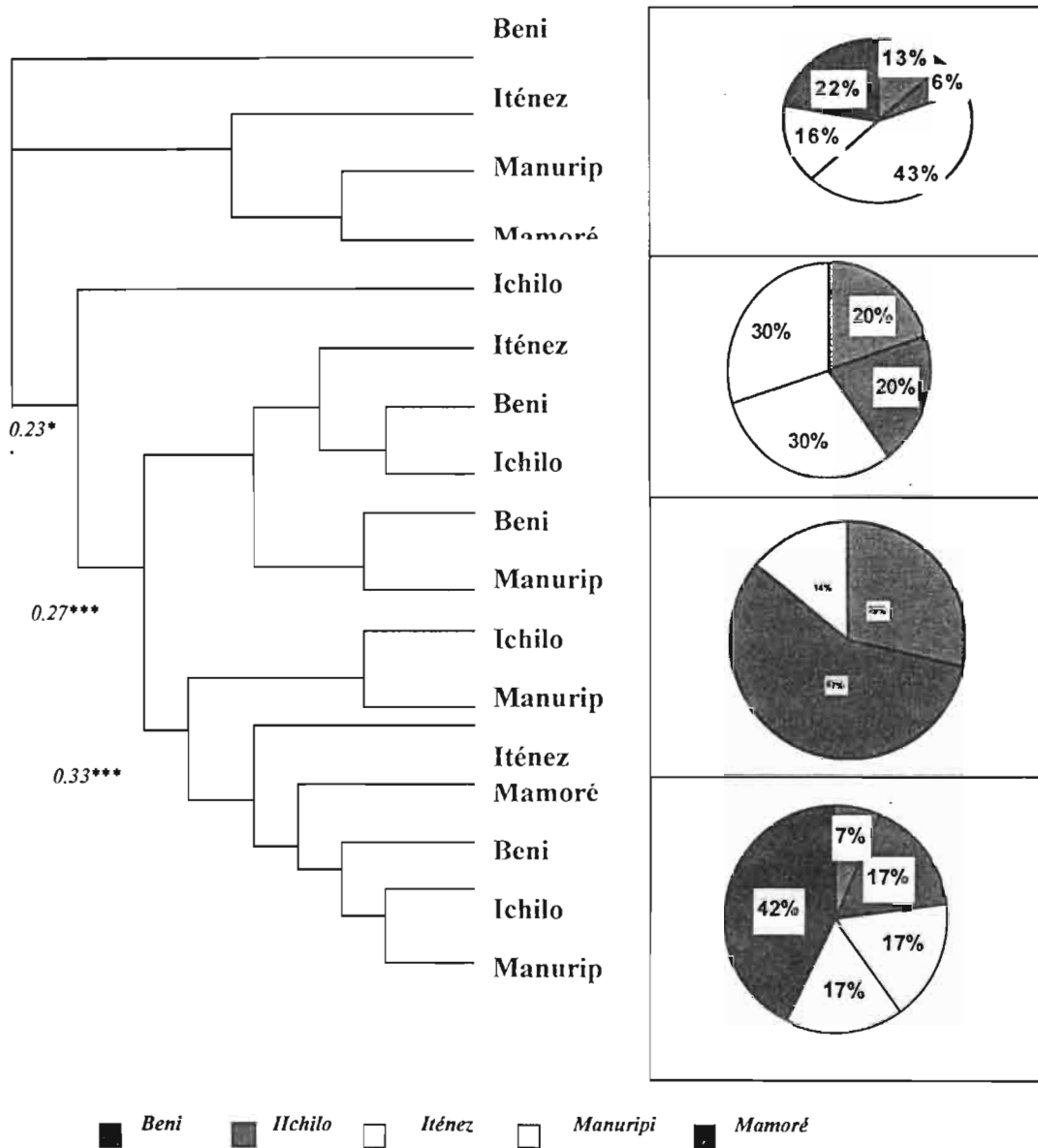


Fig. 8 Dendrograma realizado a partir de los datos de distancias genéticas para *P. tigrinum*. Los valores en cada nudo son valores estimados por F_{st} . Significatividad a (*) $p < 5\%$, (**) $p < 1\%$, (***) $p < 0.1\%$

VII.5 Polimorfismo intracuenca: Cuenca del Iténez: Río San Joaquín (*Pseudoplatystoma tigrinum*)

Para el análisis de las muestras obtenidas de las distintas localidades o sitios de muestreo al interior de cada cuenca (Mamoré, Iténez y Orthón) para cada especie, no se cuenta con un número suficiente de individuos. Sin embargo un hecho interesante se presenta en los individuos analizados para *Pseudoplatystoma tigrinum* en el río San Joaquín (cuenca del Iténez).

VII.5.1 Variabilidad genética

Las frecuencias alélicas para los loci polimórficos son expuestas en la **tabla 21**, las medidas de variabilidad genética obtenidas se dan en la **tabla 22**. La tasa de polimorfismo a P(95 y 99%) es de 0.44 para ambos grupos. La diversidad alélica para los dos grupos es de 1.44 para el grupo 1 y 1.56 para el grupo 2. Los valores de la heterocigosidad observada es de 0.16 para el Grupo 1 y 0.24 para el Grupo 2.

Tabla 21. Frecuencias alélicas para cada grupo

Loci	Grupo 1	Grupo 2
Aat2 (N)	5	6
100	1.00	1.00
H exp.	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00
Mdh2 (N)	5	6
85	0.60	0.50
100	0.40	0.50
H exp.	0.48	0.50
H n.b.	0.53	0.55
H obs.	0.40	0.33
Pgil (N)	5	6
4	0.70	0.50
100	0.30	0.50
H exp.	0.42	0.50
H n.b.	0.47	0.55
H obs.	0.60	0.67
Pgi2 (N)	5	6
100	0.80	0.92
108	0.20	0.08
H exp.	0.32	0.15
H n.b.	0.36	0.17
H obs.	0.40	0.17
Pgm(N)	5	6
120	1.00	1.00
H exp.	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00

Loci	Grupo 1	Grupo 2
ldh2 (N)	3	6
100	1.00	0.17
118	0.00	0.50
131	0.00	0.33
H exp.	0.00	0.61
H n.b.	0.00	0.67
H obs.	0.00	1.00
Me1 (N)	5	6
450	1.00	1.00
H exp.	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00
Me2(N)	5	6
119	1.00	1.00
H ex .	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00
6Pgdh (N)	5	5
84	0.20	0.00
92	0.00	1.00
100	0.80	0.00
H exp.	0.32	0.00
H n.b.	0.36	0.00
H obs.	0.00	0.00

Tabla 22. Variabilidad genética de los dos grupos

	He.	H n.b.	Ho.	P(0.95)	P (0.99)	A
Grupo 1	0.17	0.19	0.16	0.44	0.44	1.44
Grupo 2	0.200	0.21	0.24	0.44	0.44	1.56

(He): Heterocigosidad esperada; (Ho): Heterocigosidad observada; (P): Tasa de polimorfismo; (A): Diversidad alélica

VII.5.2 Diferencia a la panmixia

La estimación del F_{is} muestra un valor de 0.20 para el Grupo 1 y para el Grupo 2 muestra un valor -0.14 lo que indica la presencia de un exceso de heterocigotos.

VII.5.3 Diferencia Intra-sitios

La estimación del F_{st} para los dos grupos denota un valor significativo de 0.39 lo que demuestra una diferenciación significativa entre estas poblaciones.

VII.5.4 Distancia genética entre sitios y flujo génico

Entre los dos grupos A y B se observa un bajo nivel de flujo génico, con un valor de 0.39, lo que explicaría la diferenciación significativa entre estas subpoblaciones.

VII.5.5 Análisis factorial de correspondencia

Por este análisis intersitio es posible observar la formación de clusters uno en cada eje lo que supone una posible especiación en esta población.

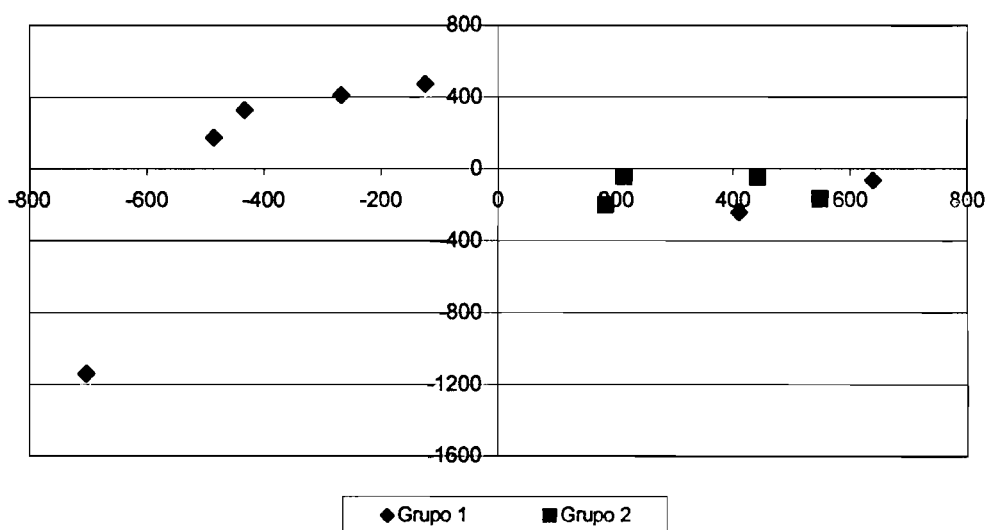


Fig. 9. El Análisis Factorial de Correspondencia distingue a dos clusters genéticos: La entidad A (grupo 1) y la entidad B (grupo 2) para el río San Joaquín. Distribución factorial en dos ejes 1 (inerencia 36%) y 2 (inerencia 27,41%).

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Variabilidad genética entre especies

La presencia de variabilidad genética entre especies (entre poblaciones y entre individuos de las poblaciones) es esencial para su sobrevivencia y para responder a los cambios ambientales a corto y largo plazo en la naturaleza (Ryman *et al*, 1995). Este trabajo dirigido al estudio de individuos de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* de las 4 principales cuencas de la Amazonía boliviana, observa en la expresión fenotípica de los genes nucleares dependientes de la recombinación genética en proteínas de 9 sistemas enzimáticos, una alta diferenciación genética entre estas dos especies que viven en simpatria en la Cuenca Amazónica boliviana. Asimismo los análisis genéticos de AFC y F_{is} realizados para isoenzimas demuestran una clara diferenciación genética entre las dos especies en todas las Cuencas en estudio con ausencia de híbridos en sus poblaciones. Con dicho descriptor molecular se puso en evidencia la existencia de un sólo loci diagnóstico: Me-1 el cual permite diferenciar las dos especies. En cambio por la técnica EPIC-PCR, se puso en evidencia un número de 9 loci diagnóstico: *Aldo B - 1*, *Aldo C - 1*, *Aldo C - 2*, *Calmex-1*, *Calmex-2*, *Gh-1*, *Chy-1*, *Chy-2*, *Chy-3* por lo que ésta técnica se constituye en una herramienta poderosa para diferenciar especies estrechamente relacionadas. Las características morfológicas utilizadas tradicionalmente para diferenciar estas dos especies como forma de la cabeza y patrones de coloración pueden ser considerados parámetros de referencia para su diferenciación.

El análisis con el estimador F_{st} para las dos especies con ambos descriptores moleculares demuestran valores significativos considerándose entonces, entidades con estructuraciones particulares aisladas genéticamente (Coronel, 2000; Escóbar, 2001). Los niveles de flujo génico en isoenzimas de 0.20 y 0.47 por intrones puede deberse a que éstas especies comparten alelos de ancestros comunes por una diferenciación y radiación reciente en la amazonía boliviana (Rivera, 2003). El carácter migratorio de estas especies es un factor facilitador del flujo genético, que puede ser co-responsable de la alta homogeneidad encontrada en las poblaciones estudiadas.

La variabilidad genética traducida como heterocigosidad observada en este estudio fue de 0.13 con isoenzimas y 0.33 con intrones para *P. fasciatum*, comparando estos datos a los

obtenidos en estudios isoenzimáticos previos sobre la misma especie, éstos son notablemente mayores - 0.026 y 0.013 en el río Beni e Ichilo respectivamente - (Coronel, 2002). En la cuenca del río Magdalena y en la cuenca del río Orinoco valores de 0.002 a 0.0054 y 0.049 respectivamente (Escóbar, 2001, Gallo, 2003). Asimismo, los niveles de variabilidad genética obtenidos para *P. tigrinum* por isoenzimas es de 0.20 y por intrones de 0.15 son elevados en relación a otros estudios como en la Cuenca del río Orinoco 0.059 (Escóbar, 2001). El promedio general de variabilidad genética en especies de agua dulce es de 0.26. Estos niveles elevados de heterocigosidad de *Pseudoplatystoma* de la Cuenca amazónica boliviana observados en ambos marcadores moleculares, en relación a otros estudios pueden deberse a distintos sistemas isoenzimáticos utilizados por los autores. También es probable que estos valores demuestren la alta capacidad evolutiva de estas especies a responder cambios ambientales a largo plazo (Hartl, 1997). El hábitat en el que se desarrollan *P. fasciatum* y *P. tigrinum* requiere de adecuadas estrategias de vida que les permitan sobrevivir a las condiciones ambientales de la Cuenca Amazónica boliviana como clima diverso, ciclo hidrológico propio que determina cambios fisicoquímicos que repercuten en la distribución y composición de las especies. Es notable la diferencia de variabilidad genética entre los dos descriptores moleculares debido a que los intrones presentan una mayor tasa de evolución que da la imagen de una evolución más reciente que las isoenzimas, demostrando varias ventajas para identificar y caracterizar individuos altamente emparentados, además los intrones ofrecen información de mutaciones más recientes que las isoenzimas. (Vos *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1996). En ambos marcadores se observan fenómenos evolutivos que acontecieron en tiempos diferentes, donde la tasa de evolución es mayor para intrones (no codificante) que para isoenzimas (codificante). Para confirmar y profundizar esta información se pueden seleccionar otros marcadores moleculares de mayor resolución como microsatélites o secuenciación de estas regiones intrónicas. Sin embargo, se puede considerar de acuerdo a los resultados obtenidos, que los intrones sirven para realizar diferenciaciones altamente significativas entre especies, pero evidencias de una mejor estructuración intraespecífica nos han sido dados por isoenzimas en las dos especies especialmente en *Pseudoplatystoma tigrinum*, como el caso del río San Joaquín.

VIII.2 Variabilidad genética en cada especie

En las dos especies *P. fasciatum* y *P. tigrinum*, existe un déficit de heterocigotos con respecto a las proporciones Hardy-Weinberg, que se observa al considerar conjuntamente todas las subpoblaciones. En las especies que muestran una elevada capacidad de migración durante al menos uno de sus periodos de su ciclo vital, algunas zonas de su rango de distribución pueden ser áreas de mezcla entre diferentes subpoblaciones (como se observa en los resultados por Asignamiento Poblacional que otorga una probabilidad del 5% de que existan estos clusters) los que difieren en las frecuencias génicas para un número de loci, entonces en estas áreas se detecta un defecto de heterocigotos y un correspondiente exceso de homocigotos originado probablemente por el efecto Wahlund (Santos, 1997).

Este fenómeno puede ser explicado por dos probables hipótesis: 1) que existan evidentemente varias subpoblaciones o formación de nuevas especies ó 2) que éste fenómeno esté relacionado con los rasgos de vida de estas especies, es decir éstas migran hacia determinados hábitats en la época de desove, sin embargo pueden regresar a su hábitat original y cruzar no aleatoriamente entre grupos familiares lo que produce este desequilibrio entre las poblaciones.

Según los estimadores F_{st} para ambas especies *P. fasciatum* y *P. tigrinum* por isoenzimas muestran diferenciación significativa para la población del río Manuripi, el cual representa una unidad independiente y difiere significativamente de las poblaciones de los ríos Iténez y Mamoré, en tanto que entre estas poblaciones no existen diferencias genéticas significativas.

Los clusters obtenidos por Asignamiento Poblacional muestran como el AFC en cada especie, la mezcla de individuos independiente de su origen indicando la presencia de varias poblaciones genéticas confirmada con la estructuración intrasitio del Río San Joaquín observada en *P. tigrinum*, es decir existen varias poblaciones de individuos en un mismo río determinando una débil estructuración y varias subpoblaciones genéticas en ambas especies.

VIII.3 Variabilidad genética intracuena

Por isoenzimas, los análisis genéticos como el AFC y F_{is} para *P. tigrinum* pone en evidencia que en el río San Joaquín existen dos entidades que se diferencian formando dos clusters. Los estimadores de F_{st} muestran diferencias significativas que supone un proceso de estructuración incipiente. Sin embargo es probable que para este descriptor el número de muestras haya sido insuficiente razón por la cual no se reproduce este hecho utilizando intrones o puede estar relacionado con la presencia de grupos aparentados o “poblaciones ecológicas” observadas por Coronel (2000) entre poblaciones de varias lagunas y ríos.

IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Por ambos marcadores moleculares se obtuvo una clara diferenciación genética entre las dos especies a lo largo de la Cuenca Amazónica boliviana, corroborando los datos hallados en estudios previos parciales de la misma, constituyéndose en dos grupos genéticamente distintos. Se encontró un mayor número de loci diagnóstico por intrones demostrando la eficiencia de esta técnica para diferenciar especies altamente emparentadas. El nivel de polimorfismo hallado por intrones es mayor que por isoenzimas y estos a su vez son mayores a los encontrados en otros estudios sobre las mismas especies.

A nivel intraespecífico, por isoenzimas la población de la Cuenca del Manuripi en las dos especies representa una unidad individualizada del resto de las poblaciones, estos resultados contrastan con los datos obtenidos por intrones donde no se observan heterogeneidad de las subpoblaciones en ninguna de las especies demostrando una diferencia de expresión del marcador molecular que da una imagen de procesos evolutivos que acontecieron en tiempos diferentes, más recientes para intrones que para isoenzimas. La homogenización de las subpoblaciones a lo largo de toda la Cuenca amazónica demostrado por intrones se debe principalmente al carácter migratorio de las especies en estudio.

Para profundizar el estudio de estas especies y determinar posibles estructuraciones genéticas se debe hacer uso de un mayor número de intrones que nos revelen mayor variabilidad genética, también se puede utilizar marcadores de mayor resolución como microsatélites y secuenciación de regiones intrónicas para obtener información ancestral y presente.

Se pueden correlacionar las hipótesis de rasgos de vida de las especies en estudio, principalmente con los movimientos migratorios, comportamiento, edad y su estructuración en cada río, en forma experimental.

Los resultados de este estudio son una guía para la elección de cepas en la piscicultura considerando la estructuración genética de ínter e intracuenca ya que estas especies pueden constituirse en una gran potencial económico debido a su alto valor comercial.

X. BIBLIOGRAFÍA

- ALMEIDA, F., KOELBLINGER, L. 2003. *Population structure analysis of Pimelodus maculatus (Pisces, Siluriformes) from the Tiete and Paranapanema Rivers (Brazil)* Genetics and Molecular Biology. 26: 3, 301-305.
- ALMEIDA, C., & ABREU, F. 2003. *Dynamical instabilities lead to sympatric speciation.* Evolutionary Ecology, 5: 739-757.
- AYALA, F. J.; RIGER, J.A. 1984. *Genética Moderna.* Fondo Educativo Interamericano. Barcelona, España.
- BECERRA, V., M. PAREDES. 2000. *Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética.* Agricultura Técnica. Chile. 60(3): 270-281.
- BELKHIR, K., BORSA, P., GOUDET, J., CHIKHI, L., BONHOMME, F. 1996. *GENETIX, logiciel sous Windows pour la genétique des populations.* Version 4.04. Université Montpellier II, Montpellier, France.
- BERNATCHEZ, L., & WILSON, C. 1998. *Comparative phylogeography of nearctic and palearctic.* Molecular Ecology. 7. 431-452.
- BIERNE, N., LEHNERT, A., BEDIER, E., BONHOMME, F., & MOORE, S. 2000. *Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC-PCR).* Molecular Ecology. 9: 233-235.
- BRADLEY, R., & HILLIS, D. 1997. *Recombinant DNA sequences generated by POR amplification.* Mol. Biol. Evol. 14: 592-593.
- BOURGES, L.; HOORELBEKE, R. "Variation du régime des écoulements dans le système ando-amazonien de Bolivie". En Le Barbe, L.; Servat, E. 1995. Régionalisation en hydrologie. Application au développement. Colloques et séminaires. ORSTOM, Paris. 571 p.
- BOURREL, L., S. MOREAU y PHILIPS, L. 1999. "Dinámica de las inundaciones en la cuenca amazónica boliviana. Rey. Bol. de Ecología. 6:5-7.

BRITSK, HERALDO A.; SILIMON S., K.; LOPES B., S. 1999. *Peixes do pantanal, Manual de identificação*. EMBRAPA.

BUSH, M. 1994. *Amazonian speciation: a necessarily complex model*. Journal of Biogeography 21, 5-17.

CALCAGNOTTO, D., RUSSELLO, M., DESALLE, R. 2001. *Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other *Serrasalminae* fish*. Molecular Ecology Notes. 1: 245-247.

CHECA, M.L, VEGA, J.L.1998. Distribución de la variabilidad genética en poblaciones de ponis españoles: Resultados preliminares. Arch. Zootec. 47: 169-174. CHOQUECALLATA, J. 2004. *Variabilidad genética de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* de la cuenca amazónica boliviana por electroforesis enzimática*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad Técnica del Beni. Bolivia.

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

CHOW, S. 1998. *Universal PCR primer for calmodulin gene intron en fish*. Fisheries Science. 64: 999-1000.

CORDIVIOLA, E. 1966. Nuevos aportes al conocimiento e la biología pesquera del “surubi” (*P. coruscans*) en el Paraná medio (Pisces, Siluriformes). PHYSIS, Bs. As. tomo XXVI, nº 71. 237-244 p.

CORONEL, J. 2001. *Population genetics of three species of Pimelodidae (*Brachyplatystoma flavicans*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, and *Pseudoplatystoma tigrinum*) in the river Ichilo and Beni, Bolivia*. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales, MEMI-UMSS, Cochabamba-Bolivia. pp.65

CORVIN, D.; GUYOT, J.L.; CALLE, H.; QUINTANILLA, J. 1988. Datos físico-químicos de los medios acuáticos de la zona del Mamoré central. Región de Trinidad Amazonia boliviana, Informe N° 8. Convenio UTB-CORDEBENI-ORSTOM.

Cummings, M., Klug. W., 1998. Conceptos de Genética. Quinta Edición Editorial Barcelona. Impreso en España.

DAHL, G. 1971. Los peces del norte de Colombia. Ministerio de Agricultura, Instituto de Desarrollo de los Recursos Naturales Renovables INDERENA. Bogotá, Colombia.

DA SILVA, M., & PATTON, J. 1998. *Molecular phylogeography and the evolution and conservation of amazonian mammals*. *Molecular Ecology*, 7: 475-486.

DIECKMANN & DOEBELL. 1999. *On the origin of species by sympatric speciation*. *Nature*, 400.

DOYLE, J. J., J. L., 1987. *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. *Phytochem. Bull.*, 19: 11-15.

ESCOBAR, M. D.; TAPHORN, D. 2001. *Genetic Structure of Populations of Pseudoplatystoma fasciatum and Pseudoplatystoma tigrinum (Siluriformes: Pimelodidae) in the Orinoco Basin of Venezuela, and their Management as a Fishery Resource*. Postgrado: Manejo de los Recursos Naturales. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales "Ezequiel Zamora" UNELLEZ, Guanare.

FAO/PNUMA. 1984. Conservación de los recursos genéticos de los peces: problemas y recomendaciones. Informe de la Consulta de Expertos sobre los recursos genéticos de los peces. FAO Doc.Téc.Pesca, (217):42 p.

FERREIRA, J.G.; ZUANON, AS.; 1998. *Peixes Comerciais do Médio Amazonas: Região de Santarém, Pará*. Ministerio do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazonia. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Edição IBAMA-Brasil.

FENOCCHIO, AS., A.C. BERTOLLO. 1992. *Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region*. *CYTOBIOS*. Vol. 69, nº 276, 41-46 p.

FISCH-MULLER, S.F. 1999. *Systématique du genre Ancistrus Kner (Teleostei, Loricariidae): approches morphologique et génétique*. Thèse présentée a la Faculté des sciences de

l'Université de Genève pour obtenir le grade de Docteur ès sciences, mention biologique. These N°3072.

France, S., Tachino, N., Duda, T., Shleser, R., & Palumbi, S., 1999. *Intraespecific genetic diversity in the marine shrimp *Penaeus vannamei*: multiple polymorphic elongation factor-1 alfa loci revealed by intron sequencing*. Marine Biotechnology. 261-268.

FRYER, G. 1969. *Speciation and adaptive radiation in African lakes*. Verh. Internat. Verein. Lomnol. 17: 303-322.

FUTUYMA, D. 1986. *Evolutionary biology*. Sunderland, Massachusetts. Sinauer Associates. 2da edition. 600.

GALETTI, P.M. 1998. *Chromosome diversity in neotropical fishes: NOR studies*. Ital. J. Zool. 65. suppl.: 53-56. GALLO, H & J. DIAZ SARMIENTO. 2003. Variabilidad genética del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum*, (Pises: Pimelodidae) en el río Magdalena (Colombia). Rev. Acad. Colomb. Cienc. 27 (105): 559-605

GALLO, H & J. DIAZ SARMIENTO. 2003. Variabilidad genética del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum*, (Pises: Pimelodidae) en el río Magdalena (Colombia). Rev. Acad. Colomb. Cienc. 27 (105): 559-605.

GAZEL, C. 1999. *Variabilité génétique de formes cavernicoles et épigees de *Trichomycterus* (Teleosteens, Siluriformes) de la région de Torotoro (Potosí, Bolivia). Effet de l'habitat sur la structuration génétique des populations* Diplôme d'Etudes Approfondies. Université de Provence Aix-Marseille I. 25 p.

GOULDING, M., SMITH, N.J.H. and MAHAR, D. (1997). *Floods of Fortune: Ecology and Economy Along the Amazon*. Columbia University Press, New York. 184 pp.

GUYOT, J.L. 1993. *Hidrogeoquímica des fleuves de l'Amazonie Bolivienne*. Etudes et Theses. ORSTOM, Paris, 261 p.

HAFFER, J. 1982. *General Aspects of the Refuge Theory. Biological Diversifications in the Tropics*. Columbia University Press. New York.

HANDFORD, P. 1999. Descifrando el pasado. Revista de Divulgación y Tecnología de la Asociación Ciencia Hoy. Volumen 9 N° 52 Mayo-junio 99.

HARTL, D., CLARK, A. 1997. *Principles of Population Genetics*. Tercera Edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts.

HASSAN, M., FAUVELOT, & BONHOMME, F. Sous presse 2002. 17 *New EPCI-POR amplifiable introns in fish*. Mol Ecol.

HATANAKA, T., GALETTI, P. 2003. *RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species*. Genetics and Molecular Biology, 26, 1, 19-25.

HEATH, D., BUSCH, C., KELLY, JOANNE & ATAGI, D. 2002. *Temporal change in genetic structure and effective population size in steelhead trout (Oncorhynchus mykiss)*. Mol. Ecol. 11. 197-214.

HENRY, J.P., PH. GOUYON. 1998. *Précis de génétique des populations*. Masson SA., Paris. 186 p.

HOELZEL, A.R. 1994. *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach*. Oxford University Press.

HOORN, C., GUERRERO, G., SARMIENTO, A., & LORENTE, M. 1995. *Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America*. Geology. 23: 237-240.

HURWOOD, D., & HUGHES, M. 2001. *Nested clade analysis of the freshwater shrimp, Caridina zebra (Decapoda: Atyidae), from north-eastern Australia*. Mol. Ecol. 10: 113-125

Junk, W.J.; SOARES, MG.; SAIN-PAUL, U. "The Fish". En Junk, W.J. 1997. *The central amazon floodplain*. Ecological Studies Vol. 126. Springer. Germany, 525 p.

KVIST LAURA. 2000. *Phylogeny and phylogeography of european parids*. Department of biology. Oulu.

- LAUZANNE, L.; LOUBENS, G. 1985. Peces del río Mamoré. Éditions de l'ORSTOM, Collection Travaux et Documents N° 192. Paris. 116 p.
- LAUZANNE, L.; LOUBENS, O.; GUENNEC, B. 1990. Pesca y biología pesquera en el Mamoré medio (Región Trinidad, Bolivia). *Interciencia*, vol. 15, N°6 nov-dic 1990.
- LAUZANNE, L., G. LOUBENS y B. LE GUENNEC. 1991. *Liste commentée des poissons de l'Amazonie bolivienne*. *Rev. Hydrobiol. trop.* 24(1):61-76.
- LE BAIL, p.y., KEITH, P., PLANQUETTE P. 2000. *Atlas des poissons d'eau douce de Guyane. Tomo 2, fascicule II: Siluriformes. Patrimoines naturelles (M.N.H.N./S.P.N.)*, Paris. 43(II): 307 p.
- LE GRANDE, W.H. 1981. *Chromosomal evolution in North American catfish (Siluriform, Ictaluridae) with particular emphasis on the Madtoms, Noturus*. *Copeia*, 341-344.
- LESSA, E. 1992. *Rapid Surveying of DNA sequence variation in natural populations*. *Mol. Biol. Evol.* 9: 323-330.
- LOUBENS, G., AQUIM, J., & ROBLES, E. 1984. Primeras observaciones sobre la sexualidad y la reproducción de las principales especies de peces de la región de Trinidad, Beni, Bolivia. Convenio ORSTOM-UTB-CORDEBENI.
- LOUBENS, G., L. LAUZANNE, B. LE GUENNEC. 1992. *Les milieux aquatiques e la région de Trinidad (Beni, Amazonie Bolivienne)*. *Rev. Hydrobiol. Trop.* 25(4):3-21.
- LOUBENS, G., & PANFILI, J.. 1997. *Biologie de Colossoma macropomum (teleostei: serrasalmidae) dans le bassin du Mamoré (amazonie bolivienne)*. *Ichthyol. Explor. Freshwaters.* 8:1-22.
- LOUBENS, G.; PANFILI, J. 2000. *Biologie de Pseudoplystoma fasciatum y Pseudoplatystoma tigrinum (Teleostei: Pimelodidae) dans le bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne)*. *Ichthyol Explor. Freshwaters*, vol. 11, N°1, p.1 3-34 march, 2000.

- LOWE-MCCONNELL, R.H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press, Australia. 382 p.
- MALLET, J. 1992. *A species definition for the modern synthesis*. Ecology and Evolution. 10: 294-299.
- MARTENS, K. 1997. *Speciation in ancient lakes*. Elsevier 12.
- MOLINA, M.; GARRO, O.; JUDIS, M.A. 2000. Composición y calidad microbiológica de la carne de Surubí. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- MONTES de OCA, I. 1997. Geografía y Recursos Naturales de Bolivia. Ed. 3. La Paz-Bolivia. 614 p.
- MUÑOZ, H.; VAN DAMME, P.A. 1998. Parámetro de reproducción de cuatro especies de peces comerciales (*Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum*) en la cuenca del río Ichilo (Bolivia). Rey. Bol. De Ecología 4:39-54.
- MYERS, A.A. y P. S. GILLER. 1988. *Analytical Biogeography. An integrated approach to the study of animal and plant distributions*. Chapman and Hall Ltd. London. 578 p.
- NARVAEZ, C., VALENZUELA, J. 2000. Comparación de RAPD y AFLP como métodos de identificación genética de vid basados en el estudio de fragmentos genómicos anónimos. Agricultura Técnica (Chile), Vol. 60 4: 320-340.
- NAVARRO, O. y M. MALDONADO. 2002. Geografía ecológica de Bolivia: Vegetación y ambientes acuáticos. Edit. Centro de Ecología Simón I. Patiño-Departamento de Difusión. Cochabamba, Bolivia. 719 p.
- PALUMBI, S. 1996. *Nucleic acids, II: the polymerase chain reaction*. In: Molecular Systematics. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc., 205-247.

- PATTON, J.L. DA SILVA, M.N.F., LARA, M.C. 1997. *Diversity, differentiation, and the historical biogeography of nonvolant small mammals of the neotropical forest*. In W. F. Laurance, R.O. Tropical Forest Remnants Ecology. Universidad of Chicago Press. In press.
- PEREIRA, R., CARVALHO, D. 2003. *Genetic variations in Eucalyptus spp. Genotypes detected by means of molecular markers*. R. Arvore, Vicososa. Vol.27. 3: 357-363.
- POULLY, M., IBAÑEZ, C., GUTIERREZ, M. YUNOKI, T. 1999. *Funcionamiento ecológico de las lagunas de la zona de inundación del río Mamoré (Beni-Bolivia)*. Rev. Bol. de Ecol. 6:41-54.
- POSTIGLIONI, A., RINCON, G., KELLY, S. 2002. *Genetic biodiversity in uruguayan creole cattle. Analysis with molecular markers*. Arch.Zootec. 51: 195-202.
- PRANCE, G. 1982. *Forest Refuges: Evidence from Woody Angiosperms*. Biological Diversifications in the Tropics. Columbia University Press. New York.
- REID, S. 1983. *La biología de los bagres rayados Pseudoplatystoma fasciatum y Pseudoplatystoma tigrinum en la cuenca del río Apure, Venezuela*. Revista UNILLENZ de ciencia y tecnología. Serie Producción Agrícola. Año 1/Nº 1/Barinas.
- RENNO, J.F., GUYOMARD, R., BOUJART, T., BASTIDE, C. 1989. *Evidence of genetic isolation among four morphological species of Leporinus (Anostomidae, Pisces) in French Guiana*. Aquatic Living Resources. 2:127-134.
- RENNO, J.F., BERREBI, P., BOUJART, T., GUYOMARD, R. 1990. *Intraspecific genetic differentiation of Leporinus friderici (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and Brazil: A genetic approach to the refuge theory*. Journal of Fish Biology. 36: 85-95.
- RENNO, J.F., MACHORDOM, A., BLANQUER, A., BOURSOT, P. 1991. *Polymorphism of mitochondrial genes in populations of Leporinus friderici (Bloch, 1974): intraspecific structure and zoogeography of the Neotropical fish*. Genética. 84: 137-142.
- REVELO, P.P., E. FELDBERG, C.M. NAKAYAMA, J. FALCAO. 1992. *A check list of Amazonian freshwater fishes*. Rev. Hydrobiol. Trop. 25(4):287-299.

- REYES, A., M. FAZLUL. 1990. Algunos aspectos reproductivos del bagre rayado, *P. fasciatum*, Linnaeus, 1776 (Pisces: Pimelodidae) en la laguna Grande, Maturin, Venezuela. Bol. Inst. Oceanog.. Univ. Oriente. 29 (1 y 2): 133-140.
- RICHARDSON, B.J.; BAVERSTOCK P.R.; ADAMS, M. 1986. *Allozyme Electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies*. ACADEMIC PRESS Australia. 410 p.
- RIDLEY, M. 1966. *Evolution*. 2 ed. Blackwell Scientific Publication Ltd. Oxford, 719 p.
- RIVERA, R. 2003. Variabilidad genética de *Pseudoplatystoma tigrinum* y *Pseudoplatystoma fasciatum* en la cuenca amazónica boliviana. Tesis de grado para optar al título de Licenciatura en Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. La Paz, Bolivia. 49 p.
- RODRIGUEZ FERNANDEZ, CARLOS A. 1991. Bagres, malleros y cuerderos en el bajo río Caqueta. Estudios de la Amazonía Colombiana. Vol. 2. TROPENBOS. Colombia.
- ROGNON, G., TEUGELS, R. 1998. *Morphometric and allozyme variation in the African catfishes *Ciarias gariepinus* and *C. anguillaris**. Journal of Fish Biology. 53, 192-207.
- ROSS, K., KRIEGER, M. 1997. *Hierarchical analysis of Genetic Structure in Native Fire Ant Populations: Results From Three Classes of Molecular Markers*. Genetics 147: 643-655.
- SALM & MARCONI, 1992. Reserva Nacional Amazonica Manuripi-Heath. Programa de Reestructuración (Fase II). La Paz, Bolivia. 269 p.
- SALO, J. 1987. *Pleistocene forest refuges in the Amazon; evaluation of the biostratigraphical, lithostratigraphical and geomorphological data*. Ann. Zool. Fennica 24: 203-211.
- SANCHEZ, S.; FENOCCHIO, A.; JORGE, L. 1998. Estudios citogenéticos en peces de la familia Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) de la cuenca del río Paraná, Argentina. Análisis cromosómico de dos especies de Luciopimelodinae. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.

SARMIENTO, J., S. BARRERA. 1997. Observaciones preliminares sobre la ictiofauna de la vertiente oriental andina de Bolivia. *Rev. Bol. de Ecol.* 2:77-79

SARMIENTO, J.; S. CHERNOFF; S. BARRERA; A. Machado-Allison, N. Meneses & H. Ortega. 1999. *Fishes collected during the AquaRAP expedition to Pando, Bolivia in september 1996.* 87-86. In: Chernoff, B. y P.W. Willink (eds). *Abiological assessment of the aquatic ecosystems of the upper rio Orthon basin, Pando, Bolivia.* Bulletin of Biological Assessment 15. Conservation International. Washington, D.C.

SARMIENTO, J. 2000. Observaciones preliminares sobre la composición y distribución de la ictiofauna de la Estación Biológica del Beni, Bolivia. En O. Herrera-MacBryde, F. Dallmeier, B. MacBryde, J. Comiskey y C. Miranda, eds. *Biodiversidad, conservación y manejo en la región de la Reserva de la Biosfera Estación Biológica del Beni, Bolivia.* SI/MAB Series N° 4, Washington, DC.

SHE, J., AUTEM., KOTULAS, G., & PASTEUR, N. 1987. *Multivariate analysis of genetic exchanges between Solea aegyptiaca and Solea senegalensis (Teleost, Soleidae).* Biological Journal of the Linnean Society. 32: 357-371.

SIMPSON, B., HAFFER, J. 1978. *Speciation patterns in the Amazonian Forest biota.* Ann. Rev. Ecol. Syst. 9: 497-518.

SOLIGNAC, M; PERIQUET, G.; ANXOLABEHIERE, D.; PETIT, C. 1995. *Génétique et évolution. La variation, les gènes dans les populations.* Tomo I. L'espèce, l'évolution moléculaire. Tomo II. Hermann Editeurs des sciences et des arts. Paris 367.

TEMPLETON, R. 1998. *Nested Clade analysis of phylogeographic data: testing hipótesis about gene flow and population history.* Molecular Ecology. Vol.7: 381-397.

TORRES, L.; TORRES, R. 1992. Estudio ictiológico de la Laguna Suárez. Proyecto de Investigación Ictiológica en el Beni. UTB, CORDEBENI. Trinidad-Beni. 33 p.

WASSON, J.G. 2001. *Biodiversité aquatique dans le Bassin Amazonien Bolivien: Facteurs de contrôle, Dynamique et Usages. Rapport de synthèse Deuxième partie: Principaux résultats (juillet 1996-juin 2000).* Le projet "BIOBAB". La Paz & Lyon.

WRIGHT, S. 1931. *Evolution in mendelian populations*. Genetics 16: 97-159.

WRIGHT, S. 1951. *The genetical structure of populations*. Ann. Eugen., 15: 323-354.

WU, C. 2001. *Genes y speciation*. Evolution Biology. Vol 14: 889-891.

ANEXOS

Anexo 1

Técnica de electroforesis enzimática en gel de almidón

Extracción de enzimas (músculo e hígado) trabajar a 4°C

- Cortar aproximadamente 1 cm³ de tejido y colocarlo en tubos de ensayo pequeños.
- Añadir 0.5 ml de tampón de extracción.
- Homogenizar la muestra.
- Pasar el homogenizado a tubos eppendorf de 1.5 ml.
- Añadir aproximadamente 0.5 ml de CCl₄ (tetracloruro de carbono).
- Agitar las muestras o vortexear.
- Centrifugar por 15 minutos a 10 000 rpm a 4°C.
- Obtener el sobrenadante el cual debe ser transparente. Realizar una segunda centrifugación en el caso del hígado en caso necesario.

Preparación del buffer del gel y de la corrida electroforética:

Tampones para electrodo:

PC - 6.3 (Fosfato - citrato)

TP - 7.4 (Tris - fosfato)

TC - 6.3 (Tris amino ultra puro-citrato)

TCB - 1/2 (Hidróxido de litio-ácido bórico)

Preparación del Gel:

- Realizar una dilución 1/39 para 35 ml aforando con agua destilada para 42 g de almidón en un matraz erlenmeyer.
- Realizar la cocción del gel con ayuda de un mechero, agitar bien la mezcla hasta que la solución cambie de consistencia.
- Absorber las burbujas con ayuda de una bomba de vacío.
- Vaciar el gel en un molde y dejar que gelifique por 1.5 horas.
- Cubrir el gel con plástico, evitar burbujas.

Realización de la corrida electroforética:

- Cortar papel Watman (0.5x1 cm), N° 3 para músculo y N°1 para hígado.
- Descongelar las muestras pero no totalmente ya que pueden perder su actividad enzimática.
- Con una pinza fina, colocar las muestras sobre el papel filtro correspondiente.
- Dejar secar los filtros aproximadamente 10 a 15 minutos.
- En este tiempo, preparar las cubetas de corrida colocando las esponjas que harán el contacto con el gel colocando el buffer del electrodo en cada cubeta.
- Llevar este sistema a 4°C.
- Preparar el gel para la corrida.
- Realizar un corte en el gel a una distancia de 4 cm para la siembra de las muestras. Con la pinza sembrar cada una de las muestras en la región del corte.
- Sembrar azul de bromofenol en el centro y en los costados del gel para vigilar el nivel de la corrida.

- Armar el sistema de corrida a 4°C colocando el gel sobre las cubetas que contienen las esponjas y el tampón.
- Realizar la corrida a un determinado voltaje dependiendo del tampón del electrodo por aproximadamente 5 horas.
- **Tinción:**
- Finalizada la corrida electroforética, realizar cortes del gel (obtener láminas delgadas) y colocarlos en las cubetas de tinción.
- Realizar la preparación del sistema enzimático.
- Vaciar este sistema en la cubeta donde se encuentra la lámina.
- Llevar la cubeta a la oscuridad hasta visualizar la reacción enzimática.
- Realizar la interpretación de los geles.

Anexo 2

Preparación del Buffer para electrodo y gel

PC - 6.3

Fosfato citrato pH 6.3

Electrodo:

Citrato trisódico (0.15 M).....	44.1 g.
Fosfato monosódico dehidrogenado (0.24 M).....	37.4 g.
Agua	1000 ml.

Ajustar el pH a 6.3 con NaOH 1 N.

Gel:

Dilución 1/39 del tampón electrodo 10.5 ml	420 ml agua
8.75 ml PC-63 341 .25 agua destilada	

Ajustar el pH con ácido cítrico

TC - 6.3/6.7

Tris citrato

Electrodo:

Tris	27.0
Acido cítrico (monohidratado)	18.0 g
Agua	1000 ml

Ajustar el pH a 6.3

Gel:

Tris	0.339g.
------------	---------

Acido cítrico (monohidratado) 0.220 g.

Agua 350 ml

Ajustar el pH a 6.7

TP — 7.4

Tampón base

Electrodo:

Tris 12.1 g

Ajustar pH a 7.4 con NaH_2PO_4

Gel:

35 ml de tampón base, 315 ml agua.

TCB-1

Gel:

Tris 1.26g

A. cítrico 0.37 g

Agua 350 ml

Ajustar pH a

TCB-2

Electrodo:

LiOH 2.5g

Ácido bórico 18.6g

Agua 1000 ml

Ajustar pH a 8.3

Anexo 3

Preparación de los Sistemas enzimáticos: Tinción y Revelado

AAT (Aspartato Amino Transferasa)		ME (Enzima Mállica)	
Tris HCl	30 ml	Tris HCl	5 ml
Piridoxal 5 PO ₄	5 mg	MgCL ₂	1 ml
Ácido As ártico	40 mg	NADP	10 mg
Ácido α cetoglutárico	80 mg	Ácido málico	1 ml
Incubar 20 min, eliminar la solución		PMS	0.5 ml
Tris HCl	5 ml	NBT	0.5 ml
FBBB	80 mg	MTT	0.5 ml
Agar		Agar	

CK (Creatin Kinasa)		AK (Adenilato Kinasa)	
Tris HCl	5 ml	Tris HCl	5 ml
M CL ₂	1 ml	MgCL ₂	1 ml
NAD	1Cm	NAD	10 mg
NADP	5 mg	NADP	5 mg
Glucosa	100 mg	Glucosa	100 mg
Adenosin di PO ₄	30 mg	Adenosin di PO ₄	30 mg
Fosfocreatinina	15 mg	G6PDH	6 µl
G6PDH	6 µl	Hk	6 µl
HK	6 µl	PMS	0.5 ml
PMS	0.5 ml	MTT	1 ml
MTT	1 ml	Agar	
Agar			

IDH (Isocitrato Deshidrogenasa)		MDH (Malato Deshidrogenasa)	
Triethanolamina	30 ml	Triethanolamina	30 ml
Ácido Isocítrico	44 mg	Acide Málico	0.5 ml
NADP	5 mg	NAD	10 mg
MgSO ₄	50 mg	MTT	1 ml
MTT	1 ml	PMS	0.5 ml
PMS	0.5 ml	Piruvato	20 mg

PGM (Fosfoglucomutasa)		PGI (Fosfoglucoisomerasa)	
Tris HCl	5 ml	Tris HCl	5 ml
MgCL ₂	1 ml	M CL ₂	1 ml
NAD	10 mg	NAD	10 mg
NADP	5 mg	NADP	5 mg
Glucosa 1 PO ₄	300 mg	Fructosa6 PO ₄	10 mg
PMS	0.5 ml	PMS	0.5 ml
NBT	1 ml	NBT	1 ml
MTT	0.5 ml	MTT	0.5 ml
G6PDH	6 µl	G6PDH	6 µl
Agar		Agar	

6PGDH		LDH (Lactato Deshidrogenasa)	
Tris HCl	30 ml	Triethanolamina	30 ml
M CL ₂	1 ml	Ácido Láctico	2.6 ml
NADP	10 mg	NAD	10 mg
Ácido 6 fosfogluconico	40 mg	MTT	1 ml
PMS	0.5 ml	PMS	0.5 ml
NBT	0.5 ml		
MTT	0.5 ml		

Anexo 4

Preparación de las soluciones para el revelado

Tampones Tris para coloración

Tris HCl 0.2 M, pH 8.0

EGTA	2g
Tris	121 g
Agua	5000 ml

Ajustar pH con HCl

MgCl₂ (0.5 M)

MgCl ₂	10g
Agua destilada	100 ml	

Triethanolamina (0.15 M) pH 9

Triethanolamina	100 ml
Agua	5000 ml

Ajustar pH con HCl

MIT

MTT Tretazolium	0.5g
Agua destilada	100 ml

NBT

Nitro Blue Tetrazolium	1.0 g
Agua destilada	100 ml

PMS

Fenazine Methosulfato	1g
-----------------------	-------	----

Agua destilada 100 ml

Anexo 5

Preparado de solución de extracción con CTAB

(Doyle & Doyle, 1987)

Para preparar 50 ml de solución de extracción:

20 ml CTAB 5% (Hexadecyl-trimethyl ammonium bromide)

14 ml NaCl 5 M

2 ml EDTA 0.5M pH 8

5 ml TRIS 1M pH 8

100 μ l β mercapto-etanol

9 ml H₂O tridestilada.

Guardar la solución de extracción a 4°C

La solución de extracción contiene:

CTAB 5% : 5g de CTAB en 100 ml H₂O destilada.

NaCl 5M : 14.6 g de NaCl p.a en 50 ml H₂O destilada.

EDTA 0.5M pH8 : 9.3 g de EDTA 50 ml H₂O destilada y ajustar el pH con NaOH.

TRIS 1M : 6.05 g de TRIS en 50 ml H₂O destilada.

Guardar estas soluciones a -20°C.

Extracción de ADN con solución CTAB

- Cortar finamente un trozo de músculo (no más de 0.3g) y colocar en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Añadir 750 µl de solución de extracción CTAB más 1 µl de proteinasa K (20mg/ml) y mezclar en vortex.
- Realizar la digestión a 60°C, durante 8 horas o toda la noche.
- Añadir 750 µl de la mezcla cloroformo-alcohol isoamilico (24:1), agitar suavemente por 5 minutos y centrifugar a 8000 rpm durante 5 min a 4°C.
- Colocar la fase acuosa (aprox. 500 µl) en un tubo nuevo.
- Añadir 750 µl de isopropanol frío (-20°C) y mezclar suavemente durante 1-2 min.
- Precipitar a -20°C 1-2 horas.
- Centrifugar a 13000 rpm 15 minutos a 4°C (se puede observar un pequeño precipitado blanco en el fondo o en la pared del tubo) y desechar el sobrenadante sin tocar el precipitado blanco.
- Añadir 750 µl de etanol 70%.
- Centrifugar a 13000 rpm 15 minutos a 4°C y desechar el sobrenadante.
- Secar el precipitado (ADN) a temperatura ambiente (si fuese posible en una cámara con silicagel). Esta etapa es muy importante, verificar que evapore completamente el etanol ya que podría interferir en la reacción de PCR.
- Resuspender el ADN en 250 µl de agua tridestilada o agua para PCR. Guardar a -20°C.
- Guardar a -20°C

Anexo 6

Condiciones de reacción para cada PCR

	R pex	Mhc	PmOp si	Am2b2
Primers	R Pex 1 F R Pex 2 R	MHC 1F MHC 2 R	PmOpsi-F PmOpsi-R	AM2B 1F AM2B 2 R
PT	MM3 PTPF PCS58	MM2 PTPF PCS50	MM2 PTPF PCS58	MM1 PTPF PCS50
PF	MM3 PTPF PCS58	MM2 PTPF PCS50	MM2 PTPF PCS58	MM1 PTPF PCS50

MM: Mezcla reactivos para PCR
PCS: Programa de termociclador

MM1 PTPF(por tubo)

Volumen final 25µl

Volumen de ADN 5µl

Reactivo	Conc.i	Vol	Conc f.
H ₂ O		10.4	
B 10X	10X	2.5	1X
Mg Cl ₂	25mM	2.5	25mM
dNTP's	2mM	2.5	0.2mM
Pr.1 (anexo 3)	10 µM	1	0.4 µM
Pr.2 (anexo3)	10 µM	1	0.4 µM
Taq	5U/µl	0.1	0.5 U

MM2 PTPF(por tubo)

Volumen final 25 μ l

Volumen de ADN 5 μ l

Reactivo	Conc.i	Vol	Conc f.
H ₂ O		11.3	
B 10X	10X	2.5	1X
Mg Cl ₂	25mM	1.5	1.5mM
dNTP'S	2mM	2.5	0.2mM
Pr.1	10 μ M	1	0.4 μ M
Pr.2	10 μ M	1	0.4 μ M
Taq	5U/ μ l	0.2	1.

MM3 PTPF (por tubo)

Volumen final 25 μ l

Volumen de ADN 5 μ l

Reactivo	Conc.i	Vol	Conc f.
H ₂ O		11.2	
B10X	10X	2.5	1 X
Mg Cl ₂	25mM	1.5	1.5mM
dNTP's	2mM	2.5	0.2mM
Pr.1	10 μ M	1	0.4 μ M
Pr.2	10 μ M	1	0.4 μ M
Taq	5U/ μ l	0.3	1.5 U

Anexo 7

Condiciones de alineamiento

PCS50

PRE-PCR	PCR	POST-PCR
92°C 2min	<p>95°C 1min 72°C 1min 50°C 1min</p>	72°C 5min
1 ciclos	30 ciclos	1 ciclos

PCS58

PRE-PCR	PCR	POST-PCR
92°C 2min	<p>95°C 1min 72°C 1min 58°C 1min</p>	72°C 5min
1 ciclos	30 ciclos	1 ciclos

Anexo 8

Electroforesis en geles de Poliacrilamida (PAGE)

Preparado de geles de Poliacrilamida

Gel de poliacrilamida al 5% - volumen final 32 ml / gel

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
Agua			20.27 ml
TBE	5 X	1 X	6.4 ml
Poliacrilamida	30 %	5 %	5.33 ml
Persulfato de Amonio (APS)	10 %		420 µl
TEMED			30 µl

Gel de poliacrilamida al 8% - volumen final 32 ml / gel

	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen
Agua			16.6 ml
TBE	5 X	1 X	6.4ml
Poliacrilamida	30 %	8 %	8.5 ml
Persulfato de Amonio APS	10 %		420 µl
TEMED	100%		30 µl

- Tiempo de polimerización: 1 hora
- Lavar los pozos del gel con agua destilada (utilizando una jeringa), por tres veces.

Sembrado de las muestras en PAGE

- a) Previamente al sembrado de las muestras en PAGE, se debe calcular el volumen de muestra de acuerdo a la intensidad de la banda de amplificación visualizada en el gel de agarosa.
- b) El volumen final de siembra debe sumar 8µl (3µl de azul de bromo fenol 6X + agua, que varía de acuerdo al volumen del amplicón + amplicón)
- c) Sembrado.

La corrida se realiza en buffer TBE 1X.

Anexo 9

Condiciones de migración en PAGE

Voltaje: 350 V - 380 V

Amperaje: 70A - 7SA

Poder: 25 W - 28 W

INTRON	R pex	Mhc	PmOpsi	Am2b 2
Tiempo de migración horas	6	3	3	4
Porcentaje de poliacrilamida	8	8	8	8

Anexo 10

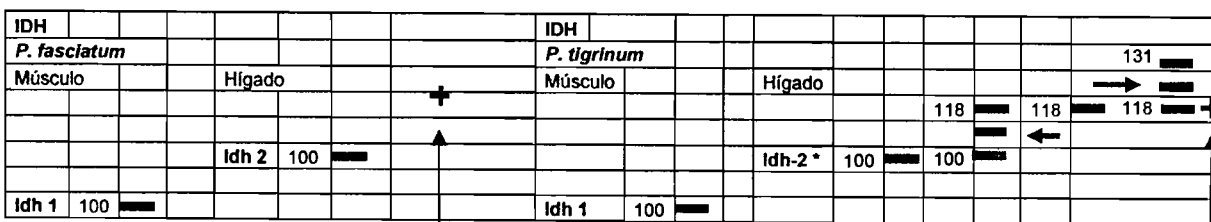
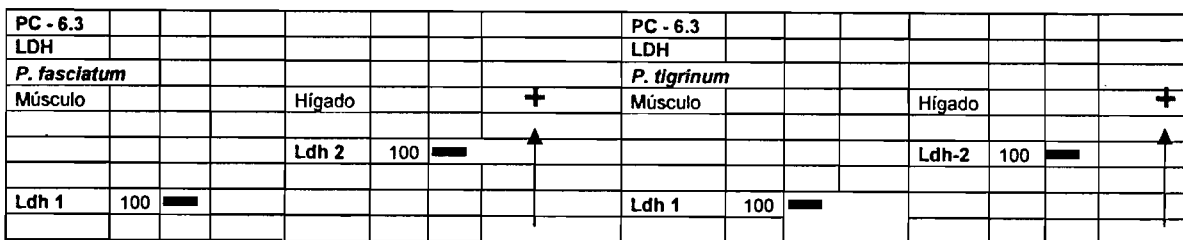
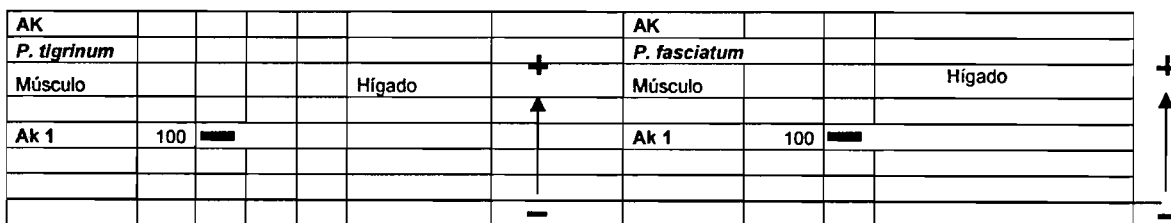
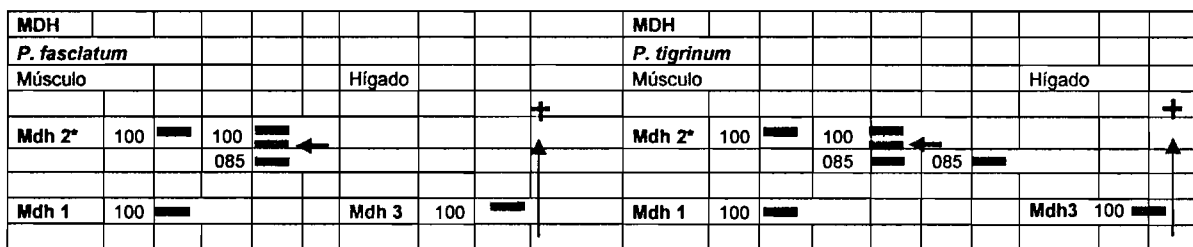
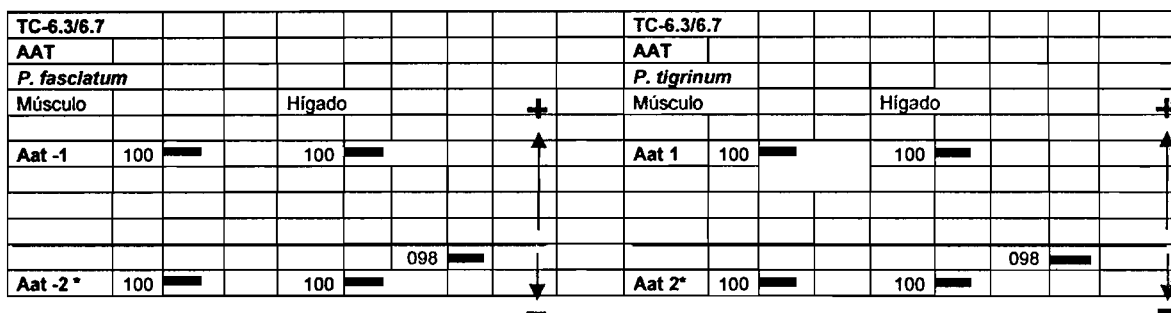
Revelado del gel tinción Rabat

- Sumergir el gel durante 10 minutos en alcohol medicinal al 30%.
- Realizar un lavado con agua destilada.
- Sumergir el gel durante 3 minutos en ácido nítrico al 1%.
- Realizar un lavado con agua destilada.
- Sumergir el gel durante 2 minutos en nitrato de plata al 0.2%.
- Realizar 3 lavados con agua destilada.
- Sumergir el gel en carbonato de sodio (30g/l) y formaldehído (0,08%) en proporción (2:1).

- Visualizar los perfiles de cada locus y fotografiar varias veces a medida que la tinción se intensifica.
- Para conservar los geles, se procede al secado de los mismos en medio de dos pliegues de papel celofán por 12 horas a temperatura ambiente.

Anexo 11

Representación esquemática de los patrones electroforéticos obtenidos por isoenzimas e intrones

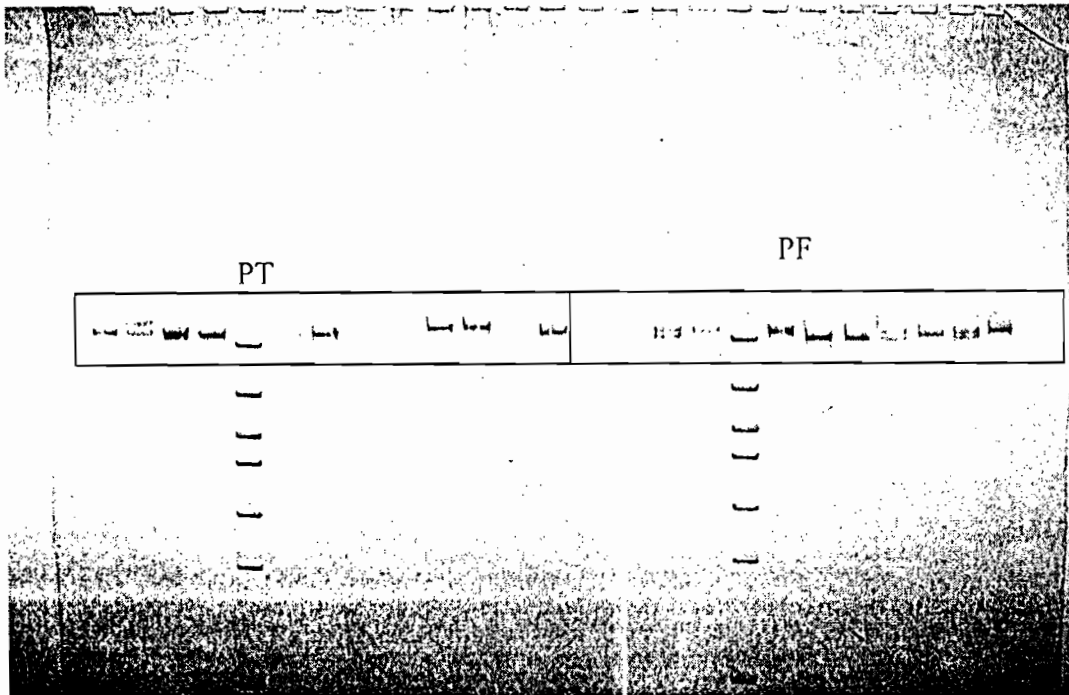


<i>P. fasciatum</i>						<i>P. tigrinum</i>						
Higado					+	Higado					+	
					↑						↑	
6Pgdh *	100	█				6Pgdh *	100	█				
			092	█					092	█		
					084	█					084	█

Representación esquemática de patrones electroforéticos para cada sistema enzimático. Los sistemas enzimáticos son nombrados en letra mayúscula y los locus en minúscula seguidos de la numeración correspondiente. Los alelos más frecuentes de todos los loci llevan la numeración 100.

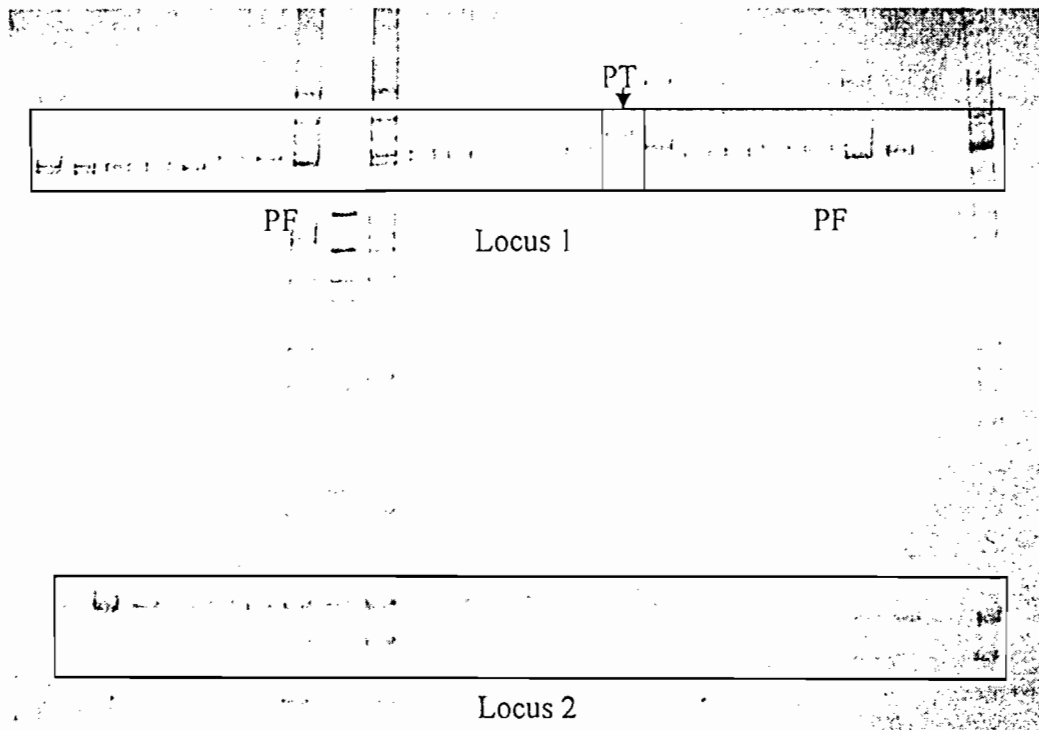
- (*) Locus polimórficos
- ↑ () Indica la dirección de la migración de las bandas en los geles.
- ← () Señala las bandas heterodiméricas

Identificación de Perfiles intrónicos														
<i>Rpex</i> (PT - PF)														
<i>Rpex</i>							<i>Rpex</i>							
<i>P. fasciatum</i>							<i>P. tigrinum</i>							
	1086						---	---				1103	---	
		---	---										---	---
	1069											1086		
<i>Rpex</i> - 1	1056					---	---		---	<i>Rpex</i> - 1	1069	---	---	---
	1044			---							1056	---		---
	1036		---		---	---					1036	---		---



Patrón electroforético para el sistema intrónico de la proteína ribosomal S7 *Rpex*.
 Los alelos más frecuentes de todos los loci llevan la numeración de acuerdo a su peso molecular
 (*) Locus polimórficos

Identificación de Perfiles intrónicos											
<i>Mhc</i> (PT - PF)											
<i>Mhc</i>						<i>Mhc</i>					
<i>P. fasciatum</i>						<i>P. tigrinum</i>					
	1584									1584	
	1480										
<i>Mhc - 1</i>	1467	—	—			—				<i>Mhc - 1</i>	
	1450										
	1398	—		—	—						
	1350					—					

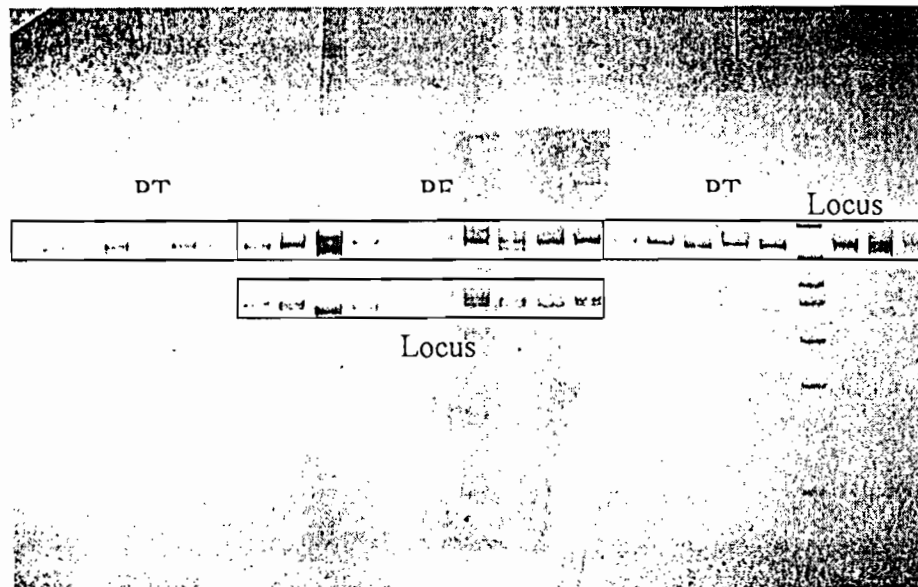


Patrón electroforético para el sistema intrónico del Complejo Mayor de Histocompatibilidad *Mhc*. Los alelos más frecuentes de todos los loci llevan la numeración de acuerdo a su peso molecular (*) Locus polimórficos

Identificación de Perfiles intrónicos

Am2b2 (PT - PF)

<i>Am2b22</i>												<i>Am2b2</i>		
<i>P. fasciatum</i>												<i>P. tigrinum</i>		
<i>Am2b - 1</i>	900	—		—	—							<i>Am2b - 1</i>	865	—
	870				—									
	865		—	—										
	595								—					
<i>Am2b - 2</i>	590	—	—									<i>Am2b - 2</i>	622	—
	585				—									
	580	—		—	—		—	—						
	570					—	—							

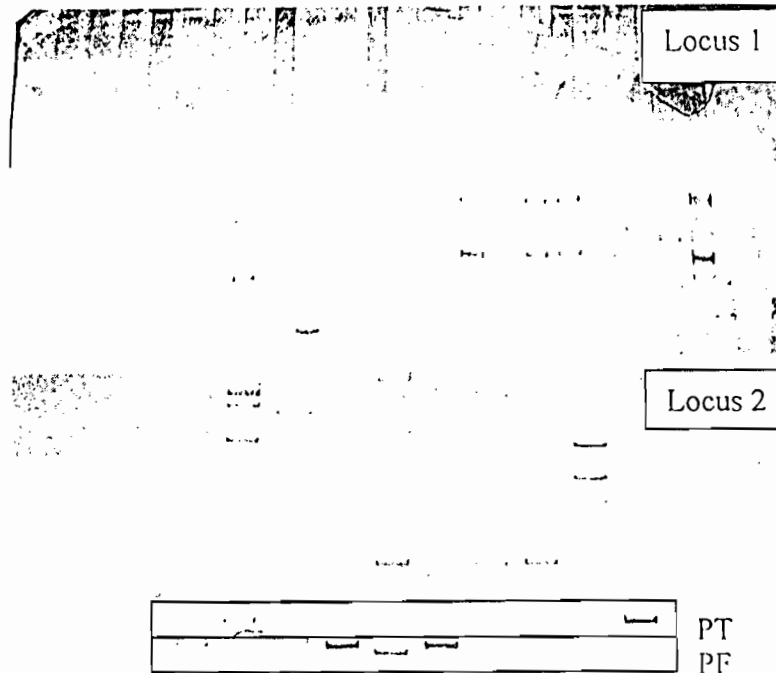


Patrón electroforético para el sistema intrónico de Alfa amilasa *Am2b2*
 Los alelos más frecuentes de todos los loci llevan la numeración de acuerdo a su peso molecular
 (*) Locus polimórficos

Identificación de Perfiles intrónicos

Pmopsi (PT - PF)

<i>Pmopsi</i>										<i>Pmopsi</i>					
<i>P. fasciatum</i>										<i>P. tigrinum</i>					
										2020	---			---	
										<i>Pmopsi - 1</i> 2000	---	---			
										1990			---		
										1900			---		
	330		---	---											
<i>Pmopsi - 2</i>	326	---	---	---		---		---		<i>Pmopsi - 2</i> 366	---				
	322					---									
	320							---							
	317	---						---							



Patrón electroforético para el sistema intrónico de opsina *Pmopsi*.
 Los alelos más frecuentes de todos los loci llevan la numeración de acuerdo a su peso molecular
 (*) Locus polimórficos