



Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura

**Variabilidad genética y
estructuración poblacional de
Colossoma macropomum y
Piaractus brachypomus en el
Alto Madera (Bolivia)**

**Jean-François Renno, Claudia Aliaga, Rémi
Dugué, Jesús Nuñez, Fabrice Duponchelle**

**VARIABILIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURACIÓN
POBLACIONAL DE COLOSSOMA MACROPOMUM**

Y PIARACTUS BRACHYPOMUS EN EL ALTO MADERA (BOLIVIA)

(genética de poblaciones)

Primera edición digital

Diciembre, 2014

Lima - Perú

**© Jean-François Renno
Claudia Aliaga
Rémi Dugué
Jésus Nuñez
Fabrice Duponchelle**

PLD 1640

Editor: Víctor López Guzmán

Guzlop editoras

**<http://www.guzlop-editoras.com/>
guzlopster@gmail.com
[facebook.com/guzlop](https://www.facebook.com/guzlop)
twitter.com/guzlopster
731 2457 / 959 552 765
Lima - Perú**

PROYECTO LIBRO DIGITAL (PLD)

El proyecto libro digital propone que los apuntes de clases, las tesis y los avances en investigación (papers) de las profesoras y profesores de las universidades peruanas sean convertidos en libro digital y difundidos por internet en forma gratuita a través de nuestra página web. Los recursos económicos disponibles para este proyecto provienen de las utilidades nuestras por los trabajos de edición y publicación a terceros, por lo tanto, son limitados.

Un libro digital, también conocido como e-book, eBook, ecolibro o libro electrónico, es una versión electrónica de la digitalización y diagramación de un libro que originariamente es editado para ser impreso en papel y que puede encontrarse en internet o en CD-ROM. Por, lo tanto, no reemplaza al libro impreso.

Entre las ventajas del libro digital se tienen:

- su accesibilidad (se puede leer en cualquier parte que tenga electricidad),
- su difusión globalizada (mediante internet nos da una gran independencia geográfica),
- su incorporación a la carrera tecnológica y la posibilidad de disminuir la brecha digital (inseparable de la competición por la influencia cultural),
- su aprovechamiento a los cambios de hábitos de los estudiantes asociados al internet y a las redes sociales (siendo la oportunidad de difundir, de una forma diferente, el conocimiento),
- su realización permitirá disminuir o anular la percepción de nuestras élites políticas frente a la supuesta incompetencia de nuestras profesoras y profesores de producir libros, ponencias y trabajos de investigación de alta calidad en los contenidos, y, que su existencia no está circunscrita solo a las letras.

Algunos objetivos que esperamos alcanzar:

- Que el estudiante, como usuario final, tenga el curso que está llevando desarrollado como un libro (con todas las características de un libro impreso) en formato digital.
- Que las profesoras y profesores actualicen la información dada a los estudiantes, mejorando sus contenidos, aplicaciones y ejemplos; pudiendo evaluar sus aportes y coherencia en los cursos que dicta.
- Que las profesoras y profesores, y estudiantes logren una familiaridad con el uso de estas nuevas tecnologías.
- El libro digital bien elaborado, permitirá dar un buen nivel de conocimientos a las alumnas y alumnos de las universidades nacionales y, especialmente, a los del interior del país donde la calidad de la educación actualmente es muy deficiente tanto por la infraestructura física como por el personal docente.
- El personal docente jugará un rol de tutor, facilitador y conductor de proyectos

de investigación de las alumnas y alumnos tomando como base el libro digital y las direcciones electrónicas recomendadas.

- Que este proyecto ayude a las universidades nacionales en las acreditaciones internacionales y mejorar la sustentación de sus presupuestos anuales en el Congreso.

En el aspecto legal:

- Las autoras o autores ceden sus derechos para esta edición digital, sin perder su autoría, permitiendo que su obra sea puesta en internet como descarga gratuita.

- Las autoras o autores pueden hacer nuevas ediciones basadas o no en esta versión digital.

Lima - Perú, enero del 2011

“El conocimiento es útil solo si se difunde y aplica”

Víctor López Guzmán
Editor

Variabilidad genética y estructuración poblacional de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* en el Alto Madera (Bolivia)

Jean-François Renno^{1,2}, Claudia Aliaga², Rémi Dugué^{1,3}, Jesús Nuñez^{1,2},
Fabrice Duponchelle^{1,4}

¹ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR175, GAMET,
BP 5095, 34196 Montpellier cedex, France
e-mail: renno@univ-montp2.fr, nunez@ird.fr,
duponchelle@ird.fr, dugue@ird.fr

², Universidad Mayor San Andrés (UMSA), IBM y B La Paz, Bolivia

³ Universidad Autónoma Gabriel René Moreno (UAGRM), CIPPE,
Santa Cruz, Bolivia

⁴ Universidad Mayor San Simón (UMSS), ULRA, Cochabamba, Bolivia

Palabras Claves: *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, genética, EPIC-PCR

Resumen

El análisis de ocho intrones (EPIC-PCR) en *C. macropomum* y seis en *P. brachypomus* de muestras del Alto Madera, muestra que ambas especies están totalmente diferenciadas sin introgresión entre ellas, con un promedio heterocigocidad observada de 0.29 y 0.20, respectivamente. *C. macropomum* presenta una fuerte estructuración genética entre poblaciones diferenciadas en 3 grupos geográficos: Río Mamoré-Isiboro; Ríos Iténez-San Joaquín + Yata + Beni-Cachuela Esperanza y Río Beni-Puerto Salinas + Manuripi. La relación entre distancias geográficas y distancia genéticas revela que la dispersión de *C. macropomum* se realiza preferencialmente por el eje principal de los ríos, y no por la zona de inundación. La diferenciación genética de *C. macropomum* está en relación con el aislamiento por la distancia. Por otro lado, *P. brachypomus* presenta diferencias significativas ($F_{ST} = 0.11$, $p < 0.05$) solamente entre las poblaciones del Mamoré-Isiboro y Beni-Cachuela Esperanza, pero pocas muestras están disponibles para asegurar las otras comparaciones. La estructuración del polimorfismo del DNA nuclear de *C. macropomum* contrasta con los resultados de la filogeografía (D-Loop) que muestran una estructuración haplotípica en varios linajes sin concordancia con la distribución geográfica (presentado en esta publicación García *et al.*). La colonización

de un mismo río del alto Madera se ha hecho en varias etapas y por varios caminos anteriormente al desarrollo de una estructuración genética en varias poblaciones en relación con la geografía. Además la estructuración genética de *C. macropomum* en varias poblaciones está relacionada con variaciones de sus rasgos de vida (presentado en esta publicación, Nuñez *et al.*). Estos resultados pueden servir de guía para la elección de las cepas de piscicultura y para desarrollar una política de bioconservación de *C. macropomum* y *P. brachypomus*.

Introducción

La cuenca Amazónica en territorio boliviano ocupa, 724 000 km² correspondiente a la mayor parte de la cuenca del Alto Madera incluyendo los Ríos Madre de Dios, Beni, Mamoré que toman sus fuentes en los Andes y el Río Iténez originario del escudo brasileiro. La diferencia del origen geográfico de los ríos explica sus variaciones fisicoquímicas: agua blanca característica de los ríos de origen andino (Madre de Dios, Beni, Mamoré), agua clara característica de los ríos sin carga sedimentaria (Iténez) y agua negra cargada de ácidos húmicos (ríos de la planicie de inundación, ej. Ríos Manuripi y Yata) (Sioli 1984). Existen diferencias ictiológicas importantes entre los principales afluentes que constituyen el Río Madera (Lauzane *et al.*, 1991) probablemente en relación con su historia, su ecología y con la vasta planicie de inundación de la cuenca del alto Madera (Amazonía Boliviana), juegan un rol muy importante en la evolución de las especies dando lugar a una gran diversidad biológica (Loubens *et al.*, 1992).

La diversidad específica de los peces en el alto Madera constituye un considerable potencial para la acuicultura de la región, contribuyendo en gran medida a la economía local, puesto que algunas especies son de alto valor comercial en el mercado de Bolivia, dentro de éstas el pacú (*Colossoma macropomum*) y el tambaquí (*Piaractus brachypomus*). Ambas especies que filogenéticamente constituyen un mismo clado con *Mylossoma* (Ortí *et al.*, 1997) se encuentran distribuidas en todo los ríos del Alto Madera. El presente estudio preliminar tiene el objetivo de evaluar la estructuración genética de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* en relación con la distribución geográfica de las poblaciones entre ríos de características ecológicas diferentes. El desarrollo de la medida de los flujos genéticos a través del análisis del polimorfismo de longitud de varios locus intrónicos (técnica de EPIC-PCR) enfoca los límites de las poblaciones distribuidas en los ríos Manuripi, Mamoré, Iténez, Beni y Yata.

Metodología

Un total de 125 individuos fueron colectados en las 4 cuencas principales del alto Madera: Madre de Dios (Río Manuripi), Beni (cachuelas Esperanza y puerto Salinas), Mamoré (Río Isiboro) y Iténez (Río San Joaquín) (Fig. 2). Las muestras de músculo fueron conservados en etanol 90% para el tratamiento al laboratorio.

Análisis por EPIC-PCR

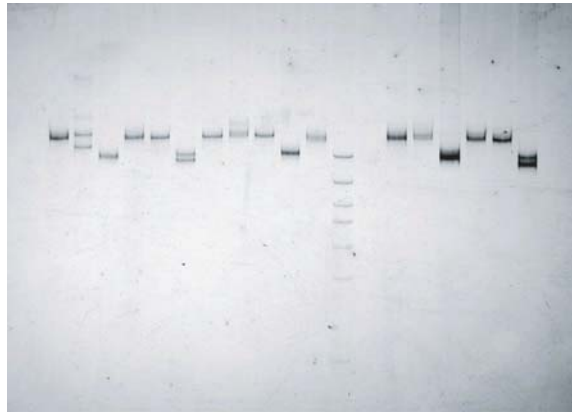


Figura 1. Electroforesis del intron Rpex mostrando las variaciones alélicas inter-específicas entre *C. macropomum* (parte inferior del gel) y *P. brachypomus* (parte superior del gel) totalmente separadas y las variaciones intra-específicas con tres alelos distribuidos entre heterocigotas y homocigotas en cada especie.

La técnica de «exon-primed intron-crossing» EPIC-PCR fue utilizada varias veces para estudiar el polimorfismo intra-específico de varios grupos de organismos acuáticos incluyendo los peces del género *Siganus* (Hassan *et al.*, 2003a,b ; Hassan & Bonhomme, 2005).

Las variaciones de tamaño de los intrones (80 a 10 000 nucleótidos), se deben a las deleciones o inserciones que se acumulan mas rápidamente que en los exones. El polimorfismo en el tamaño de los intrones es un eficiente descriptor de la estructura poblacional de las especies debido a: fácil acceso a variaciones alélicas, los alelos nulos son menos frecuentes que para otros marcadores moleculares, se puede amplificar varios locus intrónicos al mismo tiempo, los mismos cebadores pueden ser utilizados sobre varias especies filogenéticamente muy distintas. La acumulación rápida de mutaciones y la alta variabilidad genética constituyen a los EPIC en descriptores apropiados para la identificación de las especies (en esta

publicación, Hubert *et al.*) y para los estudios de micro-evolución al nivel intra-específico (Fig. 1).

Extracción de ADN

Tabla 1. Cebadores para la amplificación de los intrones de *C. macropomum* y *P. brachypomus*

Gen	Origen
Creatin Kinasa	Chow & Takeyama, 1998
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hassan <i>et al.</i> , 2003a
Major Histocompatibility complex class II antigen	Hassan <i>et al.</i> , 2003a
Aldolase B	Hassan <i>et al.</i> , 2003a
Ribosomal protein	Chow & Takeyama, 1998
Calmex	Chow, 1998
Growth Hormone*	Hassan <i>et al.</i> , 2003a
Aldolase C*	Hassan <i>et al.</i> , 2003a

* solo se utilizaron para *C. macropomum*

La extracción del ADN se realizó con el Kit comercial DNAeasy de Quiagen. La solución de amplificación por PCR tuvo un volumen final de 25 μ l, conteniendo 5 unidades de taq polimerasa (Promega) + buffer 10x, 2mM de dNTPs, 25 mM MgCl₂, 5 μ l de extracto de ADN y 1 μ l (20 pmol/ μ l) de cada primer (Tabla 1). La amplificación fue desarrollada con las condiciones siguientes: denaturación a 92°C durante 2 minutos; 30 ciclos (95°C 1 minuto; hibridación, 1 minuto a 54°C para Aldolasa B4 y MHC, o 58°C para Aldolasa C, o 60°C para CK, Rpex y Gpd, Gh; elongación 72°C 1 minuto); elongación final 72°C 5 minutos.

Análisis de datos

Las frecuencias alélicas de cada locus han permitido determinar: el numero de locus polimórficos, el promedio de alelos por locus, el nivel de heterocigidad mono y multilocus, para cada población la desviación a la panmixia por calculo del F_{is} y test sobre permutaciones y entre poblaciones, la diferenciación genética con la utilización del estimador del F_{st} (Weir & Cockerham, 1984) y test sobre

permutaciones. El tratamiento de datos fue desarrollado con el programa GENETIX (Belkhir *et al.*, 1998).

Resultados y Discusión

Híbridos artificiales entre *C. macropomum* y *P. brachypomus* están siendo producidos para la piscicultura. No obstante, considerando el número de locus diagnósticos se observa que no existe ninguna introgresión natural entre *C. macropomum* y *Piaractus brachypomus* en la región del Alto Madera. Al comparar los niveles de diversidad genética en ambas especies *C. macropomum* y *P. brachypomus*, se observa niveles de heterocigocidad de 0.29 y 0.20, respectivamente, similares a los encontrados en las especies de pirañas (presentado en esta publicación, Hubert *et al.*).

Durante 6 meses del año, el Mamoré y sus afluentes inundan casi totalmente la planicie central, provocando conexiones con los Ríos Beni, Madre de Dios e Iténez (Lauzanne *et al* 1991). Sin embargo esta zona de inundación no homogeniza los flujos genéticos de *C. macropomum*, sus poblaciones muestran una fuerte estructuración geográfica observada con el estimador F_{st} ($p < 0.01$) entre las poblaciones de tres zonas geográficas: 1) Isiboro 2) San Joaquín, Yata, Beni-Cachuela Esperanza y 3) Beni-puerto Salinas, Manuripi (Fig. 2). El aislamiento genético por distancia relacionado con el eje principal de los ríos ($r^2 = 0.53$ $p < 0.05$ $gdl = 13$), confirma que la dispersión de *C. macropomum* es preferencialmente por el río y no por la zona de inundación. *P. brachypomus* presenta diferencias significativas ($F_{st} = 0.11$, $p < 0.05$) solamente entre las poblaciones del Mamoré-Isiboro y Beni-Cachuela Esperanza, pero pocas muestras están disponibles para asegurar las otras comparaciones.

En el caso de *C. macropomum* en las poblaciones de Beni-Cachuela Esperanza, Beni-Puerto Salinas y Mamoré-Isiboro se observa una desviación a la panmixia relacionada con locus en equilibrio en otras poblaciones. La desviación esta debido al déficit en heterocigotos ($F_{is} > 0$), por la presencia de varias sub-poblaciones presentes en un mismo lugar (Efecto Wahlund) o debido a un exceso de heterocigotos ($F_{is} < 0$) que puede estar relacionado con individuos producidos de padres homocigotos diferentes al mismo locus, en este caso los individuos capturados serian de una misma familia. Las muestras del Beni-Puerto Salinas y del Manuripi no se diferencian genéticamente y podrían estar constituidas por una misma población extendida hasta la confluencia entre los dos ríos, hasta las cachuela esperanza.

A la diferencia de *C. macropomum* para *P. brachypomus* no se observa ninguna desviación a la panmixia en un mismo río ya sea en el Mamoré o en el Beni tanto en la región de arriba (Puerto Salinas) y la de abajo (Cachuela Esperanza) que no son diferenciadas entre ellas. Eso puede estar relacionado con las diferencias en la historia evolutiva o los rasgos de vida de las dos especies. Se puede suponer que *P. brachypomus* tiene mas intercambios genéticos en la misma cuenca relacionados con una capacidad migratoria más grande que *C. macropomum*, pero para testar esta hipótesis mas muestras son necesarios. Además fue observada una relación entre la variabilidad genética de *C. macropomum* y sus rasgos de vida (tasa de crecimiento y ciclo de reproducción, presentado en esta publicación, Nuñez *et al.*). La estructuración genética de esta especie será una guía para constituir planteles de reproductores para la piscicultura o para desarrollar una política de bioconservación.

Se debe enfatizar que la estructuración genética de *C. macropomum* esta en relación con la geografía, contrastando con la ausencia de relación entre los linajes de los haplotípos de D-Loop (en esta publicación, García *et al.* y Torrico *et al.*) y la geografía. Eso se explica en razón de la utilización de marcadores que dan informaciones muy diferentes, pero complementarias.

En el caso de *C. macropomum* la mezcla de los haplotípos del mtDNA informa de los intercambios migratorios a una escala paleo-ecología, en cuanto a las variaciones de las frecuencias alélicas del DNA nuclear informan a escala de la biología y de la ecología actual de los intercambios genéticos dependientes de la reproducción.

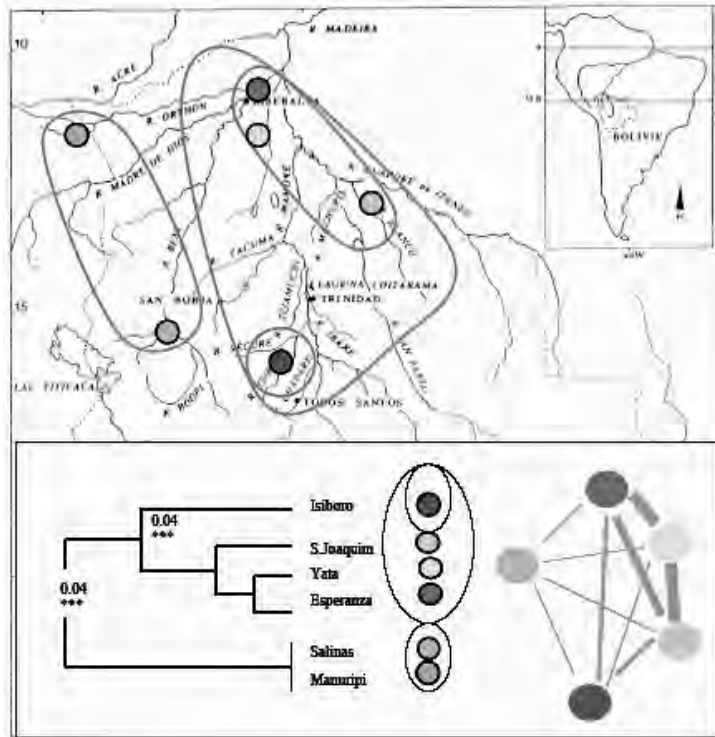


Figura 2. Muestreo para ambas especies: Ríos Manuripi (CM = 17 peces, PB = 0 peces), Beni - Cachuela Esperanza (CM = 12, PB = 12), Beni Puerto Salinas (CM = 10, PB = 10), Yata (CM = 10, PB = 6), Mamoré-Isiboro (CM = 14, PB = 16), Iténez-San Joaquín (CM = 13, PB = 5), flujos de genes entre las poblaciones de *C. macropomum* proporcional al grosor de las líneas. Dendrograma UPGMA según las distancias del estimador F_{ST} entre las poblaciones. La estructuración en 3 grupos esta indicada sobre el dendrograma y el mapa. Los valores de F_{ST} entre dos grupos juntos en cada nudo del dendrograma son significativas a $p < 0.01$.

Referencias

- Belkhir, K.; Borsa, P.; Goudet, J.; Chikhi, L.; Bonhomme, F. 1998. GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. <http://www.univ-montp2.fr/genetix.htm>. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université Montpellier II, Montpellier, France.
- Chow, S. 1998. Universal PCR primer for calmodilin gene intron in fish. *Fisheries Science*, 64: 999-1000.
- Chow, S.; Takeyama, H. 1998. Intron length variation observed in the creatine kinase and ribosomal protein genes of swordfish *Xiphias gladius*. *Fisheries Science*, 64: 397-402.

- Hassan, M.; Lemaire, C.; Fauvelot, C.; Bonhomme, F. 2003a. Seventeen New EPIC-PCR amplifiable introns in fish. *Molecular Ecology*, 2: 334-340.
- Hassan, M.; Harmelin-Vivien, M.; Bonhomme, F. 2003b. Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 291: 219-232.
- Hassan, M.; Bonhomme F. 2005. No reduction in neutral variability of mitochondrial and nuclear genes for a Lessepsian migrant, *Upeneus moluccensis*. *Journal of Fish Biology*, 66: 865-870.
- Lauzanne, L.; Loubens, G.; Le Guennec, B. 1991. Liste commentée des poissons de l'Amazonie bolivienne. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale*, 24: 61-76.
- Loubens, G.; Lauzanne, L.; & Le Guennec, B. 1992. Les milieux aquatiques de la région de Trinidad (Beni, Amazonie bolivienne). *Revue d'Hydrobiologie Tropicale*, 25 : 3-21.
- Orti, G.; Petry P.; Porto, J. I. R.; Jégu, M.; Meyer, A. 1997. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *Journal of Molecular Evolution*, 42: 169-182
- Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river course, and river types. In: Sioli, H. (ed.). The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin. *Monographiae Biologicae* 56. Dr. W. H. Junk Ed..The Netherlands, p. 127-165.
- Weir, B. S.; Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.



Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura

Coloquio Internacional
27 de Junio - 1 de Julio de 2005
Iquitos, Perú

Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica

Editores:

J.-F. Renno

C. García-Dávila

F. Duponchelle

J. Nuñez

