

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA DEL MATRINCHÁ (*Brycon orthotaenia*), MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES**



**JANETH DEL PILAR DERAZO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA  
PASTO, COLOMBIA  
2007**

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA DEL MATRINCHÁ (*Brycon orthotaenia*), MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES**

**JANETH DEL PILAR DERAZO**

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Ingeniero en Producción Acuícola

The seal of the University of Nariño is circular, featuring a central shield with a crown on top, flanked by two golden lions. The shield is set against a blue background with a white cross. The shield is surrounded by a yellow border containing the Latin motto "TANQUAM POSSIDERE QUANTUM HABES" at the top and "UNIVERSIDAD DE NARIÑO" at the bottom.

**Director**  
**PEDRO MANOEL GALETTI JUNIOR**  
Post- doctor en Ecología y Recursos Naturales

**Codirector**  
**ALVARO JAVIER BURGOS ARCOS**  
Zoot., M. Sc.

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**PROGRAMA DE INGENIERIA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA**  
**PASTO, COLOMBIA**  
**2007**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”.

Artículo 1° del acuerdo N° 324 del 11 de octubre de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**PEDRO MANOEL GALETTI Jr.**  
Director

---

**ALVARO JAVIER BURGOS ARCOS**  
Codirector

---

**CARLOS SOLARTE PORTILLA**  
Jurado Delegado

---

**HERMAN JAVIER LÓPEZ ERASO**  
Jurado

San Juan de pasto, 14 de noviembre de 2007.

DEDICO A:

Dios por guiarme en el transcurso de mis sueños y metas, por darme la valentía para romper las barreras que se interponían en mi camino.

A mi mamá Angelina, por ser madre y padre a la vez, pero ante todo una amiga, la cual con su amor, cariño, confianza y apoyo, me enseñó en cada instante el valor de la vida, a no rendirme ante las dificultades y hacer una mejor persona; a mis hermanos Ana, Javier, Jesús Jorge y Carlos por ser cómplices de mis sueños.

A mis sobrinos: Mauricio, Claudia, Daniel, Alejandra, Sebastián y Francis por ser el motor e inspiración de mis anhelos y metas, y ante todo por enseñarme a disfrutar de la vida; a mi abuela Francisca (QPD) por haberme enseñado lo bueno y lo malo.

Y a todos mis familiares por sus constantes consejos para que esto sea una realidad.

*Janeth del Pilar Derazo*

“Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucionar-las”.

“Quando o estudo da casa (Ecologia) e administração da casa (Economia) puderem fundir-se, e quando a ética puder ser estendida para incluir o ambiente, além dos valores humanos, então poderemos ser otimistas em relação ao futuro da humanidade”.

**Eugene P. Odum**

## AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus agradecimientos a:

Pedro Manoel Galetti Jr.	Biol., Ph.D. Docente de Pregrado y Post-grado del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos. Brasil.
Alvaro Javier Burgos Arcos	Zoot., M.Sc. Profesor del programa de Ingeniería en producción Acuícola, Universidad de Nariño.
Marco Antonio Imuez Figueroa	Zoot., Esp. Profesor del programa de Ingeniería en producción Acuícola, Universidad de Nariño.
Alexandra Sanches	Biol., M.Sc, Dr.Sc. Estudiante de Post-grado del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos. Brasil.
Carlos Solarte Portilla	Zoot., M.Sc, Dr.Sc. Profesor de la Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño.
Herman Javier López Eraso	Zoot. Profesor del programa de Ingeniería en producción Acuícola, Universidad de Nariño.
Luis Fernando Carvalho Costa	Biol., M.Sc, Dr.Sc. (c). Estudiante de Post-grado del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos. Brasil.

Patrícia Domingues Freitas	Biol., Dr.Sc. Docente de Pregrado y Post-grado del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos. Brasil.
Ana Karina Soto	Biol., M.Sc, Dr.Sc. (c). Estudiante de Post-grado del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos. Brasil.
Priscila Pini Zenatti	Biol., M.Sc, Dr.Sc. (c). Estudiante de Post-grado del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos. Brasil.
Mauricio Carrillo Ávila	Biol. Marino, M.Sc, Dr.Sc. (c). Estudiante de Post-grado del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos. Brasil.
Lidia Pinta Rodriguez	Ingeniera en Producción Acuícola (c).
Luis Alfonso Solarte	Secretario de la Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño.
Oscar Mejía Santacruz	Economista, Universidad de Nariño.
Piedad Mejía	Secretaria del programa de Ingeniería en producción Acuícola, Universidad de Nariño.

Al programa de ingeniería en producción Acuícola de la Universidad de Nariño.

A todo el personal que estudia y labora en el laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética de la Universidad Federal de São Carlos.

A los pastusos residentes en São Carlos (Hernán, Ana Maria y Paola).

## CONTENIDO

	<b>Pág</b>
INTRODUCCIÓN	25
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	27
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GENERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MARCO TEORICO	31
4.1 IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES ICTICAS EN SUR AMERICA.	31
4.2 CUENCA DEL RÍO SÃO FRANCISCO: ASPECTOS DE LA REGIÓN DE LA BARRERA DE TRÊS MARIAS (MG).	32
4.3 ASPECTOS GENERALES DE LA FAMILIA CHARACIDAE.	33
4.4 ASPECTOS GENERALES DEL GÉNERO BRYCON.	34
4.5 TAXONOMIA DE LA ESPECIE.	38
4.6 BIOLOGÍA DE LA ESPECIE <i>BRYCON ORHONTAENIA</i> .	38
4.6.1 Descripción.	38
4.6.2 Talla y peso.	39
4.6.3 Biología.	39
4.6.4 Reproducción.	40
4.7 ESTUDIOS GENÉTICOS EN EL GENERO BRYCON.	40
4.8 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE MIGRACIÓN REPRODUCTIVA DE PECES.	42
4.9 MARCADORES BASADOS EN ADN.	43
4.10 LA TÉCNICA DE <i>PCR</i> .	43
4.10.1 Técnica.	45
4.10.2 Ciclo de amplificación.	45
4.10.3 Tipos de PCR	47
4.10.4 Usos de la PCR.	48
4.11 MARCADORES MICROSATÉLITES.	49
4.11.1 Clasificación.	52
4.11.2 Ventajas de marcadores microsatélites	52
4.11.3 Limitaciones de los marcadores microsatélites.	53
4.11.4 Pasos para la obtención de marcadores microsatélites	53

	<b>Pág.</b>
4.12 UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN ESTUDIOS POBLACIONALES DE PECES, CON ÉNFASIS EN MICROSATÉLITES	54
4.13 MARCADORES MINISATÉLITES	56
4.14 VARIABILIDAD GENÉTICA	56
4.14.1 Los factores de evolución.	57
4.14.2 Equilibrio Hardy-Weinberg.	59
4.14.3 Población Endogámica	62
4.14.4 Índice F o de fijación de Wright.	63
4.14.5 Coeficiente de consanguinidad.	63
4.14.6 Depresión endogámica.	63
4.14.7 Coeficiente de desequilibrio de ligación	64
4.14.8 Estructura genética	64
4.14.9 Flujo génico y estructura poblacional	65
4.14.10 Métodos para estimar los niveles de flujo génico.	66
5. DISEÑO METODOLÓGICO	68
5.1 LOCALIZACIÓN.	68
5.2 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.	68
5.3 MATERIAL BIOLÓGICO.	68
5.4 TÉCNICAS DE LABORATORIO.	70
5.4.1 Extracción de ADN	71
5.4.2 Secuencias de primers utilizados	72
5.4.3 Reacción de PCR para marcadores microsatélites.	73
5.4.4 Análisis de electroforesis.	75
5.4.5 Gel de poliacrilamida.	76
5.4.6 Análisis en el secuenciador automático.	80
5.4.7 Obtención de datos de los geles de Poliacrilamida.	80
5.4.8 Análisis estadístico unilocus.	80
5.5 HIPÓTESIS.	81
5.6 VARIABLES A EVALUAR.	81
5.6.1 Variabilidad genética.	81
5.6.2 Frecuencias alélicas.	81
5.6.3 Número medio de alelos.	81
5.6.4 Heterogocidad observada.	81

	<b>Pág.</b>	
5.6.5	Heterogocidad esperada.	82
5.6.6	Distancia genética entre dos poblaciones.	82
5.6.7	Índice de identidad genética (I).	82
5.6.8	La estadística F.	83
5.6.9	Flujo génico.	84
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
6.1	CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES	85
6.2	FRECUENCIAS ALÉLICAS.	85
6.3	VARIABILIDAD GENÉTICA INTRA POBLACIONAL.	90
6.4	TEST DE EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG	94
6.5	DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	94
6.6	RIQUEZA ALELICA	95
6.7	VARIABILIDAD GENÉTICA INTER POBLACIONAL	96
6.8	DIVERSIDAD GENÉTICA	100
6.9	DISTANCIA E IDENTIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES	101
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	103
7.1	CONCLUSIONES	103
7.2	RECOMENDACIONES	104
	BIBLIOGRAFIA	106
	ANEXOS	117

## LISTA DE TABLAS

		Pág
Tabla 1	Número de alelos por locus y por población para los seis locus microsatélites analizados.	85
Tabla 2	Frecuencias alélicas de cinco microsatélites aplicados a una muestra de 44 ejemplares de <i>Brycon orthotaenia</i> en tres lugares de colecta del río São Francisco (JA, CA y JB).	86
Tabla 3	Caracterización de cinco locus microsatélites de <i>Brycon orthotaenia</i> . Número de alelos ( $n_a$ ) total, rango del tamaño de los alelos en pb y número de alelos por población, basados en una muestra de 44 individuos.	91
Tabla 4	Número de individuos evaluados ( $n$ ), heterozigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), coeficiente de endocruzamiento ( $F_{IS}$ ), valor de $p$ para desvío de equilibrio Hardy Weinberg ( $p$ ) y diversidad génica ( $dg$ ) basado en una muestra de 44 individuos.	93
Tabla 5	Desequilibrio de ligación analizado para los cinco locus a través del test de Chi - cuadrado ( $X^2$ ), valor de significancia ( $p$ ).	95
Tabla 6	Valores de riqueza alélica para las tres localidades del río São Francisco (JA, CA y JB).	95
Tabla 7	Valores estimados de $F_{ST}$ (par a par) y su significancia, después de la corrección de Bonferroni, para los pares de muestras (en paréntesis valores de $p$ ).	96
Tabla 8	Valores de distancia e identidad genética para las poblaciones de JA, CA y JB.	100
Tabla 9	Análisis UPGMA. Agrupamiento usando Nei's (1972). Distancia original.	102

## LISTA DE CUADROS

		<b>Pág.</b>
Cuadro 1	Uniones al azar de gametos; frecuencias esperadas de genotipos y fenotipos de la progenie.	61
Cuadro 2	Primers utilizados. Secuencias, Repeticiones.	72
Cuadro 3	Valores para la interpretación de $F_{ST}$	83

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
Figura 1	Brycon orthontaenia (matrinchã)	38
Figura 2	Representación grafica de la Reacción en Cadena de la Polimeraza.	47
Figura 3	Fluoróchromos utilizados en microsatélites	48
Figura 4	Esquema que ilustra la composición de una región microsatélite en una cadena de ADN.	50
Figura 5	Poza de genes.	60
Figura 6	Ubicación del laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética. (A: UFscar, B: Departamento de Genética y Evolución y C: laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética).	69
Figura 7	Cuenca del río São Francisco; Represa de Três Marias.	70
Figura 8	Primers utilizados en el presente estudio	72
Figura 9	Preparación de la reacción de PCR	73
Figura 10	Programación del termociclador	74
Figura 11	Deposito de las muestras en el gel de agarosa	75
Figura 12	Fragmentos amplificados mediante la PCR para el locus Bh16 de las muestras de la represa de Três Marias, Estado de São Paulo - Brasil.	76
Figura 13	Cámara vertical para gel de poliacrilamida.	77

Figura 14	Polimerización del gel.	79
Figura 15	Comparación de frecuencias alelicas del locus Bh5 para las tres poblaciones estudiadas.	87
Figura 16	Comparación de frecuencias alelicas del locus Bh6 para las tres poblaciones estudiadas.	86
Figura 17	Comparación de frecuencias alelicas del locus Bh14 para las tres poblaciones estudiadas.	88
Figura 18	Comparación de frecuencias alelicas del locus Bh16 para las tres poblaciones estudiadas.	89
Figura 19	Comparación de frecuencias alelicas del locus Bh17 para las tres poblaciones estudiadas.	90
Figura 20	Número de alelos únicos observados en un total de 39 para cinco locus microsatélites en las tres poblaciones estudiadas.	91
Figura 21	Modelo de estructura genética de <i>B. orthontaenia</i> de la región de Três Marias (R. São Francisco), modelo de población estructurada. Los cuadros de colores indican las distintas unidades reproductivas, las flechas indican las rutas migratorias.	98
Figura 22	Dendrograma exhibidor de parentesco genético entre individuos de <i>B. orthontaenia</i> , basado en un análisis grupal UPGMA. (1= JA, 2 = CA, 3 = JB).	102

## LISTA DE ANEXOS

		<b>Pág.</b>
ANEXO A	EL GENOTIPAJE DEL LOCUS BH6 A TRAVÉS DEL SECUENCIADOR PE BIOSYSTEMS, SE UTILIZO PRIMERS MARCADOS CON NED JUNTAMENTE CON PATRÓN ROX® GENE SCAN - 350.	118
ANEXO B	GELES DE POLIACRILAMIDA.	119
Figura 1	Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh8 (Monomorfo) en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.	119
Figura 2	Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh15 (Monomorfo) en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.	119
Figura 3	Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh5 en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.	120
Figura 4	Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh14 en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.	120
Figura 5	Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh16 en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.	121
Figura 6	Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh17 en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.	121
ANEXO C	MATRICES UTILIZADAS EN LOS DIFERENTES PROGRAMAS ESTADISTICOS.	122
1.	Matriz utilizada en el programa GENEPOP.	122
2.	Matriz utilizada en el programa FSTAT.	123
3.	Matriz utilizada en el programa TFPGA.	124

## LISTA DE ABREVIATURAS

**M:** molar.  
**U:** unidad.  
**NaCl:** cloruro de sodio.  
**MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio.  
**Tris-HCl:** tris ácido clorhídrico.  
**SDS:** Sulfato duodecil de sodio.  
**TE:** tris-HCl + EDTA  
**mM:** milimolar.  
**Cf:** concentración final.  
**pH:** potencial de hidrogeno.  
**EDTA:** ácido etilendiamino tetra-acético.  
**mL:** mililitros.  
**μl:** microlitros.  
**ng:** nanógramo.  
**Pmol:** picomolar.  
**Rpm:** rotaciones por minuto.  
**dNTPs:** desoxirribonucleótidos.  
**DMSO:** dimetil sulfoxido.  
**V:** voltios.  
**pb:** pares de bases.  
**θ:** theta.  
**PCR:** reacción en cadena de polimerasa.  
**PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida  
**RFLP:** polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción.  
**VNTR:** secuencias adyacentes que se repiten en número variable.  
**RAPD:** polimorfismo de ADN amplificado arbitrariamente.  
**SSR o STR:** microsatélites (secuencias cortas repetitivas).  
**NTS:** secuencias nucleótidos de la región codificante y de espaciador no transcrito  
**v:** voltios.

## GLOSARIO

**AGAROSA:** polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*. La agarosa es soluble en agua a temperaturas superiores a los 65°C, dependiendo del grado de sustituciones hidroxietílicas de sus cadenas laterales. Estas sustituciones se pueden modificar para provocar que la temperatura de gelificación varíe entre los 17 y los 40°C. La agarosa es un producto natural que forma una matriz inerte y no tóxica que supone una herramienta indispensable en gran cantidad de técnicas de Biología Molecular, Bioquímica y Biología Celular. Su uso más extendido es para construir geles que permitan separar moléculas de ADN mediante electroforesis, además de ser utilizada para fijar moléculas a su estructura como anticuerpos o antígenos. Igualmente se utiliza para el cultivo celular y microbiología.

**ALELO:** es una de las formas variantes de un gen en un locus (posición) o de un marcador particular en un cromosoma. Diferentes alelos de un gen producen variaciones en las características hereditarias tales como el color del cabello o el tipo de sangre. Cada una de las alternativas que puede tener un gen de un carácter. Los alelos se representan por una letra mayúscula para indicar su carácter dominante y por una minúscula si son recesivos. Si el organismo es heterocigoto y los alelos codominantes, se expresan ambos. Sinónimo: alelomorfo

**BIOCENOSIS:** conjunto de organismos animales y vegetales que viven en equilibrio dinámico en un biotopo determinado.

**BIOLOGÍA MOLECULAR:** estudio de la vida a un nivel molecular. Esta área se solapa con otros campos de la Biología y la Química, particularmente Genética y Bioquímica. La biología molecular concierne principalmente al entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula, lo que incluye muchísimas relaciones, entre ellas las del ADN con el ARN, la síntesis de proteínas, el metabolismo, y el cómo todas esas interacciones son reguladas para conseguir un afinado funcionamiento de la célula.

**CEBADOR O PRIMER:** secuencia corta de oligonucleótidos que se une en forma complementaria específica a una cadena única de ácido nucleico e inicia la síntesis de esa cadena en presencia de ADN polimerasa y nucleótidos en una reacción de PCR.

**CITOGENÉTICA:** estudio de los cromosomas, su estructura y su herencia.

**CODOMINANCIA:** Biología molecular, situación en que un individuo heterocigoto exhibe dos bandas correspondientes a ambos alelos de un gen específico; en genética mendeliana, es un tipo de herencia en el cual los dos alelos se expresan completamente en el estado heterocigótico.

**CUELLO DE BOTELLA:** Reducción del tamaño de una población que ocasiona, generalmente, deriva genética aleatoria.

**DENDROGRAMA:** diagrama ramificado que muestra, una jerarquía de categorías u objetos basada en el grado de semejanza o en el número de caracteres compartidos. La longitud de cada rama representa, la distancia que separa los dos objetos conectados.

**DISTANCIA GENÉTICA:** Medida de la semejanza genética entre dos poblaciones. Se calcula sobre la base de la variación en una combinación de caracteres fenotípicos, frecuencias alélicas o secuencias de ADN.

**ELECTROFORESIS:** Técnica para separar en un gel, mediante un campo eléctrico, las moléculas de acuerdo con el tamaño y la carga neta que poseen.

**ENDOGAMIA:** Apareamiento entre individuos que tienen uno o más antepasados en común. El caso más extremo es la autofecundación que se da de manera natural en muchas plantas y en algunos animales primitivos.

**FENOTIPO:** conjunto de caracteres observables de un organismo como consecuencia de la influencia de los caracteres hereditarios y la influencia del ambiente. El fenotipo es la manera de manifestarse el genotipo.

**FRECUENCIA ALÉLICA o FRECUENCIA GÉNICA:** Corresponde al porcentaje o frecuencia de cada gen existente en ese locus en la población respecto del total de genes de la población, y siempre se denominan por letras minúsculas arbitrariamente iniciándose siempre por p, para el alelo dominante en ese locus, en cambio para el resto de los genes son designados por las letras minúsculas siguientes. Número relativo de copias de un alelo en una población, expresado como proporción del número total de copias de todos los alelos de la población para un determinado locus.

**FRECUENCIA GENOTÍPICA.** Proporción de un genotipo en una población.

**GEN:** unidad funcional de un cromosoma. Un gen corresponde a un fragmento de DNA formado por unos centenares de bases nitrogenadas que llevan información para un carácter.

**GENOTIPO:** conjunto de alelos propios de un individuo, es decir, hace referencia a su constitución genética.

**HAPLOGRUPO:** es un grupo grande de haplotipos, que son series de alelos en lugares específicos de un cromosoma.

**HAPLOTIPO:** es la constitución alelica de múltiples locus para un mismo cromosoma. Un haplotipo en un organismo es estudiado usando una prueba de ADN genealógico

**HETEROCIGÓTICOS:** individuos que presentan alelos formados por genes diferentes, la heterosigosis se representa por un a letra mayúscula y otra minúscula (Cc).

**HETERÓCIGOTO:** Constitución genética de un individuo que porta un alelo dominante de un progenitor y un alelo recesivo del otro progenitor.

**HOMOCIGÓTICOS:** individuos que tienen los alelos formados por dos genes iguales, la homocigosis se representa con dos letras en mayúscula o en minúsculas (CC o cc).

**HOMÓCIGOTO:** Individuo cuya constitución genética consiste en el mismo alelo, dominante o recesivo, para un carácter hereditario.

**LIGACIÓN:** proceso en que se unen de nuevo dos o más fragmentos de ADN.

**LOCI:** es el plural de locus.

**LOCUS:** posición que ocupa un gen en un cromosoma determinado. La palabra locus viene del latín locus que quiere decir lugar. Todos los alelos de un gen pueden estar en el mismo locus. Es la localización o segmento de ADN que tiene información genética requerida para controlar algún aspecto del organismo.

**MARCADOR:** Genéticamente, un alelo, una banda en un gel o un carácter que sirve experimentalmente como sonda para identificar a un individuo o a alguna de sus características; Molecularmente, todo y cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen.

**POLIFORMISMO:** es la presencia de dos o más variantes heredables para una misma característica que coexisten dentro de una población. Esta característica puede ser apreciable tanto a nivel morfológico, como el número de cerdas en *D. melanogaster*, como a nivel molecular, tal es el caso de las alozimas.

**POLIMORFISMO GENÉTICO:** hace referencia a la existencia de múltiples alelos de un gen presentes en una población. Es decir, un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población. Por ejemplo, el color de la piel. Aquellos polimorfismos que afectan a la

secuencia codificante o reguladora y que producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión, pueden traducirse en diferentes fenotipos.

**REPETICIÓN EN TÁNDEM:** copias múltiples de una misma secuencia de bases en un cromosoma.

**VARIACIÓN GENÉTICA:** Variación en el carácter de un organismo, resultado de una mutación o de recombinación genética. Cambio de frecuencia alelica de una generación a otra dentro de una población como consecuencia del muestreo de un número finito de genes, lo cual es inevitable en todas las poblaciones de tamaño finito. Cuanto menor es la población, mayor es la deriva genética, con el resultado de la pérdida de algunos alelos y de la reducción de la diversidad genética. De ahí la importancia de minimizar la deriva genética como medio para favorecer la conservación de recursos genéticos.

## RESUMEN

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética de la Universidad Federal de São Carlos, ubicada en el municipio de São Carlos, São Paulo, Brasil, con el objetivo de Evaluar la variabilidad genética del matrinchã *Brycon orthotaenia*, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites.

Este estudio evaluó muestras de ADN tomadas del banco de ADN del laboratorio, provenientes de tres localidades próximas de la represa de Tres Marias: Jusante del río Abaeté (JA), Cascalheira até Abaeté (CA) y Jusante de Barragen (JB). Se utilizaron siete locus de microsatélites (Bh5, Bh6, Bh8, Bh14, Bh15, Bh16 y Bh17) aislados de *Brycon hilarii* en el laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética.

Fueron evaluadas un total de 44 muestras de ADN; los locus fueron amplificados vía PCR, utilizando un par de "primers" específicos. La detección de microsatélites vía PCR fue hecha en gel de electroforesis, utilizando agarosa y poliacrilamida. La visualización de las bandas en el gel se hizo directamente por coloración con bromuro de etidio y nitrato de plata, respectivamente; el análisis estadístico se realizó mediante la utilización del software GENEPOP, FSTAT y la verificación mediante el software TFGA. Las variables evaluadas fueron: Variabilidad genética, Frecuencias alélicas, Número de alelos, Heterogozidad observada, Heterogozidad esperada, Índice de fijación de Wright, Distancia genética entre dos poblaciones, Índice de identidad genética (I), La estadística F, Coeficiente de parentesco y Flujo génico.

Se amplificó un total de siete loci microsatélites de los cuales dos no amplificaron, por tal motivo se excluyeron del análisis.

Todos los loci juntos produjeron un total de 39 alelos diferentes, se encontró un total de tres alelos privados; los locus caracterizados revelaron una moderada variación genética (0,15 a 0,25). Se detectó un número relativamente pequeño de alelos, variando de 3 a 14 alelos por locus y una media de 7,8 ( $\pm 1,98$ ) alelos por locus. El nivel de heterozigosidad esperada varió de 30,4% a 90,5%, con una media de 71% ( $\pm 0,17$ ), mientras la heterozigosidad observada vario de 0% a 100%. Solamente el locus Bh17, no se mostró en las expectativas de Hardy-Weinberg en ninguna de las tres localidades, debido al exceso o déficit de heterocigotos como lo evidencia el valor  $F_{IS}$ .

El análisis de UPGMA determinó que las poblaciones JA y CA son cercanas una del otra, indicando alta semejanza entre estas dos localidades, mientras que la población JB tiene mayor diferencia, lo que indicó que es una población con menor parentesco.

No se observó diferencias significativas entre JA y CA, indicando homogeneidad genética entre estas localidades, en relación a los marcadores microsatélites, mientras que para los pares JA vs. JB y CA vs. JB mostraron diferencias significativas, esto equivale decir que las muestras comparadas debieron ser retiradas de por lo menos dos poblaciones.

En el hábitat de la subpoblación JA, en su confluencia con el río São Francisco, el río Abaéte provee más alta temperatura del agua, promedios altos de oxígeno y gran corriente de agua que las condiciones que se presentan río abajo de la represa. Además, es posible que los individuos de las diferentes unidades presenten un comportamiento de comigración durante el periodo reproductivo. Este modelo sugiere que el pez en la región C podría ser fragmentado en varias unidades de poblaciones y que durante el periodo reproductivo solamente una fracción migra hacia la represa, mientras la mayor migración posiblemente sería hacia localidades con condiciones medioambientales más favorables para la reproducción.

De acuerdo a los valores obtenidos mediante los cálculos del índice de Fijación ( $F_{ST}$ ), existe un flujo génico cerrado entre las localidades en estudio, lo que sugiere la presencia de un grupo poblacional entre las tres poblaciones de la represa de Três Marias. En conclusión *B. Orthontaenia* presenta diferenciación poblacional mostrando por lo menos dos unidades poblacionales y un restringido flujo genético en la población. Además en el presente trabajo se encontró que los valores estimados de  $F_{ST}$  en este trabajo se encontró entre 0,0051 y 0,1115 lo que indica una moderada estructuración poblacional en *Brycon orthontaenia*.

## ABSTRACT

This evaluation was carried out at the Molecular and Cytogenetic Biodiversity Laboratory of the Sao Carlos Federal University, located in the town of Sao Carlos, Sao Paulo State, Brazil, with the objective of evaluating the genetic variability of two breeds of fish named Curimatá, *Prochilodus Lineatus* through molecular microsatellites indicators.

For the analysis of this specie DNA samples taken from the DNA stockpile of the Molecular and Cytogenetic Biodiversity Laboratory of the Sao Carlos Federal University, Sao Paulo, Brazil, were evaluated. These samples were taken out from the specie *Prochilodus Lineatus* individuals in their liver and fin. The specie comes from the Emas waterfalls, in the Mogi-Guaçu River, Pirassununga municipality, Sao Paulo, and from the Hydrobiology and Pisciculture Post of the Furnas Hydroelectric, MG.

A total of 64 DNA samples were evaluated; 32 from each population. For this evaluation the methodology used was the PCR amplification via of the microsatellite regions beginning with the genomic DNA using specific and complementary primers to the unique sequences which boarder the microsatellites. The detection of the PCR amplification via was made of electrophoresis gels using agarosa. The ribbon visualization was made of the coloration with etidio bromorus; also, poliacrilamida gels were made based on silver nitrate aiming to do the genotype directly on this gel.

For this evaluation, two primers designed for the *Prochilodus Lineatus* specie were used, and eight primers described for the *Prochilodus Costatus* specie formerly evaluated in each and one of the species that finally showed polyformism.

The statistical analysis was made through the use of some software such as: GENEPOP, TFPGA, and FSTAT; also it was mandatory the use of the software STATISTICA for evaluating the data gathering obtained.

Ten loci microsatellites were amplified from which six satisfactory amplified, two didn't showed any amplification at all, and two didn't showed polyformism, then, the loci polyformed percentage was of 60%.

For the six loci analyzed it was possible the distinction of at least eighty-four alleles from which at least fifty-three were found among the Hydrobiology and Pisciculture Post of the Furnas' population. From those, 28.30% are exclusive alleles of this population; in the Mogi-Guaçu population sixty-four alleles were found and the 44.93% of these are exclusive alleles.

The expected heterozygosity varied from 0.1724 in the Mogi-Guaçu population to 0.8215 in the Hydrobiology and Pisciculture Post of the Furnas' population. That is why the culture population is the one which showed the highest level of heterozygosity observed.

The half value of the endogamy coefficient  $F_{IS}$  showed that the two populations have an heterozygote deficit due to the non aleatory breeding which could be the main cause of the deviation in the Hardy Weinberg equilibrium found in this research study.

The fixation index  $F_{ST}$  showed that both populations have a slightly moderate differentiation; however, they don't have a definite genetic structure and both populations share their genes due to the increasing genetic flow. This genetic flow is caused by the natural environment reproducers' captivity to be reproduced artificially inside the Hydrobiology and Pisciculture Post of the Furnas, aiming the repopulation.

Key Words: *Prochilodus Lineatus*, Microsatellites, genetic variability.

## INTRODUCCIÓN

La conservación de la diversidad biológica, traducida como el total de genes, especies y ecosistemas del planeta, asume enorme importancia no solamente por el valor intrínscico de los seres vivos, sino también por sus implicaciones económicas y sociales. No obstante, el aprovechamiento intensivo de estos recursos biológicos ha provocado una pérdida creciente de la biodiversidad mundial. En los foros científicos y de deliberación política, el proceso de erosión de los recursos naturales es comentado como uno de los problemas más serios a ser enfrentados por la población humana en este siglo. La adopción de estrategias para revertir este proceso se constituye en un desafío para los gobernantes actuales e investigadores.

La fauna suramericana de peces de agua dulce es la más rica en especies cuando está comparada con cualquier otra región zoogeográfica<sup>1</sup>. Aunque es exhuberante, varias actividades humanas, particularmente la contaminación de cuerpos de agua (disposición de efluentes industriales y domésticos), uso inadecuado del suelo (la minería, extracción de la arena, retiro del bosque ciliar, crianza de ganados y cosecha), el represamiento de los ríos para la generación de la energía eléctrica, y el “overfishing” ha afectado a este grupo taxonómico seriamente<sup>2</sup>. Estas actividades tienden a ampliarse, y un efecto desastroso sinérgico, pueden causar un daño irreversible al stock de los peces.

La construcción de la central hidroeléctrica de Tres Mariás en 1960 ha causado cambios importantes en la estructura poblacional de la ictiofauna del río de San Francisco y sus afluentes<sup>3</sup>, debido a la alta concentración de pescadores en el estado de Minas Gerais<sup>4</sup>, afectando el sector de la pesca. Además, río abajo de la represa de Três Marias, se ha observado una reducción sensible en la población de peces como resultado de la disminuida productividad de las aguas y del control de la descarga del río, previniendo la inundación de muchos lagos marginales que

---

<sup>1</sup> LOWE-MCCONNELL, R. H. Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999.

<sup>2</sup> AGOSTINHO, Angelo Antonio. Itaipu reservoir (Brasil): Impacts of impoundments on the fish and fisheries. In: COWXI, G. Rehabilitation os freshwaters fisheries. Bodmin, UK: Fishing news Book, 1995. p.184.

<sup>3</sup> GODINHO, Alexandre L. ¿E os peixes de Minas em 2010?. Em: Ciência Hoje. Lugar: Editorial. Vol. 16, No. 91, 1993. p. 49.

<sup>4</sup>MIRANDA, M. O.; RIBEIRO, L. P.; ARANTES, F. S.; SIQUEIRA, A. M. e DINIZ, M. G. Diagnóstico do setor pesqueiro no estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil: Superintendência do Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE), 1988. p. 30.

funcionaban como sitios naturales del crecimiento de peces, tal como expresan Ribeiro y Miranda<sup>5</sup>, lo mismo que Godinho<sup>6</sup>.

Con el comienzo de la construcción de las tres grandes centrales hidroeléctricas en Minas Gerais, río abajo de Tres Mariás, es posible asumir que la estructura poblacional de los peces, así como la pesca profesional, sufrieron un impacto negativo. Para ello los marcadores de microsatélite se han convertido, debido a su alto polimorfismo, versatilidad y facilidad de uso, en las herramientas moleculares preferidas para aplicaciones biológicas durante la última década. Su uso en la acuicultura contribuirá a profundizar en aspectos de la biología básicos para el avance de esta actividad.

El análisis de la estructuración y variabilidad genética permitió evaluar el estado actual de "salud" genética de las poblaciones naturales y reintroducidas, tras el dramático declive que han venido experimentando la mayoría de peces debido a la sobre explotación y al mal manejo de los recursos hidrobiológicos. En este punto, el conocimiento del nivel y distribución de la variabilidad genética sustentará una base científica para un desarrollo más efectivo de estrategias encaminadas a la conservación del equilibrio ambiental y al aprovechamiento de los recursos de una manera racional.

Los resultados del presente trabajo como la moderada variabilidad genética, el desequilibrio de tales genes, entre otros, permiten inferir el riesgo biológico en el que se encuentra esta especie, debido a las consecuencias que los parámetros genéticos implican.

---

<sup>5</sup> RIBEIRO, L. P. e MIRANDA, M. O. T. Localização de juvenis de surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) em lagoas marginais do rio São Francisco, Município de Januária/MG. (Relatório). Belo Horizonte Brasil: Superintendência do Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE), 1990. p. 29.

<sup>6</sup> GODINHO, Op Cit. p. 49.

## 1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

El crecimiento poblacional e industrial ha generado continua demanda de energía eléctrica. Estas circunstancias dieron origen a varios proyectos gubernamentales de construcción de represas hidroeléctricas en las grandes cuencas fluviales alrededor del mundo.

Las barreras hidroeléctricas a pesar de sus reconocidos aspectos utilitarios, causan impactos sobre la ictiofauna, tales como: interrupción de las vías migratorias de peces migradores, destrucción de lagos marginales, modificación del equilibrio alimentario de las especies y pérdida de variabilidad genética<sup>7.8</sup>

La instalación de represas a lo largo de las rutas migratorias es un grave problema para los peces migradores de Brasil<sup>9.10.11.12</sup>, como para los de otros países<sup>13</sup>. Las alteraciones en las rutas migratorias impuestas por estos obstáculos no son bien conocidas. Sucesivas represas a lo largo de un río pueden provocar extinción local de especies de peces migradores y disminuir la producción pesquera. Especies de peces migradores, que tienden a ser abundantes antes de un represamiento, son paulatinamente sustituidas por especies no migratorias de bajo valor comercial<sup>14</sup>.

La construcción de la represa Três Mariás provocó el surgimiento de obstáculos a la migración reproductiva de los peces, además de restringir las entradas de los afluentes del reservorio, perjudicando así el funcionamiento de los lagos y lagunas marginales que eran tenidas como zonas de alevinaje natural; de este modo, los represamientos alteran el hábitat natural de las poblaciones, por lo tanto, riesgo de reducción o hasta la misma extinción; una de estas especies es Matrinchá, el cual ha sufrido una grave disminución y se encuentra como especie en vía de extinción.

---

<sup>7</sup> GODINHO, Hugo Pereira and GODINHO, Alexandre L. Fish communities in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *In: Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 5. 1994. p. 187.

<sup>8</sup> GODINHO, Hugo Pereira. Fisheries management and conservation in southeastern Brazil: Current status and needs. *In: Action before extinction: Conserving fish gametic diversity*, An International Workshop. Vancouver, Feb. 1998. p. 17.

<sup>9</sup> WOYNAROVICH, E. The hydroelectric power plants and the fish fauna. *Verh. Internat. Verein. In: Limnol.* Vol. 24. 1991. p. 2534.

<sup>10</sup> GODINHO, Op cit. p. 49.

<sup>11</sup> GODINHO and GODINHO, Op Cit. p. 187

<sup>12</sup> GODINHO, Op Cit. P. 16-18

<sup>13</sup> PAVLOV, D.S. Structures assisting the migrations of non-salmonid fish: USSR. *FAO Fisheries Technical Paper*. 1989. p. 308.

<sup>14</sup> GODINHO, Op Cit. p. 49.

Por lo anterior, se hace necesaria la utilización de herramientas moleculares modernas, con el fin de analizar el estado de la variabilidad y demás parámetros genéticos, que nos ayudan a diagnosticar la salud poblacional desde el punto molecular.

## 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Los marcadores moleculares microsatélites permiten establecer la variabilidad genética de poblaciones de Matrinchá (*Brycon orthotaenia*), en la represa Tres Marías?

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la variabilidad genética del pez Matrinchá (*Brycon orthotaenia*), mediante marcadores moleculares microsatélites.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar polimorfismos intra e ínter poblacionales en las poblaciones de Jusante río Abaeté, Cascalheira até Abaeté y Jusante de Barragen.
- Determinar las frecuencias alélicas de las poblaciones.
- Determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de cada una de ellas.
- Evaluar el coeficiente de endocruzamiento ( $F_{IS}$ ) y el coeficiente del índice de fijación ( $F_{ST}$ ) calculados para cada locus y para el total.
- Establecer los valores de identidad y distancia genética.

## 4. MARCO TEORICO

### 4.1 IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES ICTICAS EN SUR AMERICA.

La contaminación provoca cambios ponderables en el número de individuos y de especies de una comunidad o de una biocenosis, desplazando formas influyentes por otras de mayor rango de tolerancia, dando lugar particularmente al establecimiento de las especies saprófilas y a las eusaprobias. Ello trae un cambio visible en varios sentidos. Por lo tanto, posee una estructura determinada y una fisiología propia que se refleja en un tipo particular de funcionalidad<sup>15</sup>.

Los cambios antedichos son los siguientes: en el gradiente de densidad específica, en la composición o estructura comunitaria con predominio o avance de los organismos saprobiontes y eurihalinos, en la eutrofización o en el nivel sucesional con caída del índice de diversidad específica de las comunidades, en la dinámica de la biocenosis.

Con especial referencia a la acuicultura, torna cada vez más impropio el ambiente acuático para la reproducción y la vida de especies icticas de importancia económica y otros organismos objeto de cultivo intensivo o extensivo<sup>16</sup>.

Según el mismo autor, las aguas lólicas y muchas veces las de la serie lentita se utilizan "legal" o ilegalmente como cuerpos receptores de efluentes sanitarios e industriales. El desagüe sanitario de ciudades y poblados que no están cerca del mar, suele verterse sin tratamiento, o con tratamientos primarios a los cursos de agua. Si se agrega que en numerosos países todas las instalaciones humanas aisladas y situadas sobre ríos y arroyos tienen desagües sanitarios directos, fenómeno que se repite en lugares urbanos y periurbanos ("cloacas clandestinas") el panorama se complica aún más.

Pero la contaminación de origen industrial es seguramente la de peores consecuencias, ya que los ambientes lólicos carecen de capacidad autodepuradora cuando el volumen del efluente pasa un límite crítico, al que se llega fácilmente.

Ahora ha comenzado la polución radioactiva y la polución térmica que se ha recrudecido en aquellos países que como Argentina, están desarrollando el uso de

---

<sup>15</sup> ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). Polución y degradación del ambiente. Disponible en internet: <http://www.fao.org/docrep/005/AC8675/AC867500.htm#Toc>.

<sup>16</sup> RINQUELET, R. A. SR/5. Polución y Degradación del Ambiente con Referencia a la Acuicultura. En: Instituto de Limnología. La Plata. Argentina, 2005. p. 3.

la energía nuclear (Central de Atucha, funcionando; Central de Embalse de Río 111° en construcción) y la polución térmica que es conocida en muchos países con industrias azucareras a base de caña de azúcar.

En Colombia, las cuencas del Magdalena y del Sinú han mermado su capacidad productiva en peces por la degradación ambiental (polución, erosión, talado de bosques que han alterado el régimen de aportes) y por la pesca irracional. Esto ha afectado al bocachico (*Prochilodus reticulatus magdalenae*), al nicuro (*Pimelodus clarias*), al bagre tigre (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y al capas o barbudo cañere (*Pimelodus grosakopffii*). La gran disminución de varios Siluriformes, llamados en Colombia lauchas (*Pygidium sp.*) parece deberse más que nada a la competencia con peces introducidos.

Según el mismo autor, fuera de América Latina, la acuicultura de aguas frías se practica en aguas de temperatura inferior a 20°C, y se basa principalmente en los salmónidos. La misma situación existe en América Latina, donde 12 países han desarrollado ese tipo de acuicultura: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, México, Panamá, Perú, Uruguay y Venezuela.

#### **4.2 CUENCA DEL RÍO SÃO FRANCISCO: ASPECTOS DE LA REGIÓN DE LA BARRERA DE TRÊS MARIAS (MG).**

La cuenca del Río São Francisco abarca un área total de 631.133 km<sup>2</sup>, equivaliendo a 7,4% del territorio brasileño<sup>17</sup>. El Río São Francisco tiene 2.780 km de extensión, bañando siete estados y 450 municipios. Cerca del 83% de su área reside en los estados de Minas Gerais y Bahia, un área donde habitan 13 millones de habitantes aproximadamente<sup>18.19</sup>.

Brasil posee cerca de 3 x 10<sup>6</sup> Has de reservorios de los cuales más del 23% están situados en la cuenca del São Francisco, siendo los mayores el de Três Marias, Sabradinho, Itaparica, Moxotó y los complejos Paulo Afonso y Xingó<sup>20</sup>.

El reservorio de Três Marias (105.000 Has) construido en 1960, fue el primer reservorio brasileño de hidroeléctrica, construido originalmente para el control de las inundaciones en la región del São Francisco. La barrera posee 75 metros de

---

<sup>17</sup> PAIVA, M. P. Grandes represas do Brasil. Brasília: EDITERRA, 1982. p. 192.

<sup>18</sup> PETRERE, M. River fisheries in Brazil: a review. Regulated Rivers. Research and Management., Vol. 4, 1989. p. 10.

<sup>19</sup> CAPPIO, L. F.; MARTINS, A. e KIRCHNER, R. O Rio São Francisco. Petrópolis, Brasil: Editora Vozes, 1995. p.110.

<sup>20</sup> SATO, Y. e GODINHO, Hugo Pereira. Peixes da bacia do Rio São Francisco. Em: Lowe-McConnell: Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Lugar: EDUSP, 1999. p. 407.

altura y no dispone de ningún mecanismo para el paso de peces, dividiendo el río en dos partes<sup>21</sup>.

El reservorio posee aguas templadas, oligotróficas y monomíticas; es verticalmente estratificado de noviembre a febrero cuando la diferencia de temperatura entre es mayor de 3°C, y destratificada en julio con una mezcla vertical durante la época seca<sup>22</sup>. Además de eso, las condiciones ambientales han sufrido grandes mudanzas tanto antes como después de la barrera, como menor temperatura y menores tasas de oxígeno disuelto, que pueden estar influenciando las características biológicas de los organismos de aquella región<sup>23</sup>.

El área después de la barrera, aproximadamente 32 km, desboca el Rio Abaeté, un importante tributario del Río São Francisco, cuyas condiciones limnológicas son diferentes a las de la barrera, donde la temperatura del agua es mayor en una media de 3 – 6°C<sup>24</sup>. Muchas especies de peces migradores parecen desovar en este tributario, aparentemente el desove no ocurre en el canal principal del São Francisco entre la barrera y el Abaeté<sup>25</sup>.

La ictiofauna del São Francisco es compuesta por cerca de 152 especies. Cerca del 8,0% de ellas migran para reproducirse. Dentro de estas, siete son migradoras de larga distancia: *Brycon orthontaenia* (matrinchã), *Salminus brasiliensis* (dorado), *Leporinus elongatus* (piau-verdadero), *prochilodus costatus* (curimbatá-piôa) y *Prochilodus argenteus* (curimbatá-pacu) (Characiformes). *Conorhynchus conirostris* (pirá) e *Pseudoplatystoma corruscans* (surubim) (siluriformes). De estas, *B. Orthontaenia*, *S. brasiliensis*, *C. conirostris* y *P. corruscans* están en la lista como especies “presumiblemente amenazadas” del estado de Minas Gerais<sup>26</sup>.

#### 4.3 ASPECTOS GENERALES DE LA FAMILIA CHARACIDAE

Según Lewinsohn y Prado<sup>27</sup>, los peces se presentan como los vertebrados más diversos y los de mayor variación genética conocida. Por su parte, Lowe-

<sup>21</sup> SATO, Y. e GODINHO, Op cit. p. 406

<sup>22</sup> *Ibid*, p. 407

<sup>23</sup> SATO, Y. e OSÓRIO, F. M. F. A pesca profissional na região de três Marias, MG. *Em*: Anais do V Encontro Anual de Aqüicultura de Minas Gerais. Lugar: Editorial, 1986. p. 91

<sup>24</sup> ESTEVES, F. A.; AMORIM, J. C. C.; CARDOSO, E. L. e BARBOSA, F. A. R. Caracterização limnológica preliminar da represa de Três Marias (MG) com base em alguns parâmetros ambientais básicos. *Em*: Ciencia e cultura., Vol. 37, No. 9, 1985. p. 610.

<sup>25</sup> SATO e GODINHO, Op cit. p. 410.

<sup>26</sup> LINS, L. V.; MACHADO, A. B. M.; COSTA, C. N. R. e HERMANN, G. Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção: contendo a lista oficial de fauna ameaçada de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil: Fundação Biodiversitas, 1997. p. 55.

<sup>27</sup> LEWINSOHN, T. M. e PRADO, P. I. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Contexto, 2002.

McConnell<sup>28</sup> dice que existen aproximadamente 20.000 especies de peces descritas actualmente y la mayor parte habita aguas calientes de los océanos tropicales, haciendo un total de 40%. Los peces de agua dulce son responsables por el 20 a 25% de la biodiversidad de vertebrados hay indicios de que solamente en América del Sur existen más de 8.000 especies, teniendo en cuenta que apenas dos de las diversas orden descritas (Characiformes y Siluriformes).

Para Vari y Malabarba<sup>29</sup>, un porcentaje de 30 a 40% de toda la diversidad existente en la ictiofauna Neotropical, la cuál no ha sido reconocida. Characidae, la mayor familia entre los Characiformes, incluye casi el 55% de los peces que pertenecen al orden de los peces de agua dulce, y puede ser un grupo monofilético de la especie<sup>30</sup>.

#### 4.4 ASPECTOS GENERALES DEL GÉNERO BRYCON

El género *Brycon* pertenece a la más amplia y compleja familia del orden Characiformes, a la familia Characidae. Esta engloba a la mayor parte de los peces de escamas de agua dulce de Brasil, totalizando cerca de 400 especies. En Sur América las especies están distribuidas en cerca de 30 subfamilias y 250 géneros. La subfamilia Bryconinae, cuyo principal representante es el género *Brycon*, se encuentra ampliamente distribuida por toda Sur América y Centro América<sup>31</sup>. Este género es considerado uno de los géneros más grandes de los characiformes neotropicales, con un número superior a 60 especies, de las cuales 40 especies son reconocidas, y se encuentran distribuidos en Sur América, encontrándolas en las cuencas del Amazonas, Plata y São Francisco<sup>32</sup> y junto con *Triporthus* y *Chalceus*, han sido incluidas en la tribu Bryconini<sup>33</sup>.

Las especies de ese género, son conocidas regionalmente como matrinchãs, piracanjubas, piraputangas o pirapitingas, constituyen un grupo de peces

---

<sup>28</sup> LOWE-McCONNELL. Op cit

<sup>29</sup> VARI, R. P. e MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: An Overview. In: MALABARBA, L. R. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: Edipucrs., 1998. p. 603.

<sup>30</sup> LUCENA, C. A. S. Estudio filogenético de la familia Characidae con una discusión de grupos naturales propuestos (Teleostei, Osthariophysii, Characiformes). Tesis de doctorado. São Paulo, SP: Instituto de Biociencias, Universidad de São Paulo., 1993. p. 158

<sup>31</sup> BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes na bacia do rio São Francisco). Minas Gerais: Ministério da irrigação – CODEVASF., 1988. p. 115

<sup>32</sup> HATANAKA, Terumi e GALETTI Jr., Pedro Manuel. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory fresh water fish species. In: Genet. Mol. Biol., No. 26, 2003. p. 19

<sup>33</sup> WEITZMAN, S.H. The phylogenetic relationships of *Triporthus*, a genus of South American Characid fishes. –Stanford Ichthyological Bulletin 7., Vol. 4, 1960. p. 239-244

neotropicales migradores<sup>34</sup> de reconocida importancia comercial, tanto para la pesca cuanto para la acuicultura. Actualmente, *Brycon* aparece solo en la subfamilia Bryconinae<sup>35</sup>. Este género pertenece a la subfamilia Bryconidae, etimológicamente el nombre genérico *Brycon* + inae, del griego brycho que significa morder, devorar con cierto ruido. En sentido específico significa subfamilia de peces que comen haciendo ruido (tienen tres series de dientes superiores).

Son peces grandes de cuerpo alargado, de forma bonita; las escamas, tanto de abajo, como de encima de la línea lateral son muy semejantes entre si; la línea lateral es completa, esta bajo la línea media del cuerpo y es curvada anteriormente; vientre redondo, haciendo el cuerpo bien fusiforme, sobre todo en los juveniles; maxila y mandíbula alargadas, a veces, la mandíbula puede ser más corta que la maxilar; dientes pentacúspides (tricúspides en el aspecto externo), dispuestos en tres series en la región premaxilar; branquioespinas numerosas; radios medios de la aleta caudal, ligeramente mas largos, formando una punta marginal.

El genero *Brycon* es reconocido por un conjunto de caracteres, de los cuales algunos son compartidos por otras especies de la familia, motivo por el cual el género es considerado como “mal definido”. Además de eso, la existencia de una gran diversidad morfológica del cráneo y dientes entre las diferentes especies, hacen que algunos autores cuestionen la probabilidad de la naturaleza monofilética del grupo<sup>36</sup>.<sup>37</sup>.<sup>38</sup>. Caracterizan a los representantes de Bryconinae por la presencia de dientes gruesos y multicuspidados distribuidos en tres series en el premaxilar y dos en el dentario. Los dientes de la serie externa del dentario son grandes; y en la serie interna, existe apenas un diente y junto a este, pero distantes una serie de dientes pequeños.

Weitzman<sup>39</sup> considera los géneros *Triportheus* y *Chalceus* muy próximos a *Brycon*, agrupándolos en una única tribu, Bryconini. Gery<sup>40</sup>, subdivide a la subfamilia Bryconinae en tres tribus: Bryconini, Salminini, y Triportheni. Este autor propone a *Triportheus* en subfamilia por considerar la forma y distribución de los dientes

---

<sup>34</sup> HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characidae). Bull. Br. Mus. In: Nat. Hist. (Zool.), Vol. 43, No. 1, 1982. p. 1-47.

<sup>35</sup> GERY, J. Characoids of the World. TFH publications, Neptune city, New Jersey. 1977. p. 672

<sup>36</sup> HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characidae). Bull. Br. Mus. In: Nat. Hist. (Zool.). Vol. 43, No. 1, 1982. p. 40.

<sup>37</sup> CASTRO, R. M. C. and VARI, R. P. Moojenichthys Miranda-Ribeiro (Pisces: Osthariophysi: Characidae), a phylogenetic reapraisal and redescription. Proc. In: Biol. Soc. Wash., Vol. 103, No. 3, 1990. P. 525-542.

<sup>38</sup> BRITSKI ; SATO Y ROSA, Op cit. 1988. p.p. 115.

<sup>39</sup> WEITZMAN, S. H. The phylogenetic relationships of *Triportheus*, a genus of South America Characidae fishes. Stanford Ichthyologic Bulletin., Vol. 7, No. 4, 1960. p. 239-243.

<sup>40</sup> GERY, J. Op cit. p. 672.

similares a las de *Brycon*. Además de eso, UJ<sup>41</sup> eleva a la subfamilia Bryconinae al nivel de familia, esto es que, Bryconidae, en la cual el género *Triportheus* es incluido. Por otro lado, Portugal<sup>42</sup>, en una revisión de *Triportheus*, lo relaciona en el gran grupo de caracídeos sur americanos, en el cual estarían incluidos *Brycon* y *Salminus*.

Datos citogenéticos sugieren una mayor proximidad entre Bryconinae y Salmininae entre si, que con cualquier otro Characidae, inclusive Triporthinae, revelada por una macro estructura cariotípica bastante similar<sup>43</sup>.

En tanto, a pesar de las probables relaciones de parentesco citadas, el género *Brycon* fue considerado por mucho tiempo como el único representante de la subfamilia Bryconinae. En un estudio sobre las relaciones filogenéticas de este género, no fue encontrada ninguna evidencia en cuanto a la relación próxima entre los grupos discutidos anteriormente<sup>44</sup>.

Algunas especies del género ejecutan largas migraciones reproductivas generalmente en períodos de lluvia. Después de un largo período de alimentación o acumulación de reservas en los ríos de mayor longitud y volumen de agua, donde existe una gran disponibilidad de recursos energéticos, los peces migran la subienda en dirección a las cabeceras para desovar. Esto ocurre generalmente, después de grandes lluvias, pues es cuando el nivel del río está en ascensión, con aguas bastante turbias y oxigenadas, garantizando la protección de ovas y larvas contra predadores y la alta necesidad de oxigenación de esta fase inicial.

Se trata de caracidos riofílicos, que habitan ríos de aguas limpias y de alta oxigenación. Poseen un tamaño medio y grande, pudiendo llegar hasta 8 Kg y son omnívoros, se alimentan en el ambiente natural preferiblemente de frutos, semillas e insectos<sup>45, 46</sup>.

---

<sup>41</sup> UJ, A. Etude comparative de l'osteologie cranienne dos poissons de la famille des Characidae et son importance phylogenetique. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences de l'Université de Genève., 1990.

<sup>42</sup> PORTUGAL, L.P.S. Revisão sistemática do gênero *Triportheus* Cope (Teleostei, Characiformes, Characidae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências de São Paulo.1990.

<sup>43</sup> MARGARIDO, Vladimir and GALETTI Jr., Pedro Manuel. Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconidae). In: *Cytobios.*, Vol. 85, 1996. p. 225.

<sup>44</sup> ZANATA, A. M. Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon* Müller e Troschel, 1844 (Characidae; Characiformes). Doctoral Thesis. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 2000. p. 358.

<sup>45</sup> HORN, M. H. Evidence for dispersal of fig seeds by the fruit-eating characid fish *Brycon guatemalensis* Regan in a Costa Rican tropical rain forest. In: *Oecologia.*, Vol. 109, 1997. p. 259-264.

<sup>46</sup> LIMA, F. C. T. and CASTRO, R. M. C. *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). *Ichthyological Explorations of Freshwaters.*, Vol. 11, No. 2, 2000. p. 156.

Constituye un grupo de reconocida importancia comercial<sup>47.48.49</sup>, pues son bastante procurados para fines culinarios, por su carne de alta calidad. Además de eso, este grupo de peces disputa con el tucunaré y el dorado como un de los grupos más apreciados por la pesca deportiva, ya que presentan gran resistencia y voracidad en el momento de la captura. Estos animales también han sido bastante solicitados por la actividad turística, dada la belleza de su coloración, con el cuerpo amarillo y aletas rojizas.

Sin embargo, a pesar de la importancia comercial y ecológica de estos peces, es sabido que las especies de *Brycon*, son extremadamente sensibles frente a las mudanzas de sus habitats naturales.

En tanto, en algunas regiones brasileras, se ha observado una reducción drástica de estos peces y algunas especies ya se encuentran amenazadas de extinción<sup>50</sup>. Acciones antrópicas tales como, desmantelamiento de bosques ciliares, construcción de represas hidroeléctricas, drenajes para aprovechamiento agrícola, polución del agua, ecoturismo mal planeado, han sido apuntadas como las posibles causas del desequilibrio de los ambientes naturales en los cuales estos peces viven o utilizan para la obtención de sus recursos alimenticios.

En el 2004 fue publicada por el Ministro de Medio Ambiente la “Lista Nacional de Especies de Invertebrados Acuáticos y Peces Amenazados de Extinción”, en la cual seis especies de *Brycon* fueron citadas: *Brycon devillei* de los estados Espírito Santo y Minas Gerais; *Brycon insignis*, 1877 de Minas Gerais, Rio de Janeiro y São Paulo; *Brycon nattereri*, 1864 de Goiás, Minas Gerais, PR, y São Paulo; y *Brycon opalinus* de Minas Gerais, Rio de Janeiro y São Paulo; *Brycon orbignyanus* de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, PR, Santa Catarina, Rio Grande do Sul y São Paulo; y *Brycon vermelha*<sup>51</sup> de Bahia, Espírito Santo y Minas Gerais.

---

<sup>47</sup> MENDONÇA, J. O. J. e MELO, J. S. C. Introdução. I Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero *Brycon*., 1994. p. 1.

<sup>48</sup> LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr, C. J.(Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Ed EDIPUCRS. Porto Alegre, RS. 2003. p. 742.

<sup>49</sup> BORBA, M. R.; FRACALOSI, D. M.; PEZZATO, L. E.; MENOYO, D.; BAUTISTA, J. M. Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. In: Aquatic Living Resources., Vol.16., 2003. p. 362-369.

<sup>50</sup> MENDONÇA e MELO. Op cit. p. 1

<sup>51</sup> LIMA, and CASTRO, Op cit. p. 158.

#### 4.5 TAXONOMIA DE LA ESPECIE

PHILUM:	Cordata
CLASE:	Pisces
ORDEN:	Characiformes
FAMILIA:	Characidae
SUBFAMILIA:	Bryconinae
GENERO:	Brycon
ESPECIE:	<i>Orthontaenia</i>
NOMBRE CIENTIFICO:	<i>Brycon orthontaenia</i>
NOMBRE VULGAR:	Matrinchá, Matrinxã

#### 4.6. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE *BRYCON ORTHONTAENIA*.

A continuación se exponen algunos aspectos sobre la biología de esta especie (figura 1).

**Figura 1. *Brycon orthontaenia* (matrinchá)**

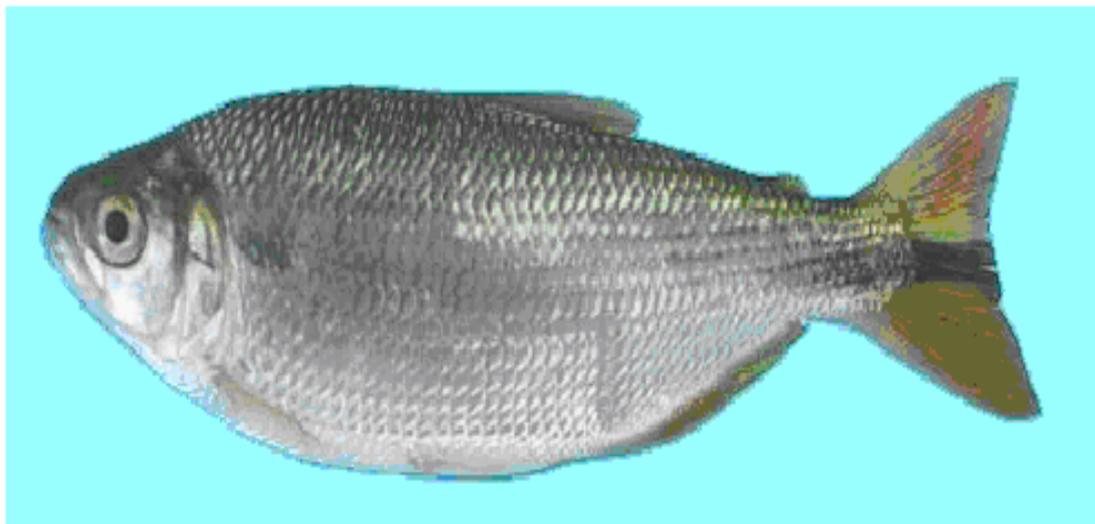


Foto: Yoshimi Sato

Fuente. Esta investigación

**4.6.1 Descripción.** El matrinchá antiguamente conocida como *Brycon lundii* presenta un cuerpo fusiforme, alargado lateralmente con una mancha en el humeral bien evidente<sup>52</sup>.

<sup>52</sup> BRITSKI, H. A.; SILIMON, KZ de S. de; LOPES, BS. Peixes do Pantanal: Manual de identificação. Brasília: Embrapa - SPI; Corumbá: Embrapa – CPAP. 1999. p. 184.

Según Godoy<sup>53</sup>, el cuerpo es fusiforme, alargado y típico; la cabeza es pequeña y la boca tiene una posición terminal; maxila y mandíbula del mismo tamaño; el perfil cefálico predorsal es ascendente hasta el inicio de la dorsal y presenta una leve concavidad atrás de la cabeza ; en el inicio de la dorsal esta la mayor altura de la especie; la boca, aprovisionada de dientes especiales; el perfil ventral, en juveniles es levemente cóncavo entre la mandíbula y la base de la aleta caudal, en adultos el perfil ventral es curvado.

La aleta caudal tiene bifurcación pequeña; presenta una coloración plateada, en la cabeza y lado dorsal son verde – grisáceo, el opérculo tiene una coloración rosada, en la región humeral tiene una mancha azulada, alargada en sentido alargo del cuerpo, en cima de la parte curvada de la línea lateral; el labio superior presenta un color rosa; las aletas pectorales grisáceo; la aleta dorsal grisácea con tonalidades rosas; las aletas ventrales y anal blancas; la aleta caudal de color vino tinto con gris plateado, en juveniles, tienen una medida entre 20 y 30 cm de longitud total, las aletas pueden ser filamentadas de color rosado debido a la irrigación sanguínea; la línea lateral completa, curvada anteriormente y casi recta después de la pectoral; posee tres series de dientes pentacúspides; posee escamas de tipo cicloide<sup>54</sup>.

**4.6.2 Talla y peso.** Según el mismo autor las hembras tienen una longitud total entre 65 – 79 cm y peso entre 4 – 8 kg; los machos presentan una longitud total de 53 – 68 cm y peso entre 2 – 3 kg.

**4.6.3 Biología.** Es una especie riofílica, la cuál tiene hábitos alimenticios herbívoros y frutívoros, y eventualmente puede ser insectívoro e ictiófago, se alimenta principalmente de hojas, flores y frutos. Esta especie migratoria es endémica del río São Francisco y tiene mucha importancia comercial<sup>55</sup>. Los stock naturales de matrinchã están bien reducidos en algunas áreas de el Río São Francisco, debido a la remoción de la vegetación ribereña y el bosque ciliar. Además se encuentra en la lista de especies presumiblemente amenazadas de Minas Gerais<sup>56</sup>.

---

<sup>53</sup> GODOY, M. D. Peixes do Brasil suborden characidae, Bacia do Rio Mogi Guassu. Peracicaba, SP. Ed. Franciscana., Vol. 2, 1975. p. 219 – 397.

<sup>54</sup> *Ibíd.*, p. 220.

<sup>55</sup> SATO, Y. Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões. São Carlos: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de São Carlos, 1999. (Tese, Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais)., 1999. p. 179.

<sup>56</sup> LINS; MACHADO; COSTA e HERRMANN, G. *Op cit.* p. 55.

**4.6.4 Reproducción.** Según Sato<sup>57</sup>, su período reproductivo ocurre de noviembre a febrero, presentando desova total. Anualmente necesitan emigrar centenas de kilómetros río arriba o abajo respectivamente, antes del desove y después. El peso de las gónadas en las hembras representa entre el 12 y 20 % del peso total del pez, mientras en el macho presenta valores entre 1 y 1,2%. La hembra tiene maduración sexual a los tres años cuando alcanza 25 cm de longitud aproximadamente, mientras que, los machos alcanzan la madurez sexual a los dos años cuando alcanzan 20 cm de longitud aproximadamente. La fecundación es externa (ovovivíparo) y el desove ocurre cuando el río está lleno por las lluvias y la temperatura oscila entre 24 y 30 °C.

El óvulo es redondo y tiene un diámetro entre 1,1 y 1,3 mm. En el momento del desove, después de la fecundación (el mismo sin ser fecundado) el óvulo se hidrata bastante, llegando a aumentar el diámetro 2 a 2,5 veces. La incubación de los huevos ocurre comúnmente en los lagos secundarios, donde los alevinos y juveniles de Matrinchá viven hasta abril o mayo.

## 4.7 ESTUDIOS GENÉTICOS EN EL GENERO BRYCON

Según Margarido y Galetti<sup>58</sup>, los cromosomas estudiados en el género *Brycon* de varias cuencas hidrográficas reveló una estabilidad significativa de el cariotipo, caracterizado por el mismo número de cromosomas ( $2n = 50$ ) y por la alta similitud en la estructura cromosómica entre las especies.

Las regiones organizadoras de nucléolos fueron estudiados por métodos de coloración con nitrato de plata o con coloración con fluorocromos base específicos, parecen también ser conservadas dentro de este género con un par común detectado de cromosomas en todas las especies. La distribución de la heterocromatina constitutiva es considerada un importante instrumento en la caracterización y diferenciación de las especies en este grupo, pues hay variaciones en la cantidad y localización de las bandas.<sup>59</sup>

Algunos trabajos en el género *Brycon* se restringen a análisis genético bioquímico que fueron realizados en *Brycon* sp., *Brycon Reinhardti*<sup>60</sup>, *Brycon Cephalus* y *Brycon Erythropterum*<sup>61</sup>.

---

<sup>57</sup> SATO. Op Cit. p. 179

<sup>58</sup> MARGARIDO and GALETTI, Op cit., p. 220.

<sup>59</sup> Ibíd., p. 221.

<sup>60</sup> GALHARDO, E. y TOLEDO FILHO, S. A. Estudo genético-bioquímico de pirapitinga do sul, *Brycon* sp da Estação da Paraibuna CESP. Em: Ciência e Cultura., Vol. 39, 1987. p. 722.

En un estudio con la especie endémica del Río Paraíba del sur, *Brycon opalinus*<sup>62</sup>, detectaron, mediante a la análisis RFLP del ADN mitocondrial, una diferenciación inter poblacional. Todavía en esta especie fueron aislados siete loci de microsatélites<sup>63</sup> que posteriormente fueron utilizados en un estudio de *B. opalinus* del Río Paraíba del sur, donde fue detectada una estructuración poblacional<sup>64</sup>.

En *Brycon orbignyanus*, *B. microlepis* y *B. orthontaenia*, fueron desenvueltos estudios por Wasco<sup>65</sup>, con la utilización de secuencias de VNTRs como primers únicos en PCRs, el que permitió la detección de patrones de bandas específicas, además de los altos niveles de polimorfismo intraespecíficos. El estudio habla de un modelo de estructuración poblacional entre las especies de *Brycon orthontaenia* en el río San Francisco, observando diferenciación genética en las dos localidades.

Wasco<sup>66</sup> aisló a través de PCR, ADNs ribosomáticos 5S de siete especies de *Brycon* (*B. orthontaenia*, *B. orbignyanus*, *B. microlepis*, *B. insignis*, *B. cephalus* y *Brycon* sp.) de diferentes sistemas hidrográficos. Determino las secuencias nucleotídicas de la región codificante y de espaciador no transcrito (NTS), las cuales se muestran altamente conservadas y muy variables respectivamente, además de eso, fueron detectadas dos clases de NTS en cada especie.

Un trabajo reciente es el aislamiento de siete locus microsatélites de la especie *Brycon hilarii* de la cuenca del Río Paraguay<sup>67</sup>, los cuales revelaron una substancial variación genética; encontrando 39 alelos diferentes en total, los que

---

<sup>61</sup> VAL, L. A and ALMEIDA-VAL, M. F. Adaptive features of amazon fishes. Hemoglobins of *Brycon* cf. *Cephalus* and *Brycon* cf. *Erythropterum* (pisces). *Revista Brasileira de Genética.*, Vol. 11, 1998. p. 30.

<sup>62</sup> HILSDORF, A. W. S.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; KRIEGER, M. H.; KRIEGER, J. E. Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Curvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *In: Aquaculture.*, Vol. 214, 2002. p. 81-91.

<sup>63</sup> BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. M.; GUIMARÃES, E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Identification and characterization of microsatellites *loci* in *Brycon opalinus* (Curvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *In: Molecular Ecology Notes.*, Vol. 3, 2003. p. 297-298.

<sup>64</sup> BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *In: Aquaculture.*, Vol. 247, 2005. p. 62.

<sup>65</sup> WASCO, Adriana Pinto. Marcadores cromossômicos e moleculares no gênero *Brycon* (Characidae): uma contribuição à biologia evolutiva e à conservação biológica destes peixes. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2000.

<sup>66</sup> *Ibid.*,

<sup>67</sup> SANCHES, Alexandra e GALETTI Jr., Pedro Manuel. Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação. *In press*

variaron de 3 a 8 alelos por locus. Algunos alelos se mostraron más frecuentes que otros, presentando una variación de frecuencias de 0,017 a 0,817. La heterocigosidad esperada varió de 0,31 a 0,81. Los locus microsatélites aislados en este trabajo serán utilizados en nuestros análisis.

#### **4.8 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE MIGRACIÓN REPRODUCTIVA DE PECES.**

Los peces exhiben un largo espectro de ciclo de vida en respuesta a la variedad zonal encontrada en aguas tropicales, la cual presenta mudanzas en el nivel del agua, que afectan a los peces, principalmente en la disponibilidad del alimento. Esas estrategias de ciclos de vida resultan de la selección natural para una especie producir un número máximo de jóvenes en el periodo del año más favorable para su sobrevivencia, cuando existe alimento abundante para el crecimiento rápido y protección contra pescadores<sup>68</sup>.

Cada especie para reproducirse necesita de determinados factores; de un ambiente que le sea propicio y cada río posee factores ecológicos propios, los cuales condicionan la migración y desove de los peces en tiempos diferentes, mismos para zonas geográficas próximas entre si. Esas condiciones de medio (factores exógenos) sumadas a los factores biológicos del propio pez (endógenos), determinan el momento de las migraciones y desova<sup>69</sup>.

En cuanto a los factores endógenos de determinación de desove, los peces, a través de la migración reproductiva pueden metabolizar las gorduras acumuladas y producir ácido láctico. Se sabe que el ácido láctico en exceso en la corriente sanguínea va actuar sobre la inter renal y la hipófisis y en respuesta tales glándulas endocrinas, principalmente la hipófisis, elaboran gónadas estimulantes, permitiendo el desarrollo de las gónadas, la maduración de las gametas y el estímulo final para el propio desove<sup>70</sup>.

Dentro de los factores exógenos de determinación del periodo reproductivo se puede considerar la temperatura, transparencia, turbidez, nivel, velocidad de las aguas, profundidad, salinidad; los cuales son resultado de la influencia directa de las mudanzas del nivel del agua. Los desoves, ocurren en lugares donde el río presenta trechos de gran profundidad, donde se pueden acumular los cardúmenes permitiéndoles espacio para sus millones de gametas, las cuales se fecundan en un ambiente de aguas corrientosas y mezcladas. Varios minutos transcurren entre

---

<sup>68</sup> LOWE MCCONNELL, Op cit.

<sup>69</sup> GODOY, M. P. Locais de desovas de peixes num trecho do rio Mogi Guassu. Estado de São Paulo, Brasil. *Em: Revista Brasileira de Biologia.*, Vol. 14, 1954. p. 375 – 396.

<sup>70</sup> *Ibid.*, p. 397.

la exclusión de los óvulos, la fecundación y la hibridación de la ova para la emersión, la cual flotara a través de la corriente y las capas superiores del río, a fin de que haya una perfecta incubación<sup>71</sup>.

#### 4.9 MARCADORES BASADOS EN ADN.

La molécula de ADN (ácido desoxirribonucleótido) es formada por tres componentes químicos: un grupo fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada, los cuales forman los nucleótidos. De la organización lineal de los nucleótidos, que son juntados por la ley: A-T y C-G, se tienen la cadena de ADN. El ADN es por lo tanto una molécula bifilamentar, compuesta por de las cadenas de nucleótidos que están interligadas a través de puentes de hidrogeno efectuadas entre las bases complementarias. El ADN posee una orientación particular que capacita para la realización de importantes funciones en la célula, dentro de ellas la duplicación, bien como favorece la técnica de PCR (*in vitro*). Cada filamento sirve de molde para la síntesis de su filamento complementario.

El apareamiento establecido entre una adenina y una timina es hecho por medio de dos puentes de hidrógeno, en cuanto citosina y guanina lo hacen compartiendo tres puentes de hidrógeno. La diferencia de contenido AT/CG presente en el ADN está directamente asociada a la elaboración de *primers* para el estudio de genes específicos.

A finales de la década 70 con el descubrimiento de las enzimas de restricción, se iniciaron los primeros estudios con marcadores moleculares basados en ADN. En los años siguientes, los avances de la genética de poblaciones alcanzo desarrollo con el uso de marcadores *RFLPs* (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Fue en el intento con el surgió la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que los estudios en esta área ganaron considerablemente expresión<sup>72</sup>. La biología molecular presenta una amplia área de actuación. Solamente para la genética de la conservación han posibilitado la estimación de heterosigozis, análisis de estructuras familiares, ocurrencia de endemismo, biodiversidad nominal, identificación, comportamiento de especies invasoras<sup>73</sup>.

#### 4.10 LA TÉCNICA DE PCR.

La Reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular,

---

<sup>71</sup> GODOY, Op cit. p. 219 – 397.

<sup>72</sup> AVISE, John. C. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman and Hall, 1994. p. 511.

<sup>73</sup> SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. Biología Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Brasil., 2001. p. 192.

partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento; esto ocurre cuando una enzima especializada en copiar ADN es colocada sobre condiciones ideales para realizar tal reacción.

La técnica fue descrita por científico norteamericano Kary Mullis en 1993<sup>74</sup>. El principio se basa en la amplificación de un segmento de ADN, el inicio de la síntesis comienza en dos diferentes posiciones en la molécula. La Reacción en Cadena de la Polimerasa tiene como principal agente la enzima termo - sensible ADN *Taq* polimerasa, que une nucleótidos dispersos en la reacción para montar una molécula, usando un ADN molde (ADN *témlate*). Una PCR se realiza en volúmenes más pequeños entre 10 y 100 microlitros. Teóricamente es necesaria apenas una blanco de molécula de ADN para que la reacción pueda ocurrir.

Los didesoxiribonucleótidos trifosfatos (dATP, dTTP, dGTP, dTTP), son colocados en cantidades equimolares en la reacción. La concentración de los nucleótidos varía de 50 a 200 M. Las concentraciones de sales, como cloruro de potasio y sodio, pueden interferir en la reacción adhiriéndose a la molécula de DNA. Otro factor relevante es la concentración de cloruro de magnesio un cátion divalente que funciona como cofactor enzimático para la *Taq* polimerasa. La cantidad de esos elementos debe girar en torno de 50 mM para las sales de potasio y de sodio y 2.5 mM para el magnesio. El pH óptimo para el funcionamiento de la enzima debe estar en torno de 7.5 y la temperatura en 72 °C. La temperatura de desnaturalización debe ser próxima a 94°C. El tiempo de elongación depende del tamaño del fragmento a ser amplificado estando en torno de 30 segundos a un minuto y el número de ciclos varia de 20 a 35<sup>75</sup>.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN. Tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con la consiguiente reducción de costo del equipo necesario para llevarla a cabo.

Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (94 °C en algunos momentos) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos son: *Thermus aquaticus* (polimerasa *Taq*), *Pyrococcus furiosus*

---

<sup>74</sup> SYKES, B. As Sete Filhas de Eva. A ciência que revela nossa herança genética. Rio de Janeiro: Brasil. Record, 2003.

<sup>75</sup> PUBL. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa., Vol. 2, jun. 2004. p. 37.

(Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy progresivas (Taq) con otras con corrección de errores (Pfu, Vent).

Hoy, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador<sup>76</sup>.

#### 4.10.1 Técnica. Para realizar la técnica se necesita<sup>77</sup>:

- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el sustrato para polimerizar nuevo DNA.
- Dos cebadores (*primers*), oligonucleótidos, que cada uno es complementario a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que se usan para iniciar la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia (no más de 4 kb. Delimitan la zona de ADN a amplificar.
- Iones de magnesio ( $Mg^{2+}$ ), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ).
- Una solución tampón que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ADN polimerasa o mezcla de polimerasas.
- ADN molde, que es la muestra que se va a amplificar.
- Termociclador, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada paso del ciclo.

**4.10.2 Ciclo de amplificación.** La PCR básica consta de un primer paso de calentamiento hasta 94-95°C durante 5-10 minutos, en el cuál se activa la ADN polimerasa, en caso de necesitarlo (figura 2). Posteriormente tiene tres pasos que se repiten entre 20 y 40 veces:

- Desnaturalización.
- Unión del cebador.
- Extensión de la cadena.

---

<sup>76</sup> WIKIPEDIA FOUNDATION. PCR. En: Wikipedia: La enciclopedia Libre. España.(Sitada el 3 de octubre de 2007). Disponible en Internet, URL:: <http://es.wikipedia.org/wiki/PCR>.

<sup>77</sup> *Ibíd.*

Una vez completados todos los ciclos, se finaliza con dos pasos, uno de extensión de la cadena a temperatura óptima de la ADN polimerasa, normalmente 72°C, para finalizar enfriando la muestra a 4°C para su conservación.

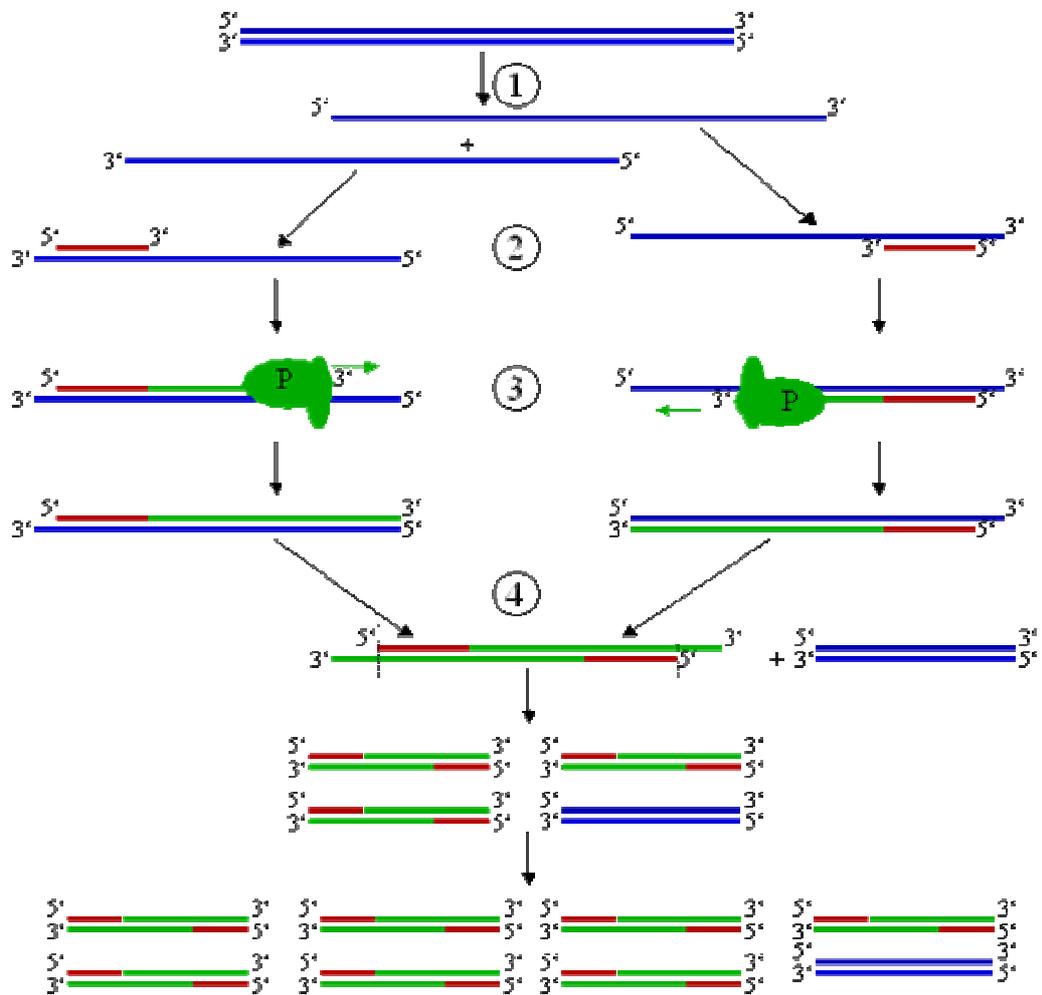
Este ciclo (desnaturalización-hibridación-extensión) se repetirá un número de veces dependiente de la cantidad de fragmentos amplificados que se desee. Generalmente son 30 ciclos, ya que un número mucho mayor de ciclos no implica un mayor rendimiento.

- **Desnaturalización.** En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo la forma más habitual el calentamiento (94-95°C) de la muestra. Otros métodos, raramente empleados, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.

- **Unión del cebador (Primers).** A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para esto es necesario que la temperatura descienda (generalmente, a 55 °C, aunque se puede variar según sea el caso entre 45°C y 65°C). Estos cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

- **Extensión de la cadena.** Por último actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis del nuevo ADN. Se aumenta la temperatura hasta 72 °C, temperatura a la cual la ADN polimerasa presenta su máximo de actividad, produciéndose una copia del fragmento que se desea amplificar.

Figura 2. Representación grafica de la Reacción en Cadena de la Polimeraza.



Fuente. Esta investigación

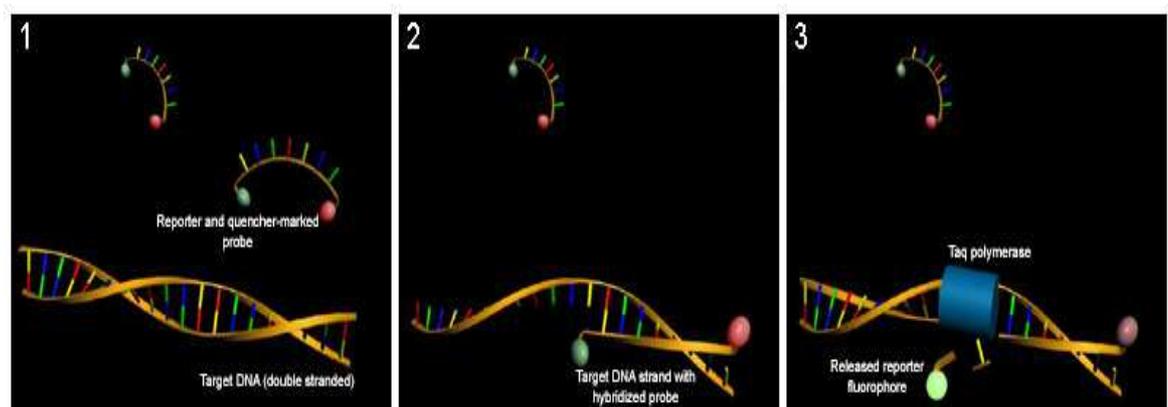
**4.10.3 Tipos de PCR.** Existen diferentes tipos de PCR, algunos de ellos se exponen a continuación<sup>78</sup>.

- **PCR anidada.** Técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada.

<sup>78</sup> WIKIPEDIA FOUNDATION. PCR, Op cit.

- **PCR in situ.** PCR realizada sobre preparaciones fijas sobre un portaobjetos.
- **PCR múltiplex.** PCR que se amplifica más de una secuencia en una misma reacción.
- **RT-PCR.** Donde el molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa, como Tth, para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario).
- **PCR tiempo real.** Permite cuantificar la cantidad de ADN o RNA amplificado en cada momento. Para la detección de la cantidad de ADN específico se emplea una sonda unida a dos fluoró cromos que híbrida en la zona intermedia entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*), cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET) (figura 3). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluoró cromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.

**Figura 3.** Fluoró cromos utilizados en Microsatélites.



Fuente. Esta investigación

#### 4.10.4 Usos de la PCR.

- Huella genética
- Test de Paternidad
- Diagnóstico de enfermedades hereditarias

- Clonación de genes
- Mutagénesis
- Análisis de ADN fósil
- Genotipado de mutaciones específicas
- Identificación de especies
- Estudio de variabilidad genética en diferentes especies

#### 4.11 MARCADORES MICROSATÉLITES.

**SSR** (*Short Sequence Repeat*) o **STR** (*Short Tandem Repeat*)<sup>79</sup> por sus siglas en inglés. El término microsatélite se refiere a una clase de marcadores de ADN de herencia codominante que posee patrón de herencia mendeliana. Los microsatélites se caracterizan por consistir en una serie de repeticiones de secuencias cortas de nucleótidos: CAC, GACA, TA, GT, GATA<sup>80</sup> (Figura 4).

Estos son secuencias de 1 a 6 bases repetidas en tandem, que están presentes en organismos procariontas y eucariontas, en menor o mayor abundancia, y pueden ser encontrados en regiones codificantes y no codificantes del genoma<sup>81</sup>. El origen y la función no están claros. Presentan la particularidad de que el número de repeticiones de los motivos básicos que las constituyen es muy variable, y puede diferir de un individuo a otro. Por tanto, analizando estas regiones es posible identificar individuos en poblaciones animales o vegetales<sup>82</sup>.

---

<sup>79</sup> WIKIPEDIA FOUNDATION. MICROSATÉLITES. En: Wikipedia: La enciclopedia Libre. España. (Citada el 3 de octubre de 2007). Disponible en Internet, URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/Microsatélites>.

<sup>80</sup> Ibid.

<sup>81</sup> SAMBROOK, J. and RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. I, II, III, 3<sup>a</sup> Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

<sup>82</sup> WIKIPEDIA FOUNDATION. MICROSATÉLITES, Op Cit.



además de poder resultar en una convergencia excesiva de estados alélicos, conduciendo a una subestimación de la divergencia alelica entre poblaciones.

A pesar de que el mecanismo de evolución de los microsatélites aun no está totalmente claro, ellos han sido ampliamente empleados debido a su alta variabilidad, lo que los convierte en marcadores poderosos. Varias medidas genéticas han sido utilizadas para el análisis de los microsatélites, como los  $R_{ST}$  que usa la varianza de los números de las repeticiones y es compatible con el *Stepwise mutation model*, o como el  $F_{ST}$ , que se basa en la varianza de las frecuencias alélicas y es compatible con el *Infinite allele mutation model*<sup>86</sup>.

Los microsatélites se han mostrado como una herramienta extremadamente ventajosa para el mapeamiento del genoma de muchos organismos. No obstante sus aplicaciones se extienden por diferentes áreas como estudios filogenéticos, forenses, de paternidad, genética de poblaciones, conservación y manejo de recursos biológicos<sup>87</sup>. La estimación de las relaciones entre taxa muy relacionados se pueden tornar más fáciles si caracteres que evolucionan de manera más rápida fueran utilizados. Debido a su alta tasa de mutación, los microsatélites pueden ser bastante informativos para esos estudios<sup>88</sup>.

El hecho de encontrar los microsatélites en regiones, generalmente no codificantes, donde la tasa de sustitución nucleotídica es mayor, torna la estrategia de diseñar *Primers* universales en secuencias conservadas, que es muy efectiva para el ADN mitocondrial, más problemática para los microsatélites<sup>89</sup>. Por tanto un factor limitante para el empleo de microsatélites es la necesidad de desarrollar *Primers* específicos, que exige la construcción de una biblioteca geonómica para el organismo en cuestión.

Un microsatélite<sup>90</sup> está típicamente conformado por un motivo repetitivo, en el que se encuentra contenido la secuencia repetida, y dos regiones flanqueantes, las cuales se están a ambos lados del motivo repetitivo. Sin embargo en algunos casos, puede haber dos motivos repetitivos o más dentro de un microsatélite. Para que un microsatélite sea considerado útil como marcador molecular, toda la variación de la secuencia o polimorfismo debe hallarse dentro del motivo repetitivo, y por el contrario, las regiones flanqueantes deben estar altamente conservadas al punto de no presentar ninguna variación de secuencia.

---

<sup>86</sup> RICHARD and TORPE. Infinite allele mutation model. 2001

<sup>87</sup> JARNE, P., LAGODA, P. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree*. Vol. 11, No. 10, 1996. p. 424 – 429

<sup>88</sup> GOLDSTEIN, D. B. Et Al. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *In: Genetic*. Vol. 139, No. 1, 1995. p. 471.

<sup>89</sup> ZANE, L.; BARGELLONI, L. and PATARNELLO, T. Strategies for microsatellites isolation: a review. *In: Molecular Ecology*., Vol. 11, 2002, p. 1 – 16.

<sup>90</sup> WIKIPEDIA FOUNDATION. MICROSATÉLITES, Op Cit.

Partiendo de esta hipótesis se diseñan *primers* o iniciadores (también llamados cebadores) es decir, fragmentos de ADN que tienen la misma secuencia que los extremos de las regiones flanqueantes para poder amplificar (o producir un alto número de copias) un microsatélite a través de una PCR.

Los fragmentos así producidos son separados de acuerdo a su longitud en pares de base a través de una PAGE o electrofóresis en gel de poliacrilamida. Partiendo de la hipótesis de que en microsatélite sólo varía el número de repeticiones dentro del motivo repetitivo, fragmentos que tienen el mismo tamaño, así determinado por la PAGE, tienen la misma secuencia, de manera que todos los fragmentos de un mismo tamaño representarían un alelo.

Estos alelos se heredarían de manera codominante, es decir, que en cada locus un individuo podría presentar uno o más alelos, dependiendo del número de juegos de cromosomas que posea. Por ejemplo, los humanos somos diploides, es decir, poseemos dos juegos completos de cromosomas y por lo tanto para un locus microsatélite podemos presentar un alelo (si ambos progenitores nos transmitieron alelos de la misma secuencia y tamaño) o dos alelos (si cada progenitor nos heredó un alelo de tamaño diferente).

**4.11.1 Clasificación.** Los microsatélites se clasifican de acuerdo al número de nucleótidos que posea el motivo de repetición como: mono, di, tri, tetra, penta o hexanucleótido.

La clasificación también incluye el patrón de orden de los motivos:

- **Puro o perfecto:** Un solo motivo repetido n veces en serie. ej:  $(AC)_9$
- **Puro interrumpido:** Un solo motivo repetido n veces, donde se intercalan nucleótidos entre las distintas repeticiones. ej:  $(CA)_2AA(CA)_{12}$
- **Compuestos:** Dos o más motivos repetidos en serie. ej:  $(GT)_2(TG)_{10}$
- **Compuestos interrumpidos:** Al menos uno de sus motivos presenta nucleótidos intercalados. ej:  $(CT)_4(GT)_2CTAT(GT)_{15}$
- **Complejos:** Combinaciones entre cualquiera de las clases anteriores, sin ningún patrón de orden definido. ej:  $(ACC)_8+TG+(GA)_{12}+(TTA)_5+GC+(TTA)_4$

**4.11.2 Ventajas de marcadores microsatélites.** Los marcadores microsatélites comparten ventajas con los marcadores RFLP<sup>91</sup>.

---

<sup>91</sup> FERREIRA e GRATTAPAGLIA, Op. Cit., p. 57 - 62

- Teniendo en cuenta la expresión codominante y el mutualismo, los marcadores SSR son los que posee el más elevado contenido de información de polimorfismo, o "PIC" (Polymorphism Information Content).
- Se puede utilizar como población de referencia para estudios de ligación y mapeo genético cualquier población segregante.
- Los SSR son muy frecuentes y están distribuidos al azar, permitiendo la más completa cobertura de cualquier genoma eucariota.
- Los microsatélites son bien conservados entre especies relacionadas.
- Posee segmentos polimórficos generados los cuales son pequeños como para ser detectados vía PCR.
- Son ideales para el mapeamiento genético y físico, para la identificación y discriminación de genotipos y en estudios de genética de poblaciones.

**4.11.3 Limitaciones de los marcadores microsatélites.** Los marcadores microsatélites presentan las siguientes limitaciones.

- Gran cantidad de trabajo necesario para el desarrollo previo de los marcadores.
- Se necesita personal especializado y equipo sofisticado para el secuenciamiento automático asociado al elevado costo de un proyecto de esta naturaleza.

**4.11.4 Pasos para la obtención de marcadores microsatélites.** Los pasos para la obtención son los siguientes<sup>92</sup>:

- ADN genómico total cortado con enzima.
- Construcción de biblioteca genómica de fragmentos pequeños.
- Selección de colonias con sonda complementaria. Ej: sonda de oligo (GT)<sub>n</sub> para microsatélites CA.
- Colonias positivas secuenciadas sólo para C y A para verificar la extensión del microsatélite.

---

<sup>92</sup> FERREIRA e GRATTAPAGLIA, Op Cit., p. 61.

- Selección de clones con microsatélites de por lo menos (CA)<sub>8</sub> con secuencias flanqueadoras adecuadas.
- Secuenciamiento completo de clones seleccionados.
- Diseño y síntesis de pares de primers usando software específicos.
- PCR con primers contruidos para verificar el nivel de polimorfismo.

#### **4.12 UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN ESTUDIOS POBLACIONALES DE PECES, CON ÉNFASIS EN MICROSATÉLITES.**

Los esfuerzos y preocupaciones encaminados a estudios de conservación de los recursos genéticos de plantas y animales terrestres parecen no estar siendo aplicados con la misma intensidad en relación a los organismos acuáticos. Frente a la enorme diversidad de especies de peces encontrada, poco se conoce sobre la estructura genético poblacional de esos recursos. El declino de la diversidad biológica acuática no debe ser preocupante solamente por el número de individuos de una especie, sino por la pérdida de su variabilidad poblacional<sup>93</sup>.

La utilización de técnicas de biología molecular en estudios sobre poblaciones naturales y cultivadas de peces ha aumentado intensivamente, lo que permitió una explotación de la fuente original de variabilidad, abriendo así, un nuevo horizonte para el conocimiento de los recursos genéticos existentes en la naturaleza. De esta forma, actualmente diversos marcadores moleculares están disponibles para la detección de variabilidad genética, dentro de los cuales, se destacan los microsatélites<sup>94</sup>.

Frente a tales ventajas características, este marcador, se muestra como una poderosa herramienta en estudios de mapeamiento genético y test de paternidad<sup>95</sup>

---

<sup>93</sup> HILSDORF, A. Biología Molecular: Uma realidade para a Aqüicultura. Panorama da Aqüicultura (janeiro/fevereiro). 1997. p. 10-12.

<sup>94</sup> TAUTZ, D. and RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. In: Nucl. Acids Res., Vol. 2, 1984. p. 4126-4138.

<sup>95</sup> SAKAMOTO, T.; DANZMANN, R. G.; GHARBI, K.; HOWARD, P.; OZAKI, A.; KHOO, S. K.; WORAM, R. A.; OKAMOTO, N.; FERGUSON, M. M.; HOLM, L. E.; GUYOMARD, R. and HOYHEIM, B. A Microsatellite Linkage Map of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Characterized by Large Sex-Specific Differences in Recombination Rates. In: Genetics., Vol. 155, No. 11, 2000. p. 1331-1345.

<sup>96</sup>, además de ser intensamente utilizados en estudios poblacionales y de conservación y manejo de recursos naturales.

El mayor inconveniente de los microsatélites es el hecho de que necesitan ser aislados de las especies a ser estudiadas por primera vez, pues son usualmente encontrados en regiones no codificantes, donde la tasa de substitución nucleotídica es mayor que en las porciones codificantes del genoma<sup>97</sup>.

Existen casos en que, dada la conservación de las secuencias flanqueadoras de loci microsatélites, primers construidos para una determinada especie, son eficientes también para amplificaciones vía PCR de especies relacionadas<sup>98</sup>.

Muchos estudios vienen siendo desarrollados, en sentido de aislar y caracterizar loci microsatélites, principalmente para las especies marinas de gran interés comercial, como los salmónidos<sup>99 100 101</sup>.

El método tradicional de aislamiento de loci microsatélites envuelve la utilización de bibliotecas genómicas parciales, donde millares de clones son examinados a través de la hibridación con sondas de secuencias repetitivas<sup>102</sup>. En tanto, esta técnica es muy laboriosa, en término de esfuerzo y tiempo, además del alto costo financiero. Y aun en número de clones positivos, o sea, que contengan candidatos a microsatélite, que pueden ser obtenidos a través de este método varía de 0,04 a 12%<sup>103</sup>, dependiendo del organismo analizado. De esta forma, su utilización podrá ser bastante inconveniente en el caso de organismos con baja frecuencia de microsatélites.

Varias estrategias alternativas de aislamiento de microsatélites vienen siendo desarrolladas, a manera de reducir el tiempo, esfuerzo y capital invertido, además de aumentar significativamente el rendimiento del trabajo.

---

<sup>96</sup> SPRECHER, C. J.; PUERS, C.; LINS, A.M. SC and HUMM, J.W. General Approach to Analysis of Polymorphic Short Tandem Repeat Loci. *In: Biotechniques.*, Vol. 20, 1996. p. 266-276.

<sup>97</sup> ZANE; BARGELLONI and PATARNELLO. *Op cit.*, p. 1 – 16.

<sup>98</sup> MOREIRA, H.L.M. Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microsatélite. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999. p. 20 – 40.

<sup>99</sup> ESTOUP, A.; PRESA, P.; KRIEG, F.; VAIMAN, D. and GUYOMARD, R. (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellite: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *In: Heredity.*, Vol. 71, 1993. p. 488-496.

<sup>100</sup> ZHENG, W.; STACEY, N.E.; COFFIN, J. and STROBECK, C. Isolation and characterization of microsatellite loci in the goldfish *Carassius auratus*. *In: Mol. Ecol.*, Vol. 4, 1995. p. 791-792.

<sup>101</sup> PFEIFFER, A.; OLIVIERI, A.M. and MORGANTE, M. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* k.). *In: Genome.*, Vol. 40, 1997. p. 411-419.

<sup>102</sup> RASSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C. and TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis.*, Vol. 12, No.1, 1991. p.113-118.

<sup>103</sup> ZANE, L.; BARGELLONI, L. PATARNELLO, T. *Op cit.* p. 1 – 16.

#### **4.13 MARCADORES MINISATELITES.**

Un locus hipervariable, también denominado minisatélite, está constituido por un número variable de secuencias idénticas, repetidas lado a lado. Estas secuencias poseen de 15 a 100 pares de bases y se repiten hasta 50 veces en cada locus variable. El nombre de repetitivas forman un nódulo satélite distinto al nódulo principal de ADN genómico en la separación del ADN en gradientes de Cloruro de Cesio, por contener una proporción de pares de bases G-C diferente a la media del resto del genoma. Los nombres “hipervariable loci”, “VNTR loci” y “minisatélites” son sinónimos utilizados en la literatura para referirse a esta clase de marcadores<sup>104</sup>.

Los minisatélites están dispersos por todo el genoma, y representan una proporción detectable del mismo, constituyendo varios loci en diferentes cromosomas. Cada loci posee diferentes números de repeticiones.

#### **4.14 VARIABILIDAD GENÉTICA.**

Se refiere a la variación en el material genético de una población o especie, e incluye los genomas nucleares, mitocondrial y ribosomal, además de los genomas de otros organelos. La variabilidad genética nueva puede estar causada por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo (número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas). Los procesos que eliminan variabilidad genética son la selección natural y la deriva génica. La variabilidad genética es la materia prima de la evolución.

La variabilidad genética, conocida también como recursos genéticos, se refiere a la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de organismos, cuya base está en los cromosomas (ADN) y puede ser manipulada por la tecnología tradicional y moderna (biotecnología, ingeniería genética).

Cada especie viva posee en su estructura celular la información codificada necesaria para transmitir a sus descendientes caracteres especiales, que se conocen como hereditarios, o sea, que se heredan de los progenitores.

Las cadenas de ADN están sujetas a cambios, conocidos como mutaciones, que se producen de diversas formas (por recombinación, por radiaciones). Estas mutaciones pueden ser letales o dar origen a caracteres de adaptación a las condiciones impuestas por el ambiente (clima, resistencia a enfermedades), dando una ventaja a los individuos que poseen determinadas características. En la población de una especie no existen dos individuos que tengan la misma e

---

<sup>104</sup> FERREIRA e GRATTAPAGLIA. Op Cit., p. 32-33.

idéntica información genética en el ADN, lo que se conoce como variabilidad genética. Los únicos casos de identidad genética son los gemelos.

La variabilidad genética en una población puede ser medida por la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), otra medida es la heterocigosidad en equilibrio o esperada ( $H_e$ ). Una comparación entre estos valores nos puede informar sobre la situación de heterocigosidad en la población<sup>105</sup>.

Según la teoría neutralista de la evolución molecular, la variación genética de las poblaciones es un estado transitorio de la fluctuación al azar de los alelos neutros

#### 4.14.1 Los factores de evolución:

- **La mutación:** 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 suelen ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de estas variantes pueden tener éxito y 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 reto ambiental. 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 de una letra por otra en un texto. Este cambio suele 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 un tasa de mutación propia que ha sido modulada por la selección natural para que la especie pueda enfrentarse de un modo más o menos óptimo a los compromisos contrapuestos de estabilidad-cambio que le impone su ambiente.

- **La deriva genética:** En cada generación se produce un sorteo de genes durante la transmisión de gametos de padres a hijos que se conoce como deriva genética. La mayoría de los organismos son diploides, es decir, tienen dos

---

<sup>105</sup> NEI, M. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY. 1987.

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, análoga a obtener una cara al tirar una moneda, por lo que la formación de gametos y su consiguiente unión para formar los huevos de la siguiente generación solo puede describirse como un proceso probabilístico.

Por ejemplo, en una población de una especie diploide de 50 individuos, para un gen con dos alelos, A y a, que estén en la misma frecuencia habrá 50 copias del alelo A y 50 del alelo a. Cuando estos individuos formen la siguiente generación, es tan improbable que la nueva generación tenga los mismos 50 alelos A y 50 a, como tirar una moneda 100 veces y obtener exactamente 50 caras y 50 cruces. Según este razonamiento, 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.

- **La 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 algunos 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. Las migraciones humanas durante la expansión neolítica determinaron significativamente el tipo y la cantidad de variación genética de nuestra especie.

- **La selección natural:** Darwin será siempre admirado por hacer inteligible la vida, por reducir a un sólo concepto la diversidad inmensa y fantástica que vemos en la naturaleza: La selección natural. Como ya se ha comentado, la selección natural es tan sólo uno de los factores de evolución. Sin embargo, la selección natural es el único proceso conocido que permite explicar la complejidad inherente a la vida, las adaptaciones de los organismos, y por eso ocupa una posición central en la biología evolutiva. La selección natural es incluso un principio más fundamental que la misma vida, pues como R. Dawkins ha señalado, "la 'supervivencia de los más aptos' de Darwin es un caso especial de una ley general de la supervivencia de lo estable".

La idea de la selección natural es engañosamente sencilla, pues son muchos los que pensando que la entienden, la han malinterpretado o no la han captado en toda su profundidad. Darwin comentaba de su amigo, T.H. Huxley, entusiasta seguidor y divulgador de la idea evolutiva, que Huxley no tenía una idea exacta de la selección natural. Aún en la actualidad podemos decir que la selección sigue siendo malentendida por un gran número de biólogos.

**Definición de selección natural:** En esencia, la selección natural es reproducción diferencial de unas variantes genéticas respecto de otras. Podemos definirla más rigurosamente 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.

**4.14.2 Equilibrio Hardy-Weinberg.** Se conoce como el equilibrio de Hardy-Weinberg, por los dos autores que lo descubrieron independientemente (un tercer descubrimiento independiente fue el del genetista ruso Sergei Chetverikov)<sup>106</sup>.

Una población mendeliana puede definirse como un grupo de organismos que se reproducen por vía sexual, con un grado relativamente estrecho en relación genética (como una especie, subespecie, raza, variedad, cepa, y que residen en límites geográficos definidos donde se cruzan entre sí. Si a todos los gametos producidos por una población mendeliana se les considera una mezcla hipotética de unidades genéticas a partir de las cuales se originará la siguiente generación, tendremos el concepto de *poza de genes* (gene pool), (figura 5)<sup>107</sup>.

**Figura 5. Poza de genes.**



STANSFIELD, Op Cit., p. 255

Fuente. Esta investigación

<sup>106</sup> GRIFFITHS, ANTHONY J. F.; MILLER, JEFFREY H.; SUZUKI, DAVID T.; LEWONTIN, RICHARD C. y GELBART, WILLIAM M. En: Genética. Séptima Edición. McGRAW-HILL / Interamericana de España, S.A.U. 2002. p. 721-723.

<sup>107</sup> STANSFIELD, WILLIAM D. Teoría y problemas de genética. Serie de compendios Schaum. Segunda edición. McGRAW-HILL / interamericana de Mexico, S.A. 1990. p. 255.

Según el mismo autor el equilibrio Hardy-Weinberg significa que la reproducción sexual no provoca una reducción constante de la variación genética en cada generación; por el contrario, la cantidad de variación permanece constante generación tras generación, en ausencia de otras fuerzas distorsionadoras. El equilibrio es la consecuencia directa de la segregación de los alelos de los heterocigotos durante la meiosis.

Numéricamente, el equilibrio implica que, independientemente de qué genotipos se mezclen en la generación parental, la distribución genotípica tras una ronda de cruzamientos esta completamente especificada por la frecuencia alelica  $p$ <sup>108</sup>.

Según este mismo autor, si se considera de alelos (A y a), encontraremos que el porcentaje de gametos en la poza de genes que porten A o a dependerá de las frecuencias fenotípicas de la generación precursora cuyos gametos forman el depósito. Por ejemplo, si la mayor parte de la población fuera de genotipo recesivo aa, la frecuencia del alelo recesivo en la poza de genes sería relativamente alta y el porcentaje de gametos que portan el alelo dominante (A) sería correspondientemente bajo.

Cuando los apareamientos entre n miembros de una población se producen totalmente al azar, es decir, cuando cada gameto masculino de la poza de genes tiene la misma oportunidad de unirse con un gameto femenino cualquiera, pueden predecirse las frecuencias cigóticas esperadas en la siguiente generación a partir del conocimiento de las frecuencias de genes (alelicas) en la poza de genes de la población precursora.

Dicho de otro modo, dadas las frecuencias relativas de los gametos A y a en la poza de genes, podemos calcular (con base en la unión al azar de los gametos) las frecuencias esperadas de genotipos y fenotipos de la progenie. Cuando  $p$ = porcentaje de alelos A en la poza de genes y  $q$ = porcentaje de alelos a, podemos utilizar el método del tablero para ilustrar todas las posibles combinaciones al azar de estos gametos (cuadro 1)<sup>109</sup>.

---

<sup>108</sup> GRIFFITHS; MILLER; SUZUKI; LEWONTIN y GELBART, Op Cit., p. 721-723.

<sup>109</sup> STANSFIELD, Op Cit., p. 256.

**Cuadro 1. Uniones al azar de gametos; frecuencias esperadas de genotipos y fenotipos de la progenie.**

♂ ♀	<b>P</b> <b>A</b>	<b>Q</b> <b>A</b>
<b>P</b>	$P^2$	$Pq$
<b>A</b>	AA	Aa
<b>Q</b>	$Pq$	$q^2$
<b>a</b>	Aa	aa

STANSFIELD, Op Cit., p. 256

Fuente. Esta investigación

Nótese que  $p+q=1$ , es decir, el porcentaje de los gametos A y a debe dar el 100%, a fin de considerar todos los gametos en la poza de genes. Así, pueden sumarse las frecuencias genotípicas esperadas (cigóticas) en la siguiente generación como sigue:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1,0$$

AA    Aa    aa

En donde,  $p^2$  es la fracción de la siguiente generación que se espera sea dominante homocigoto (AA),  $2pq$  la fracción que se espera sea heterocigoto y  $q^2$  la fracción que se espera sea recesiva (aa). La suma de estas fracciones debe ser igual a la unidad para considerar todos los genotipos en la población de progenitores.

Esta fórmula, ilustra las expectativas genotípicas de la descendencia en términos de frecuencias gaméticas (alelicas) de la poza parental de genes y se denomina Ley de Hardy-Weinberg. Si una población se ajusta a las condiciones en que se basa esta fórmula, no debe haber cambios en las frecuencias gaméticas o cigóticas de una generación a la siguiente. Si una población está inicialmente en desequilibrio, una generación de combinación al azar es suficiente para lograr el equilibrio genético; a partir de entonces, la población se mantendrá en equilibrio (sin cambios en las frecuencias gamética y cigótica) tanto como persistan las condiciones de Hardy-Weinberg<sup>110</sup>.

Según el mismo autor el logro del equilibrio genético como se expresa en la ecuación de Hardy-Weinberg implica varias condiciones previas:

<sup>110</sup> STANSFIELD, Op Cit., p. 257.

- La población es infinitamente grande y se aparea al azar (panmíctica).
- No opera la selección; es decir, cada genotipo bajo consideración puede sobrevivir igual que cualquier otro (sin mortalidad diferencial), y cada genotipo es igualmente eficaz en la producción de descendencia (sin reproducción diferencial).
- La población es un sistema cerrado; es decir, no se permite la inmigración de individuos de otra población, ni la emigración de la población que se estudia.
- No hay mutación de un estado alélico a otro. Puede permitirse la mutación si las tasas de mutación progresiva o regresiva son equivalentes, es decir, A muta a a con la misma frecuencia con que a muta a A.
- La meiosis es normal, por lo que resulta el único factor que opera en la gametogénesis.

**4.14.3 Población Endogámica.** La probabilidad de la progenie de heredar dos copias genéticas que son idénticas por descendencias por mayor de lo que sería esperado por cruzamiento puramente aleatorio. Esa probabilidad, es llamada coeficiente de endogamia (F) de la población, aumentada cuando mayor fuera el grado de parentesco entre los individuos reproductores. La forma más extrema de endogamia es la autofecundación, como ocurre en muchas plantas. La probabilidad de que descendientes de una planta autofecundadora hereden dos copias de uno de los genes de sus padres es 1/2.

El coeficiente medio de endogamia de una población, F, varía de cero, en el caso de cruzamiento puramente al azar, hasta uno, cuando todos los individuos son homocigotos de alelos que son idénticos por origen<sup>111</sup>. El endocruzamiento en una población de tamaño grande no altera las frecuencias alélicas. Al contrario de eso, aumenta la proporción de homocigotos y disminuye la proporción de heterocigotos.

$F_{IT}$ : Endogamia total.

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

$F_{IS}$ : Endogamia entre individuos.

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$$

---

<sup>111</sup> FUTUYMA, Douglas Joel. Biología Evolutiva. 2ª Ed. Riberão Preto, SBG/CNPq, 1992. p. 631.

$F_{ST}$ : Endogamia en poblaciones o índice de fijación.

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

Se encuentra entre 0 a 0,2, para ello hay que hacer pruebas. Si es altamente diferente de cero la población es igual a no haber flujo génico, si es igual a cero, las poblaciones son diferentes, si F igual a uno la población es completamente endogámica.

**4.14.4 Índice F o de fijación de Wright.** Mide la reducción de heterosigosis esperada con apareamiento al azar a cualquier nivel de una jerarquía poblacional en relación a otro nivel más inclusivo de la misma. Este índice proporciona el grado de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg. Un F positivo indica un déficit de heterocigotos causado por: la consanguinidad, apareamientos clasificados y subdivisión de poblaciones (efecto Wahlund)<sup>112</sup>.

**4.14.5 Coeficiente de consanguinidad.** De dos individuos es la probabilidad de que sus descendientes sean autozigotos como lo muestra el ejemplo que analizamos, el coeficiente de consanguinidad de dos hermanos es 1/4. Apenas la mitad de descendencia de un heterocigoto es heterocigoto, de modo que en cada generación la frecuencia de heterocigotos disminuye la 1/2. Si el tipo de cruzamiento favorece otros tipos de uniones consanguíneas H se aproxima de cero (0) y F de uno (1) en una tasa menor. Entre tanto, si algunas uniones ocurren entre individuos no emparentados, F puede tomar un valor de equilibrio debajo de uno<sup>113</sup>.

**4.14.6 Depresión endogámica.** Según el mismo autor,  $H_e > H_o$ , atribuido al aumento de la frecuencia de homocigotos para alelos recesivos.

**4.14.7 Coeficiente de desequilibrio de ligación.** Como  $D = (g_{00} \times g_{11}) - (g_{01} \times g_{10})$ ; esto es, la diferencia del producto de las frecuencias de las gametas en asociación AB, A'B' y el producto de la gametas de repulsión AB', A'B. Los locus están en desequilibrio de ligación completo, si solamente las gametas en repulsión están presentes ( $D = 1/4$ , si  $p_1$  y  $p_2$  fueron ambos iguales a 0,5) o si solamente las gametas en repulsión están presentes ( $D = -1/4$ ).

---

<sup>112</sup> KELLY, L.; POSTIGLIONI, A.; DE ANDRES, D. F.; GAGLIARDI, R.; BIAGETTI, Br.; FRANCO J. Variabilidad genética de los caballos criollos del Uruguay. Archivo de medicina veterinaria., Vol. 34, No. 1, Valdivia. P. 2002.

<sup>113</sup> FUTUYMA, Op cit., p. 631.

Si dos alelos en dos o más locus están asociados en frecuencias mayores o menores que lo previsto por sus frecuencias individuales, ellos están en desequilibrio de ligación, sino, ellos están en equilibrio de ligación<sup>114</sup>.

**4.14.8 Estructura genética.** La estructura genética está determinada por la estructura de la población, por supuesto, pero también por procesos genéticos como la selección, la recombinación y la mutación. Para determinar la estructura genética, es necesario comprender el patrón de variación genética de la especie, lo que significa evaluar los genotipos de diferentes individuos<sup>115</sup>.

La apariencia de la estructura genética no es necesariamente el efecto del flujo génico en el momento mismo del estudio, y el problema puede surgir de atribuir a los tiempos presentes o a una época las diferencias aparentes o su ausencia entre poblaciones.

La estructura genética (subdivisiones de una especie en unidades locales intercrusantes) es resultado del equilibrio dinámico entre fuerzas que favorecen la diferenciación (deriva, mutación y selección, diferentes en cada área) y fuerzas homogenizantes (migración, selección purificadora, selección balanceadora, uniformes en cada área)<sup>116</sup>. Ella determina el padrón y la cantidad de variación que esta disponible para la evolución de una especie, e impone límites para la actuación de la selección natural y otras fuerzas evolutivas.

**4.14.9 Flujo génico y estructura poblacional.** Uno de los problemas en el análisis de la estructura de las poblaciones es determinar la cantidad de flujo génico. El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente.

Cuánto flujo génico se requiere para impedir la evolución independiente en poblaciones locales diferentes depende de qué otras fuerzas se encuentren actuando. El resultado de Wright para el modelo de la isla nos habla del equilibrio alcanzado entre el flujo génico y la deriva genética. Si  $Nm$  es mucho mayor que 1, el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local. Si  $Nm$  es mucho menor que 1, la deriva actúa en forma casi independiente en

---

<sup>114</sup> *Ibíd.*, p. 631.

<sup>115</sup> WIKIPEDIA FOUNDATION. ESTRUCTURA GENÉTICA. *En*: Wikipedia: La enciclopedia Libre. España. (Citada el 3 de octubre de 2007). Disponible en Internet, URL: [http://es.wikipedia.org/wiki/Estructura\\_Genética](http://es.wikipedia.org/wiki/Estructura_Genética).

<sup>116</sup> SOLÉ-CAVA, *Op cit.*, p. 192.

cada población. Trabajos más recientes<sup>117</sup> han demostrado que a una población le lleva un tiempo  $\tau$ , el cual es aproximadamente el mayor de  $2N$  y  $1/m$ , alcanzar este equilibrio. Antes de  $\tau$  la composición genética será determinada principalmente por las condiciones iniciales, y después de  $\tau$  la composición será determinada por  $Nm$ . Haldane<sup>118</sup>, consideró el problema del equilibrio entre el flujo génico y la selección.

Asumió que los inmigrantes llegados a una isla portaban un alelo  $a$  que en la isla es deletéreo. Si el coeficiente de selección en favor del otro alelo,  $A$ , en la isla es  $s$  y la tasa de inmigración es  $m$ , entonces la frecuencia de equilibrio de  $A$  en la isla es  $p = 1 - s/m$  si  $s < m$  y  $0$  si  $s > m$ . El tiempo que lleva alcanzar este equilibrio es aproximadamente  $1/|s - m|$ . Por supuesto, la selección que favorece al mismo alelo en diferentes poblaciones en general impedirá la diferenciación sin importar la cantidad de flujo génico.

El mismo autor dice que estos resultados teóricos nos dicen que el flujo génico podría impedir la diferenciación en algunos loci -aquellos que son neutros o que están bajo una selección débil- pero no en los loci que se encuentran bajo una selección fuerte. Además, el tiempo necesario para alcanzar los estados de equilibrio de cada locus depende tanto del grado de flujo génico, medido por  $m$ , como de la fuerza de la selección, medida por  $s$ . Los loci fuertemente seleccionados alcanzarán sus frecuencias de equilibrio mucho más rápidamente que los loci neutros o débilmente seleccionados.

**4.15.10 Métodos para estimar los niveles de flujo génico.** Se ha distinguido entre dos clases de métodos para estimar los niveles de flujo Génico en poblaciones naturales. Los métodos 'directos' son aquellos que dependen de observaciones o experimentos que miden el grado de dispersión. También es posible seguir el progreso de alelos distintivos dentro de una población que no contiene dichos alelos, mostrando por tanto que el flujo génico ha ocurrido y comprendiendo sus propiedades. Un método ligeramente diferente es la utilización de métodos genéticos para la determinación de la paternidad y computar la distancia entre los progenitores y sus descendientes. En contraste con los métodos directos, los métodos 'indirectos' no dependen de estudios en individuos que se dispersan. En vez de ello, conducen a estimaciones del nivel promedio de flujo génico a partir de un modelo matemático de la interacción del flujo génico y otras fuerzas para predecir cuánto flujo génico debe haber estado ocurriendo para que los patrones observados estén presentes en los datos.

---

<sup>117</sup> TAKAHATA N. Gene identity and genetic differentiation of populations in the finite island model. *In: Genetics.*, Vol.104, No. 1, 1983. p. 497-512.

<sup>118</sup> HALDANE, J. B. S. A note on Fisher's theory of the origin of dominance and a correlation between dominance and linkage. *In: Am. Nat.*, Vol. 64, 1930. p. 87-90.

El método indirecto más comúnmente utilizado se basa en el estadístico  $F_{ST}$  de Wright, el cual es una medida de la correlación entre los genes en una subpoblación en relación a la población entera. Para dos alelos en un locus,  $F_{ST}$  es aproximadamente  $Vp / p(1-p)$ , donde  $Vp$  es la varianza en la frecuencia alélica entre las subpoblaciones y  $p$  es la frecuencia promedio. Wright<sup>119</sup>, mostró que en un modelo de isla en equilibrio,

$$F_{ST} \approx \frac{1}{1 + 4Nm}$$

De este resultado puede obtenerse una estimación indirecta de  $Nm$  calculando  $F_{ST}$  a partir de los datos de las frecuencias alélicas y luego hallando  $Nm$  a partir de

$$Nm \approx \frac{1}{4} \left( \frac{1}{F_{ST}} - 1 \right) \quad (1.1)$$

Wright<sup>120</sup> y otros han utilizado este método en forma extensiva para estimar los valores de  $Nm$  en diferentes especies. No hay un método indirecto para estimar  $m$  en forma separada, pero este valor puede obtenerse a partir de  $Nm$  y de estimaciones de  $N$  obtenidas utilizando datos de censos. Tanto las estimaciones directas como las indirectas de los niveles de flujo génico revelan distintas cosas acerca de una especie, y ambos métodos poseen sus puntos fuertes y sus puntos débiles. Las estimaciones directas indican los detalles de la dispersión, incluyendo el período en la historia de vida de la especie en el cual ocurre la dispersión y posiblemente también las condiciones ecológicas favorables para la misma.

---

<sup>119</sup> WRIGHT, S. The genetical structure of populations. Ann Eugen., Vol. 15, 1951. p. 323-354.

<sup>120</sup> WRIGHT S. Evolution and the Genetics of Populations. The Theory of Gene Frequencies. The University of Chicago Press, Chicago., Vol. 2, 1969.

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1 LOCALIZACIÓN.

Las pruebas de laboratorio, se realizaron en el laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética, ubicado en la planta baja del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos, en la Vía Washington Luís, Km 235 del municipio de São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil. Presenta un clima lluvioso en verano y seco en invierno, con una temperatura media anual de 19,6 °C y una precipitación anual de 1512mm. La humedad relativa en verano es 76% y en invierno 54%; las coordenadas geográficas son: 47°30´ y 48°30´ Longitud Oeste y 21°30´ y 22°30´ Latitud Sur; presenta una altitud máxima de 1000 m, altitud media de 856 m y mínima de 520m (figura 6).

### 5.2 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

La represa Tres Marías se encuentra localizada entre los paralelos 45° 15' 50" Latitud Sur y 18°15'12" Longitud Norte. La altitud Máxima en la región 975 m divisa del Municipio de Lassance y la mínima 504 m Foz del Ribeirão a la Barra del Río de Janeiro. La región presenta una temperatura Media Anual de 24.3°C, siendo las temperaturas mínima y máxima medias anuales, 14°C y 30.1°C, respectivamente. El clima es tropical caliente y semihumedo. La precipitación media anual es de 1,791 mm, siendo los meses lluviosos los de noviembre hasta marzo, y los más secos de junio a agosto.

La construcción de la barrera de Três Marias se ejecutó entre 1957 y 1960. Esta barrera presenta 2.700 m de extensión y altura máxima de 75 m, cuando se llena, posee un volumen de 21 billones de m<sup>3</sup> de agua<sup>121</sup> (figura 7).

### 5.3 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se evaluaron muestras de ADN tomadas del banco de ADN del laboratorio de Citogenética de la Universidad Federal de San Carlos, extraídas a partir de individuos de la especie *Brycon orthotaenia* provenientes de Jusante río Abaeté, Cascalheira até Abaeté y Jusante de Barragen donde se encuentra la represa de Três Marias , Estado de São Paulo - Brasil.

---

<sup>121</sup> BRITSKI; SATO and ROSA, Op Cit., p. 115.

**Figura 6. Ubicación del laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética. (A: UFscar, B: Departamento de Genética y Evolución y C: laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética).**



**A**



**B**

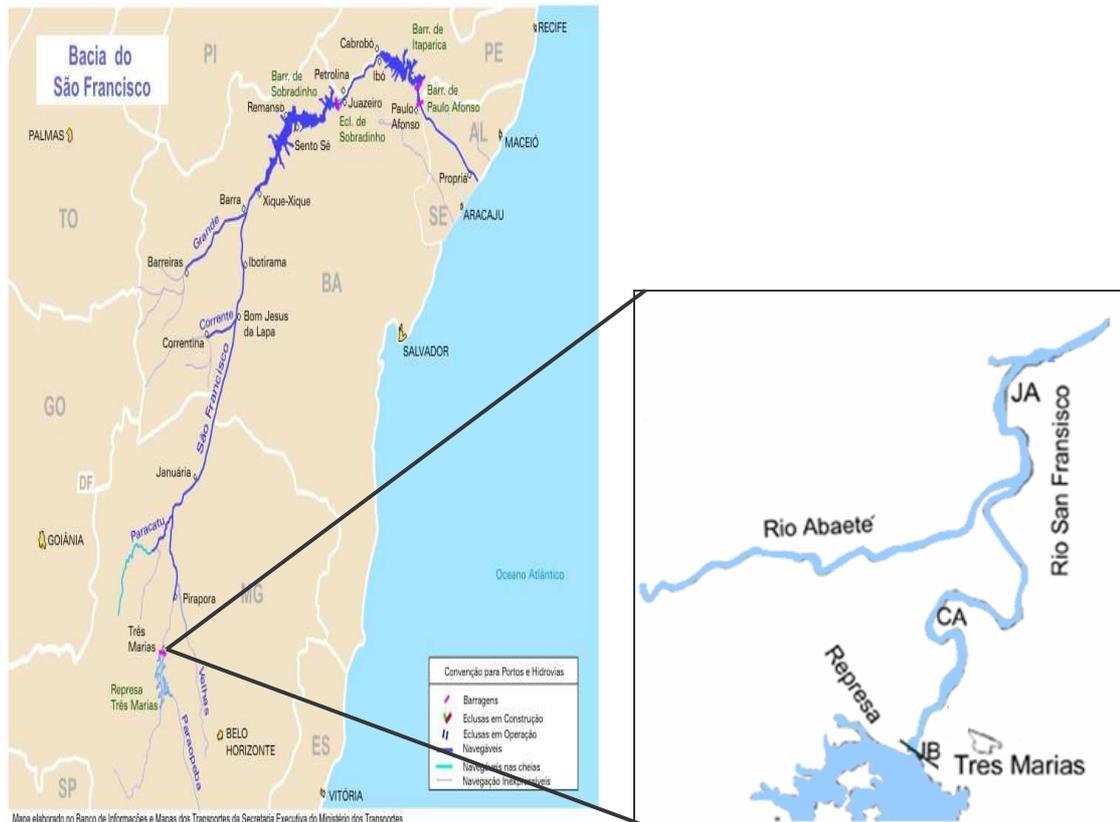


**C**

Fuente. Esta investigación

Se evaluaron 44 muestras de ADN extraídas a partir de hígado y aletas de individuos de *B. orthotaenia* de las cuales 15 fueron de Jusante río Abaeté, 17 de Cascalheira até Abaeté y 12 de Jusante de Barragen.

**Figura 7. Cuenca del río São Francisco; Represa de Três Marias.**



Mapa elaborado no Banco de Informações e Mapas dos Transportes da Secretaria Executiva do Ministério dos Transportes

Mapa elaborado no Banco de Informações e Mapas dos Transportes da Secretaria Executiva do Ministério dos Transportes

#### 5.4 TÉCNICAS DE LABORATORIO

Se evaluaron siete locus (Bh5, Bh6, Bh8, Bh14, Bh15, Bh16 y Bh17) para *Brycon hilarii*<sup>122</sup> aislados en laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil.

<sup>122</sup> SANCHES, Alexandra e GALETTI Jr., Pedro Manuel. Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação. In press

**5.4.1 Extracción de ADN.** Para cada tipo de tejido, sangre o aletas, fue utilizada una metodología, cada una de las cuales se describe en este capítulo.

• **Extracción de ADN genómico a partir de muestras sanguíneas.** Para la extracción de ADN de sangre, fue utilizada la metodología de Lahiri y Nurnberger<sup>123</sup>, con algunas modificaciones:

1. Se colocó 25 µl de sangre en el tubo de 1,5 ml que contenía 150 µl de EDTA (0,5 M).
2. Se mezcló fuertemente por 30 a 40 segundos.
3. Se centrifugó por 7 minutos a 5000 rpm para separación de las células y del plasma.
4. Se retiró el sobrenadante con cuidado para no retirar el pellet, y se adicionó 500 µl de TTKM1. Se mezcló fuertemente.
5. Se centrifugó por 7 minutos a 5000 rpm y se descartó el sobrenadante.
6. Se lavó el precipitado en 500 µl de TTKM1 y se centrifugó por 2 minutos.
7. Se descartó el sobrenadante y se lavó en 500 µl de TKM 1. Se centrifugó por 2 minutos.
8. Se descartó el sobrenadante, se adicionó 200 µl de TKM2, 20 µl de SDS 10% y se resuspendió hasta disolver por completo, mezclando fuertemente por tres minutos.
9. Se incubó a 65° C por 15 minutos.
10. Se adicionó 50 µl de NaCl 5M y se mezcló fuertemente por 3 minutos.
11. Se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se pasó para un tubo nuevo.
12. Se adicionó 600 µl de etanol (100%). Se invirtió el tubo (mover) para precipitar el ADN. Se centrifugó por 10 minutos a 13.000 rpm.
13. Se descartó el sobrenadante, se adicionó 500 µl de etanol (70%) y se centrifugó por dos minutos.
14. Se descartó el sobrenadante con cuidado y se invirtió el tubo sobre un papel absorbente hasta secar totalmente. Se resuspendió en 50 µl de TE.

• Soluciones:

- TTKM1: Tris-HCl 10mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 10mM; EDTA 2mM; Triton X -100 0,25%.
- TKM1: Tris-HCl 10mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 10mM; EDTA 2mM.
- TKM2: Tris-HCl 10mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 10mM; EDTA 2mM; NaCl 100mM.
- TE: Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8

---

<sup>123</sup> LAHIRI, D. K. and NURNBERGER, J. I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. In: Nucleic Acids Research., No. 19, 1991. p. 5444.

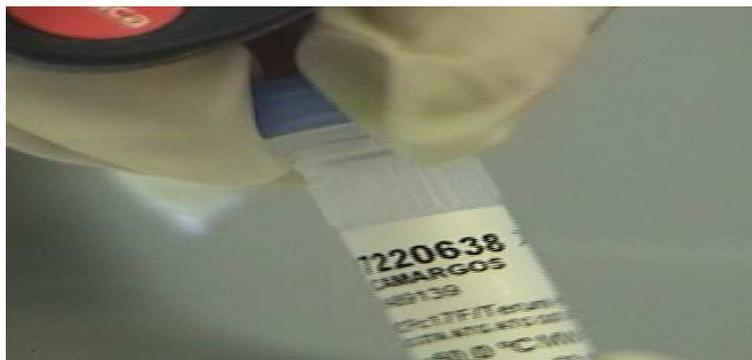
• **Extracción de ADN genómico a partir de muestras de tejidos sólidos.** Para la extracción del ADN de las muestras de aletas fue utilizada la metodología de Aljanabi y Martinez<sup>124</sup>, con algunas modificaciones:

1. Para cerca de 50-100mg de tejido se agregó 400 µl de tampón salino (NaCl 0,4M; Tris-HCl 100mM pH 8 y EDTA 2mM pH 8).
2. Se adicionó 80 µl de SDS 20% y 16µl de Proteinaza K (20mg/ml) y se mezcló bien.
3. Se incubó las muestras a 55-65°C durante el tiempo (1-4 h) necesario para que queden bien digeridas, y bien homogeneizada la mezcla.
4. Se adicionó 300 µl de NaCl 6M y se mezcló bien.
5. Se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm
6. Se recuperó el sobrenadante, transfiriéndolo para un nuevo tubo.
7. Se adicionó igual volumen de isopropanol y se mezcló bien.
8. Se incubó las muestras a -20°C por 1 hora.
9. Se centrifugó por 20 minutos a 10000 rpm
10. Se lavó el pellet con 300 µl de etanol 70%
11. Se centrifugó por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar.
12. Se resuspendió en 100-300 µl de TE y se adicionó 10-20 µl Rnasa (20mg/ml).

La cuantificación y verificación de la calidad del ADN de las muestras fueron analizadas, en gel de electroforesis en gel de agarosa 0,8% sumergido en tampón Tris-Borato-EDTA (1x).

**5.4.2 Secuencias de primers utilizados.** Los primers fueron elaborados por J. Camargos (17090758) (cuadro 2, figura 8).

**Figura 8. Primers utilizados en el presente estudio.**



Fuente. Esta investigación

<sup>124</sup> ALJANABI, Salah M. and MARTINEZ, Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research. Brasilia: Brasil., Vol. 25, Cap. 22, 1997. p. 4692-4693

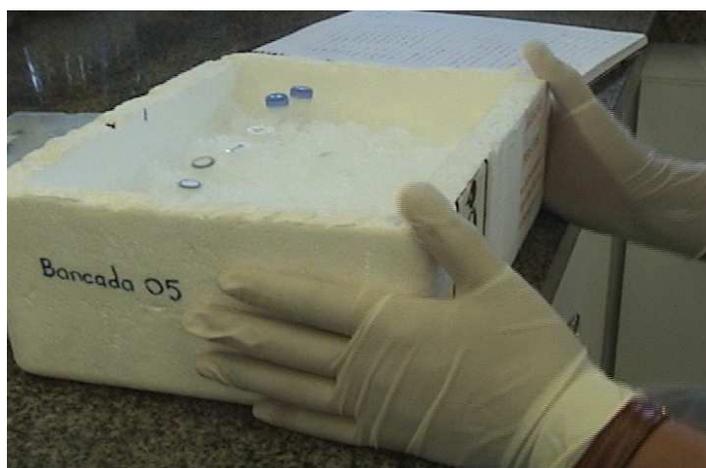
**Cuadro 2. Primers utilizados. Secuencias, Repeticiones.**

LOCUS	SECUENCIA DE LOS PRIMERS (5'-3')	ELEMENTO REPETITIVO
<b>Bh5</b>	F: CTTCCACTCATACCGGCACT R: ACATCTGGCATTAGGCATAG	(GT) <sub>13</sub>
<b>Bh6</b>	F: GCGTTGCGTGTGTATGTTAA R: AGAGGTGTCCACAAAGTTTT	(GT) <sub>14</sub>
<b>Bh8</b>	F: CCATGGCTCAACACAGATAT R: TGTACGAATCCTGAAATGCT	(GAT) <sub>5</sub>
<b>Bh14</b>	F: GTATCACCACCAACGGTAAT R: ATCAATGGTGAAGAAGGAG	(TTA) <sub>8</sub>
<b>Bh15</b>	F: GAGAGCATTGTCAGGATTTA R: ACTAATGACTGCTACTGCGG	(ATTT) <sub>5</sub>
<b>Bh16</b>	F: CCTCCAATGAAAACAGTGCG R: ACGACTTAGCCACCCACCCT	(TAA) <sub>8</sub>
<b>Bh17</b>	F: GTCAGCACTCAGCACATAGC R: AGAGAGCCTGAAAGTGAGTC	(GTTT) <sub>4</sub> (GGTTT) <sub>3</sub>

Fuente. Esta investigación

**5.4.3 Reacción de PCR para marcadores microsatélites.** Se diluyeron 50 µl de ADN, con el fin de obtener una alícuota de 50 ng/µl para uso diario; el restante fue guardado en el banco de ADN como stock (figura 9).

**Figura 9. Preparación de la reacción de PCR.**



Fuente. Esta investigación

La amplificación de los loci microsatélites fue realizada a partir de las muestras de ADN de cada animal, mediante la reacción de PCR, para lo cual fue preparado un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  que contenía: 2.5  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción 10X (Tris – HCL 200 mM pH 8,4 y KCL 500 mM Invitrogen Life Technologies); 0,75  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM; 3,2  $\mu\text{l}$  de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 2,25 mM; 1,0  $\mu\text{l}$  de cada primer (Forward e Reverse) 10 pmoles/ $\mu\text{l}$ ; 0,2  $\mu\text{l}$  de Tag ADN polimerasa; 1  $\mu\text{l}$  de ADN 50 – 100 ng y 15,1  $\mu\text{l}$  de agua extra pura.

El ADN fue sometido a reacción de amplificación por PCR en un termociclador GENEAMP PCR System 2400 – Perkin y/o MJ Research, INC modelo PTC 100 (figura 10), bajo el programa MICPP1 con un ciclo de:

- Cinco minutos iniciales de 94 °C.
- 35 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94 °C (1 minuto).
- Temperatura de aneling de 56 °C (1 minuto).
- 35 ciclos con temperatura de hibridación de 72 °C (1 minuto).
- Temperatura de extensión de 72 °C (20 minutos).
- Extensión final de 4 °C hasta infinito.

**Figura 10. Programación del termociclador.**



Fuente. Esta investigación

**5.4.4 Análisis de electroforesis.** Los fragmentos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa de 1,0% (1,0 g de agarosa, en 100 ml de TBE), conteniendo bromuro de etidio (0,04  $\mu$ l/ml), después corrido a 100 voltios por una hora aproximadamente. Para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados, se aplicó un marcador de peso molecular de 10 pb (in Vitro Life Technologies) (figura 11). El gel fue observado en un transiluminador de luz ultravioleta para la amplificación de los fragmentos y las imágenes obtenidas en los geles fueron registradas utilizando un sistema de foto documentación EDAS 290 Kodak (figura 12).

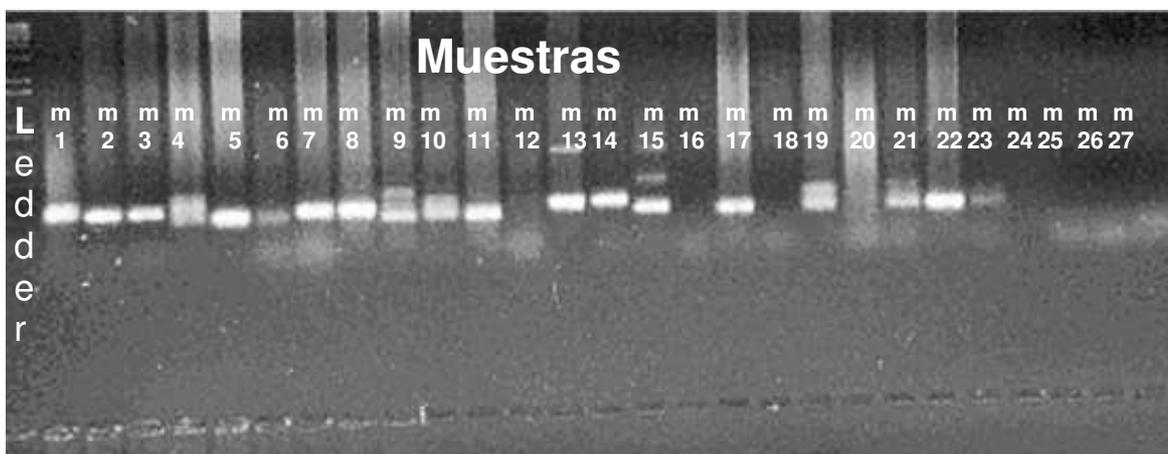
En esta etapa se verificó si hubo amplificación de los fragmentos esperados. Para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados, se comparó las bandas producidas por las muestras, además de esta manera también se pudo establecer la presencia o ausencia de polimorfismo del loci en la población por medio de la observación de diferencias en los tamaños para cada individuo.

**Figura 11. Deposito de las muestras en gel de agarosa.**



Fuente. Esta investigación

**Figura 12. Fragmentos amplificados mediante la PCR para el locus Bh16 de las muestras de la represa de Três Marias, Estado de São Paulo - Brasil.**



Fuente. Esta investigación

**5.4.5 Gel de poliacrilamida.** Teniendo en cuenta que la electroforesis en gel de agarosa, no ofreció la resolución necesaria para estimar los tamaños de los fragmentos amplificados, debido, a que los alelos de microsatélites generalmente difieren en pocos pares de bases; fue necesario la utilización la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida el cual es un gel mas poroso que ofrece una mayor separación de las bandas de acuerdo a su peso molecular, aun cuando los alelos difieran en pocos pares de bases.

Se realizó mediante el protocolo de COMINCINI et al<sup>125</sup> (figura13).

**PREPARACIÓN DE LAS PLACAS.** Para la preparación de estos elementos se realizó el siguiente procedimiento:

Limpieza de las placas

- Se dejó las placas en solución de NaOH 1N por 30 minutos.
- Se lavó con jabón común haciendo movimientos circulares a lo largo de la placa, usando esponja suave.
- Se enjuagó con abundante agua corriente, refregando con la esponja. Luego se enjuagó bien en agua destilada. Y se seco.
- Se limpió con etanol al 100%, utilizando papel toalla.

<sup>125</sup> COMINCINI, S.; LEONEI, P.; REDAELLI, L.; DE GIULI, L.; ZLLANG, Y.; FERRETI, L. Characterization of bovine microsatellites by silver staining. *In: Journal of Animal Breeding and genetics.*, No. 112, 1995. p. 415 – 420.

Preparación de la placa mayor usando Bind-Silane

- Se separó la placa mayor
- Se preparó la solución de Bind-Silane de la siguiente manera: 3 $\mu$ l de Bind-Silane, 1,0 ml de etanol al 100%, 5 $\mu$ l de ácido acético glacial
- Se aplicó la solución de Bind-Silane con una pipeta sobre la placa y se distribuyó con papel higiénico sobre toda la superficie en un solo sentido.
- Se secó por 30 minutos
- Se retiró el exceso de etanol, pasando el papel en sentido perpendicular al de la etapa anterior.

NOTA: se separó los guantes con Bind-Silane para ser usados solo para la preparación de la placa mayor.

Preparación de la placa menor con Repel-Silane

- Se aplicó 1ml de Repel-Silane puro y se distribuyó con papel toalla a lo largo de la superficie de la placa. Se secó por 10 minutos.
- Se retiró el exceso con papel toalla humedecido en etanol puro.

NOTA: pase Repel-Silane en el peine.

**Figura 13: Cámara vertical para gel de poliacrilamida.**

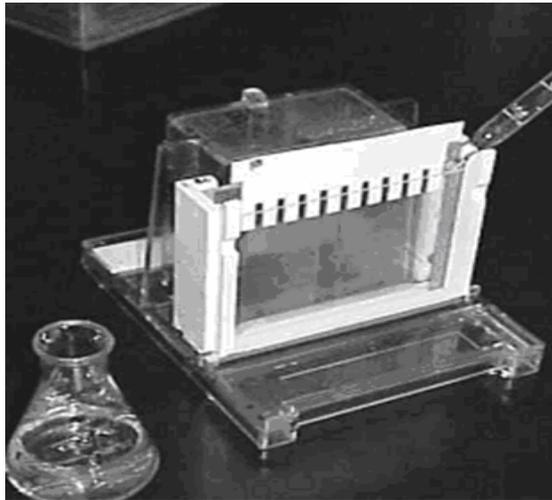


Fuente. Esta investigación

- **MONTAJE DE LAS PLACAS.** En el montaje de las placas se realizó de la siguiente forma:
  - Se colocó los dos “spacers”, previamente limpios, en los laterales de la placa mayor.
  - Se colocó la otra placa con la parte delgada hacia arriba y hacia adentro sobre la placa mayor y se colocó los ganchos en los laterales.
  - Se colocó cinta adhesiva en el fondo y los laterales, reforzando en las esquinas y se colocó los ganchos bien firme.
- **PREPARACIÓN DEL GEL.** El proceso para la preparación del gel fue el siguiente:
  - Se preparó 70 ml de gel al 7%, de la siguiente manera: 4,73 g de Acrilamida, 0,16 g de Bisacrilamida, 33 ml de TBE 20X modificado, 84  $\mu$ l de TEMED, 700  $\mu$ l de persulfato de amonio 10%, y se completó con agua milli-Q hasta un volumen de 70 ml.
  - Se preparó en un beaker pequeño previamente limpio en agua destilada.
  - Se colocó el gel con una jeringa, con la placa inclinada.
  - Se colocó el peine invertido hasta la mitad de la hendidura formada por las dos placas. Se esperó 30 minutos para la polimerización.
  - fueron retirados los ganchos y la cinta adhesiva. Y luego se retiró el peine y se limpió el exceso de gel con el peine.
- **MONTAJE DE LA PLACA EN LA CUBA.** De la siguiente manera:
  - Se colocó tampón TBE 1.2X (modificado) en el recipiente de abajo.
  - Se precalentó la placa, durante una hora a 55 voltios programa P1.
  - Se desconectó y se limpió nuevamente el exceso de gel.
  - Se colocó el peine con los dientes volteados hacia el gel, de modo que apenas penetre en el gel.
  - Se aplicó 3  $\mu$ l de producto PCR, con 1  $\mu$ l de tampón de aplicación, más 4,0  $\mu$ l de LADDER (50 pb) (figura 14).
  - Se programó el equipo para correr una hora y 30 minutos a 55 voltios hasta que los dos colorantes salgan del gel.
- **COLORACION DEL GEL.** Se tuvo en cuenta los siguientes pasos:
  - Se lavó bien las bandejas con agua corriente y se enjuagó con agua destilada.

- Se dejó una bandeja con 1.5 litros de agua destilada.

**Figura 14: Polimerización del gel.**



Fuente. Esta investigación

**Pre-tratamiento fijador:**

- Se preparó la solución fijadora de etanol y ácido acético al 10% en la otra bandeja de la siguiente manera: 150 ml de alcohol, 150 ml de ácido acético y se completo con agua destilada hasta un volumen final de 1.5 litros
- Se retiró el TBE de la parte superior de la placa con la ayuda de una jeringa y se retiró la placa de la cuba.
- Se esperó hasta que el gel se enfrió un poco para separar las placas con la ayuda de una espátula. Se pretrató la placa por 20 minutos en el fijador.

**Lavado:** se lavó bien en 1.5 litros de agua destilada, moviendo constantemente.

**Oxidación:** se dejó durante 3 minutos en una solución de ácido nítrico al 1% preparado de la siguiente manera: 23 ml de ácido nítrico al 65% y se completo con agua destilada hasta un volumen final de 1.5 litros.

**Lavado:** se lavó con agua destilada 3 veces por 30 segundos.

**Impregnación:** se dejó durante 30 minutos en 1.5 litros de solución que contiene; 1.5 g de nitrato de plata y 2 ml de formaldehído al 37%.

**Lavado:** se dejó por 30 segundos en agua destilada.

**Revelación:** se dejó de 3 a 5 minutos en 1.5 litros de solución que contiene:

11.13 g de carbonato de sodio anhídrido, 2 ml de formaldehído al 37% y 200 mg/l de trisulfato de sodio pentahídrico

**Stop:** se dejó durante 5 minutos en 1.5 litros de la solución de pre-tratamiento.

**5.4.6 Análisis en el secuenciador automático.** Después de la electroforesis, los productos de PCR amplificados fueron preparados para ser analizados en secuenciador automático. La preparación constituyó en la dilución de 2  $\mu$ l del producto de PCR en 12  $\mu$ l de agua extrapura y de la aplicación de esta solución en el contenido de formaldehído desionizado, colorante y patrón de tamaño Rox (Applied biosystem). Las amplificaciones cuyos fragmentos aparecieron claros y poco nítidos en el gel de agarosa fueron diluidos en una menor cantidad de agua (en una proporción de 29:5:6). El genotipaje del alelo fue hecho en un Secuenciador automático de ADN ABI Prism 377, PE Biosystems (Software gene Scan versión 2.1), se utilizó primers marcados con NED juntamente con patrón ROX® Gene Scan - 350, a través del software Genotyper versión 2.1 (anexo A)

**5.4.7 Obtención de datos de los geles de Poliacrilamida.** Después de la revelación se realizó el análisis de los geles, el cual consiste en la determinación del número de alelos, tamaño de alelos y el número de individuos pertenecientes a cada alelo, esto mediante visualización directa en los geles; lo cual se puede verificar en las fotografías (anexo B), procedimiento que se llevó a cabo para cada locus analizado, y luego se procedió a realizar las matrices para los diferentes programas (anexo C).

**5.4.8 Análisis estadístico unilocus.** Los análisis estadísticos unilocus fueron realizados a través de la determinación de las frecuencias alélicas de las poblaciones, del equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de cada una de ellas, del déficit y/o exceso de heterocigotos dentro de cada población, se utilizó el software GENEPOP<sup>126</sup>, y del coeficiente de endocruzamiento ( $F_{IS}$ ) y del índice de fijación ( $F_{ST}$ ) calculados para cada locus separadamente y para el total de locus, se utilizó el software FSTAT<sup>127</sup>. Los valores de identidad y distancia genética<sup>128</sup>, fueron obtenidos a través del análisis de los datos en el software POPGENE versión 1.31<sup>129</sup>, también se realizó una verificación de datos la cuál se hizo a través del software TFPGA versión 1.3.

---

<sup>126</sup> RAYMOND, M. Y ROUSET, F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact test and ecemenicism. *In:* Journal Heredity, 86. 1995. p. 249.

<sup>127</sup> GOUDET J. FSTAT Version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *In:* Journal Heredity., Vol. 86, 1995. p. 486 – 486.

<sup>128</sup> NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *In:* Genetics., Vol. 89, 1978. p. 583-590.

<sup>129</sup> YEHL, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. University of Alberta, 1999

Los valores de identidad y distancia genética de Nei<sup>130</sup> <sup>131</sup> fueron calculadas mediante el programa TFPGA.

Además, con los datos de distancia original de Nei fue diseñado el diagrama de distancia o UPGMA.

## 5.5. HIPÓTESIS.

**Ho:** No existe variabilidad genética detectable con marcadores microsatélites, entre y dentro de las poblaciones estudiadas.

**H1:** Existe variabilidad genética detectable con marcadores microsatélites, entre y dentro de las poblaciones estudiadas.

## 5.6. VARIABLES EVALUADAS

**5.6.1 Variabilidad genética:** variación en el material genético de una población o especie; los diferentes parámetros se calcularon mediante los programas computacionales POPGENE (Population Genetic Analysis).

**5.6.2 Frecuencias alélicas:** se define como el número de copias del alelo en la población, dividido por la suma de todos los alelos en esa población. Se realizó mediante el conteo directo de los diferentes alelos observados en cada locus, aquí se excluyeron valores perdidos de tales estimativas.

**5.6.3 Número medio de alelos:** estimado por la media aritmética de los locus estudiados.

**5.6.4 Heterocigosidad observada:** el porcentaje de individuos que son heterocigotos para un dato del locus génico. Se calculó según Brown & Weir<sup>132</sup> (1983):

Para calcular la heterocigosidad observada media, se sumó los valores de cada locus dividiendo por el número total de locus estudiados

$$H_o = 1 - \sum p_{ii}$$

---

<sup>130</sup> NEI, M. Genetic distances between populations. Am. Nat. V. 106, 1972. p. 288.

<sup>131</sup> NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. V. 89, 1978. p. 583-590.

<sup>132</sup> BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. Measuring genetics variability in plant populations. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding: part A. Amsterdam: Elsevier Science, 1983. p. 219-239.

Donde  $p_{ii}$  = frecuencia observada de genotipos homocigotos de alelo  $i$

**5.6.5 Heterocigosidad esperada:** proporción de individuos que serían heterocigotos, si la población estuviese en equilibrio Hardy Weinberg; se calculo según Nei<sup>133</sup> (1978):

La heterocigosidad esperada media, fue obtenida por la media aritmética de todos los locus estudiados.

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

Donde  $p_i$  = frecuencia estimada del  $i$ ésimo alelo

**5.6.6 Distancia genética entre dos poblaciones:** medida de la semejanza genética entre dos poblaciones, fue estimada según Nei<sup>134</sup> (1978).

$$D = \ln I$$

Donde  $I$  = índice de identidad genética  
Este valor varía de 0 (más similares) a 1 (menos similares)

**5.6.7 Índice de identidad genética (I):** fue calculado según Nei<sup>135</sup>, el cual utiliza las frecuencias alélicas de locus en las diferentes poblaciones.

$$I = J_{xy} / (J_x - J_y)^{1/2}$$

Donde:  $J_{xy}$  = media aritmética de  $j_{xy}$  sobre todos los locus polimórficos y monomórficos.

$J_x$  = media aritmética de  $j_x$  sobre todos los locus polimórficos y monomórficos.

$J_y$  = media aritmética de  $j_y$  sobre todos los locus polimórficos y monomórficos.

Así:  $j_x = \sum x_i^2$  = probabilidad de que dos genes escogidos al azar en la población X sean idénticos.

$j_y = \sum y_i^2$  = probabilidad de que dos genes escogidos al azar en la población Y sean idénticos.

---

<sup>133</sup> NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. In: Genetics., Vol. 89, 1978. p. 583

<sup>134</sup> Ibíd., p. 584.

<sup>135</sup> Ibíd., p. 586

$j_{xy} = \sum x_i y_i$  = probabilidad de que un gen de la población X y un gen de la población Y se idénticos.

### 5.6.8 La estadística F: fue estimada utilizando:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{Is}) (1 - F_{st})$$

Donde:

$F_{IT}$  = índice de fijación para a población.

$F_{Is}$  = índice de fijación que ocurre dentro da población.

$F_{sT}$  = índice de fijación para alelos por locus

Mide el grado de subdivisión a través de sus efectos de aumento de endogamia o reducción de heterocigotos con respecto a la misma probación global pero sin subdivisión. Su rango varía de 0 a 1; cuando es 0 no existe divergencia genética, cuando es 1 hay fijación para alelos alternos en diferentes subpoblaciones. Se analiza mediante el siguiente cuadro.

### Cuadro 3. Valores para la interpretación de $F_{sT}$ .

De 0 a 0,05	Pequeña
De 0,05 a 0,15	Moderada
De 0,15 a 0,25	Grande
> 0,25	muy grande

Fuente: Wright; Hartl y Clark

**Índice de fijación de Wright<sup>136</sup> (1978):** mide la deficiencia y exceso de heterocigotos; fue estimado con base en la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ):

---

<sup>136</sup> WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. VI. Variability within and among natural populations. Univ. of Chicago Press, Chicago. 1978

$$F_{is} = 1 - H_o / H_e$$

Su rango varía de -1 a 1.

**5.6.9 Flujo génico:** indica el número de emigrantes por generación, fue estimado según Nei<sup>137</sup> (1987):

$$N_m = 0.25 (1 - F_{st} / F_{st})$$

---

<sup>137</sup> NEI, Op Cit., p. 587.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES

De los siete locus microsatélites utilizados en el presente estudio sólo se analizaron cinco, debido a que los locus Bh8 ((GAT)<sub>5</sub>) y Bh15 ((ATTT)<sub>5</sub>) resultaron monomórficos, por lo cual se excluyeron del análisis.

El análisis de los resultados en los cinco locus y en 44 individuos pertenecientes a tres lugares de colecta del río São Francisco, arrojaron información suficiente para analizar la variabilidad genética. En la caracterización genética de esas poblaciones fueron considerados 34% de individuos para Jusante de Abaéte (JA), 39% de individuos para Cascadheira de Abaéte (CA) y 27% de individuos para Jusante de Barragen (JB).

Todos los loci analizados produjeron un total de 39 alelos diferentes para los cinco pares de primers estudiados, variando en un rango de 3 a 14 alelos por locus como se puede observar en la Tabla 1.

**Tabla 1. Número de alelos por locus y por población para los cinco locus microsatélites analizados.**

Lócus	JÁ	CA	JB	Total de alelos por lócus
Bh5	8	11	7	11
Bh6	11	12	11	14
Bh14	3	2	2	3
Bh16	5	6	5	6
Bh17	5	5	3	5
Total alelos por población	32	36	28	39

Fuente. Esta investigación

### 6.2 FRECUENCIAS ALELICAS.

En la Tabla 2 se puede observar que algunos alelos presentaron mayor frecuencia que otros, variando entre 0.029 a 0.833. Los alelos con mayor frecuencia, se representan con letra A y los alelos únicos con la letra a.

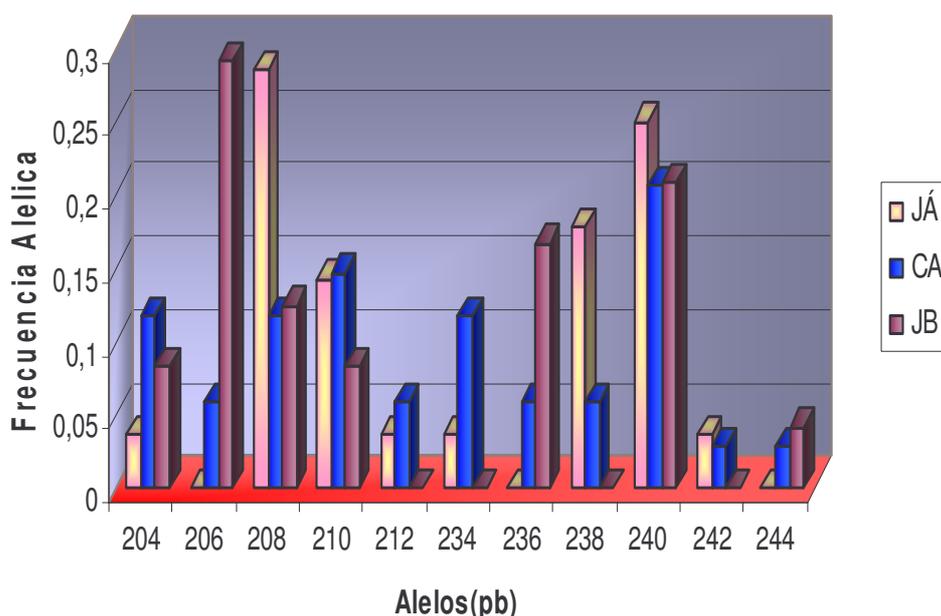
**Tabla 2. Frecuencias alélicas de cinco microsatélites aplicados a una muestra de 44 ejemplares de *Brycon orthotaenia* en tres lugares de colecta del río São Francisco (JA, CA y JB).**

LOCUS	Alelo (pb)	Frecuencia alélica		
		JÁ	CA	JB
<i>Bh5</i> (GT) <sub>13</sub>	204	0,036	0,118	0,083
	206	0	0,059	<b>0,292<sup>A</sup></b>
	208	<b>0,286<sup>A</sup></b>	0,118	0,125
	210	0,143	0,147	0,083
	212	0,036	0,059	0
	234	0,036	0,118	0
	236	0	0,059	0,167
	238	0,179	0,059	0
	240	0,25	<b>0,206<sup>A</sup></b>	0,208
	242	0,036	0,029	0
<i>Bh6</i> (GT) <sub>14</sub>	244	0	0,029	0,042
	180	0,25	0,143	0,042
	182	0,042	0,036	0
	186	0,083	0,036	0,042
	188	0	<b>0,071<sup>a</sup></b>	0
	190	0,083	<b>0,214<sup>A</sup></b>	0,125
	192	0,042	0,071	0,083
	196	<b>0,25<sup>A</sup></b>	0,179	<b>0,292<sup>A</sup></b>
	198	0,042	0	0,125
	200	0,083	0,036	0,042
<i>Bh14</i> (TTA) <sub>8</sub>	202	0,042	0,036	0,083
	204	0	0,107	0,083
	212	0	<b>0,036<sup>a</sup></b>	0
	218	0,042	0	0,042
	220	0,042	0,036	0,042
	167	<b>0,2<sup>a</sup></b>	0	0
<i>Bh16</i> (TAA) <sub>8</sub>	173	<b>0,5<sup>A</sup></b>	<b>0,647<sup>A</sup></b>	<b>0,682<sup>A</sup></b>
	182	0,3	0,353	0,318
	133	0,3	<b>0,412<sup>A</sup></b>	<b>0,5<sup>A</sup></b>
<i>Bh17</i> (GTTT) <sub>5</sub> (GGTT) <sub>4</sub>	139	0	0,029	0,042
	142	<b>0,467<sup>A</sup></b>	0,294	0,208
	145	0,067	0,147	0,167
	148	0,1	0,029	0,083
	151	0,067	0,088	0
<i>Bh17</i> (GTTT) <sub>5</sub> (GGTT) <sub>4</sub>	195	0,133	0,118	<b>0,833<sup>A</sup></b>
	200	0,2	<b>0,412<sup>A</sup></b>	0,083
	204	<b>0,467<sup>A</sup></b>	0,382	0
	205	0,133	0,059	0,083
	300	0,067	0,029	0

Los alelos con mayor frecuencia, se representan con letra A y los alelos únicos con la letra a

En el locus Bh5 el alelo más frecuente en la población de JA fue el alelo 208 pb, en la población de CA fue el de 240 pb y en la población de JB fue el de 206 pb, los alelos con mayor frecuencia y que se encuentra en todas las poblaciones analizadas, fueron el de 208 pb y 240 pb como se puede observar en la Tabla 2 y la Figura 15.

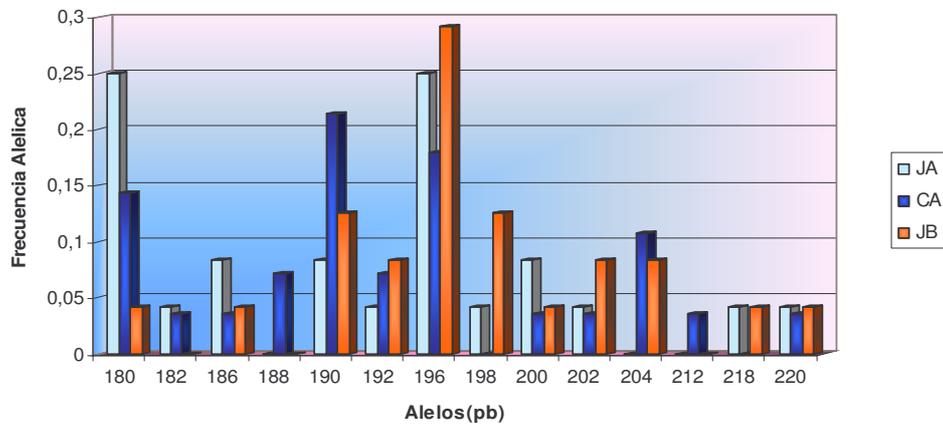
**Figura 15. Comparación de frecuencias alélicas del locus Bh5 para las tres poblaciones estudiadas.**



Fuente. Esta investigación

Como se puede observar en la figura 16 al locus Bh6 pertenece el alelo 196 pb, el cual presentó mayor frecuencia en las poblaciones JA y JB, y además también se encuentra en CA, aunque en menor proporción; en esta última población el alelo de mayor frecuencia es de 190 pb (Tabla 2).

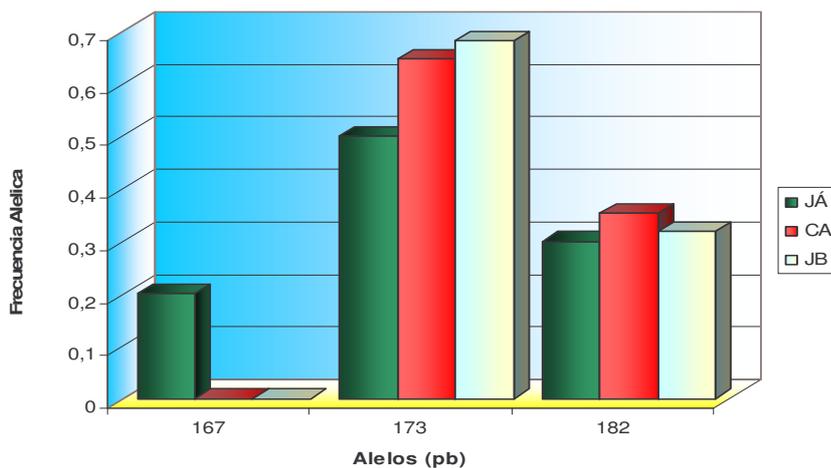
**FIGURA 16: Comparación de frecuencias alélicas del locus Bh6 para las tres poblaciones estudiadas.**



Fuente. Esta investigación

En el locus Bh14, se puede observar una menor variabilidad en cuanto al número de alelos comparado con el resto de locus evaluados en el presente trabajo; el alelo con mayor frecuencia fue el 173 pb presente en dos poblaciones, siendo más frecuente en Jusante de Barragen como se puede observar en la Tabla 2 y la Figura 17. Se debe destacar la presencia de un alelo privado para los individuos de la población JA, cuya importancia se analiza más adelante.

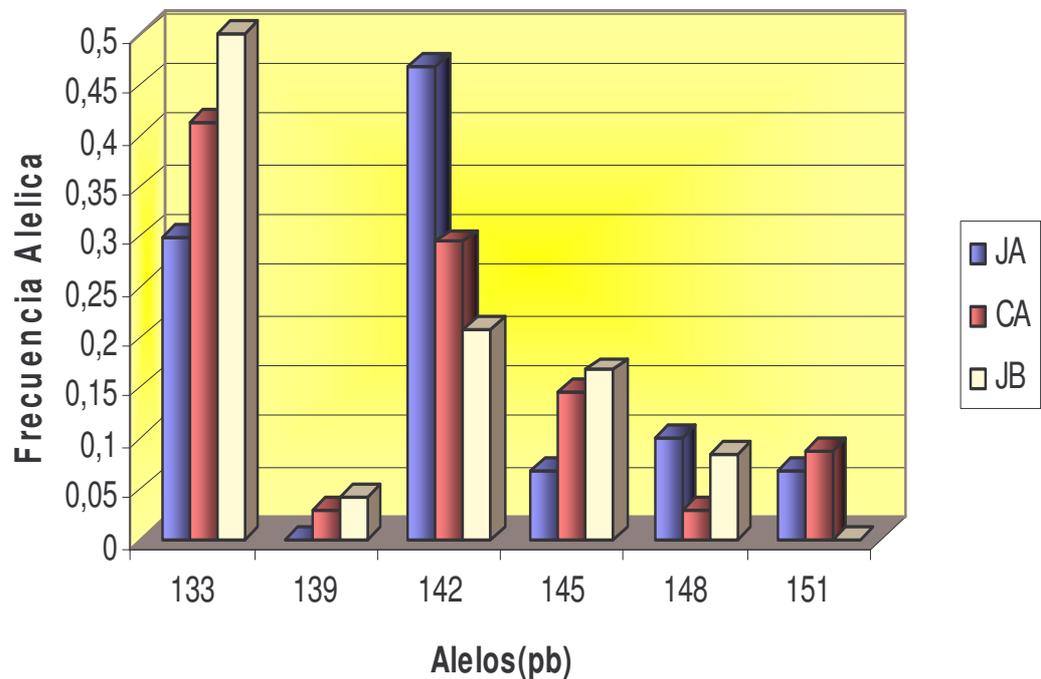
**FIGURA 17: Comparación de frecuencias alélicas del locus Bh14 para las tres poblaciones estudiadas.**



Fuente. Esta investigación

En el locus Bh16 el alelo más frecuente en la población de JA fue el alelo 142 pb, y tanto en la población de CA como JB fue el alelo de 133 pb, el alelo que se encuentra en todas las poblaciones analizadas, fue el de 133 pb. (Tabla 2 y Figura 18).

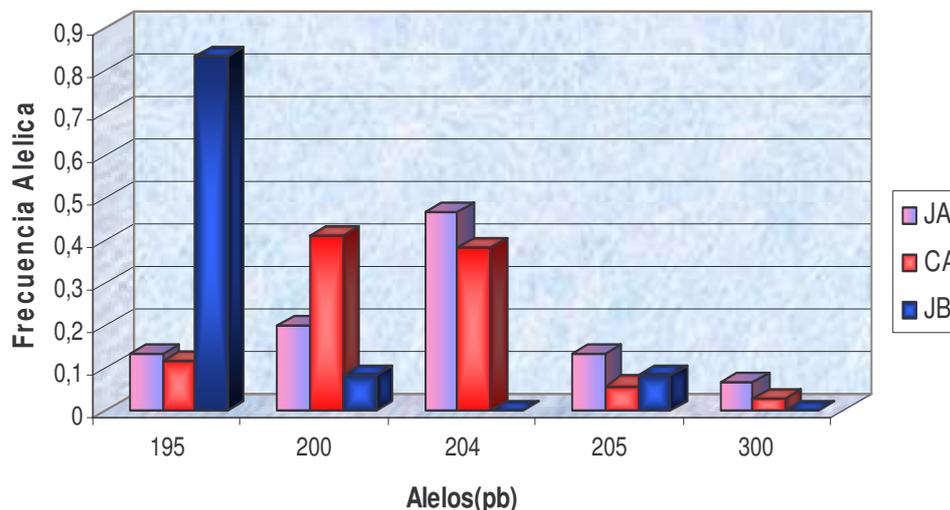
**FIGURA 18: Comparación de frecuencias alélicas del locus Bh16 para las tres poblaciones estudiadas.**



Fuente. Esta investigación

Mientras en el locus Bh17 el alelo con mayor frecuencia en la población de JA fue el alelo 204 pb, en la población de CA fue el de 200 pb y en la población de JB fue el de 195 pb, este último se puede destacar su frecuencia mayor al 80% como se puede observar en la Tabla 2 y Figura 19.

**FIGURA 19: Comparación de frecuencias alélicas del locus Bh17 para las tres poblaciones estudiadas.**



Fuente. Esta investigación

De los anteriores resultados se puede inferir que los locus evaluados presentan frecuencias alélicas diversas intra e inter poblacionales las cuales se puntualizaran en el cálculo y análisis de los siguientes parámetros relacionados con la estimación de la variabilidad genética de *Brycon orthotaenia*.

### 6.3 VARIABILIDAD GENÉTICA INTRA POBLACIONAL.

Los datos de variación genética intra poblacional (Número de alelos, número medio de alelos y número alelos privados) están expuestos en la Tabla 3.

Con respecto al número de alelos privados, la técnica microsatélites permitió la identificación de algunos alelos únicos. Un total de tres alelos privados fueron encontrados, dos en el locus Bh16 (188 pb y 212 pb), presentes en CA, y uno en el locus Bh14 (167 pb), presente en JA, todos con una frecuencia menor o igual a 20% (Figura 20). La baja frecuencia de estos alelos probablemente permita clasificarlos como alelos raros, lo cual podría ser de mayor significancia al realizar futuras investigaciones que utilicen muestras poblacionales de mayor tamaño, en cuyo caso se los podría utilizar como marcadores de la población, de acuerdo a lo manifestado por Slatkin, ya que se podría tratar de flujo génico<sup>138</sup>.

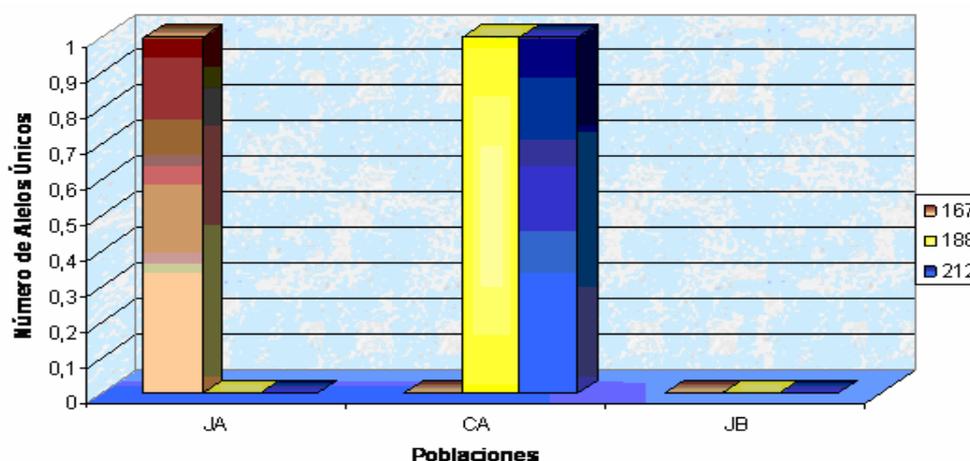
<sup>138</sup> SLATKIN, M. Hitchhiking and associate over dominance at a microsatellite locus. *In: Molecuar Biology and evolution.*, Vol. 1, No. 12, 1995. p. 473-480.

**Tabla 3: Caracterización de cinco locus microsatélites de *Brycon orthotaenia*. Número de alelos ( $n_a$ ) total, rango del tamaño de los alelos en pb y número de alelos por población, basados en una muestra de 44 individuos.**

Locus	Secuencia de los Primers (5'-3')	Elementos Repetitivos	$n_a$	Rango de los alelos (pb)	$n_a$ por poblaciones		
					JA	CA	JB
Bh5	F: CTTCCACTCATACCGGCACT R: ACATCTGGCATTAGGCATAG	(GT) <sub>13</sub>	11	204-244	8	11	7
Bh6	F: GCGTTGCGTGTGTATGTTAA R: AGAGGTGTCCACAAAGTTTT	(GT) <sub>14</sub>	14	160-220	11	12	11
Bh14	F: GTATCACCACCAACGGTAAT R: ATCAATGGTGGAAGAAGGAG	(TTA) <sub>8</sub>	3	167-182	3	2	2
Bh16	F: CCTCCAATGAAAACAGTGCG R: ACGACTTAGCCACCCACCCT	(TAA) <sub>8</sub>	6	133-151	5	6	5
Bh7	F: GTCAGCACTCAGCACATAGC R: AGAGAGCCTGAAAGTGAGTC	(GTTT) <sub>5</sub> (GGTTT) <sub>4</sub>	5	195-300	5	5	3

Fuente. Esta investigación

**FIGURA 20: Número de alelos únicos observados en un total de 44 individuos para cinco locus microsatélites en las tres poblaciones estudiadas.**



Fuente. Esta investigación

En la Tabla 4, se reporta la heterocigosidad observada, esperada, así como el coeficiente de endocruzamiento, los valores de la ley de equilibrio Hardy Weinberg y la diversidad génica; como se puede analizar la heterocigosidad observada en las poblaciones estudiadas varió de cero en el locus Bh17 en JA y JB; hasta uno, tanto en el locus Bh16 en las tres poblaciones, así como en el locus Bh5, pero únicamente en las poblaciones JA y CA. De acuerdo a lo anterior, los locus caracterizados revelaron una moderada variación genética, según lo reportado por WRIGHT<sup>139</sup> y HARTL y CLARK<sup>140</sup>.

Así mismo fue detectado un número relativamente pequeño de alelos, variando de tres a catorce alelos por locus y una media de 7,8 ( $\pm 1,98$ ) alelos por locus. El nivel de heterocigosidad esperada vario de 30,4% a 90,5%, con una media de 69, 71 y 63% ( $\pm 0,17$ ) para JA, CA y JB respectivamente, esta variación es comparable con aquella obtenida por Sanches y Galetti Jr.<sup>141</sup>; la cual fue de 66.40%; así como con los resultados obtenidos por Carvalho y Galetti Jr.<sup>142</sup> (65.7%), en trabajos realizados en p. costatus, a igual que la de otros trabajos<sup>143 144</sup>.

Por otra parte, estos datos están de acuerdo con los valores medios encontrados para peces de agua dulce, de 7,5 alelos por locus y 0,46 de heterocigosidad esperada<sup>145</sup>. El reducido número de alelos, puede estar relacionado al pequeño número de repeticiones contenido en cada locus, lo cual podría constituirse en una ventaja en la objetividad de los resultados, por cuanto es posible la disminución de errores puntuales (*scoring*) de alelos<sup>146</sup>.

---

<sup>139</sup> WRIGHT, Op Cit.

<sup>140</sup> HARTL, D. L. and CLARK, A. G. Principles of Population Genetics. Sunderlands. Sinauer Associates. Inc. 1997.

<sup>141</sup> SANCHES e GALETTI. Op Cit.

<sup>142</sup> CARVALHO, Luis e GALETTI Jr., Pedro Manuel. Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) na Bacia do Rio São Francisco, Região de Três Marias (MG). In press.

<sup>143</sup> O'REILLY, P. T.; CANINO, M. F.; BAILEY, K.M. and BENTZEN, P. Isolation of twenty low stutter di- and tetranucleotide microsatellites for population analyses of walleye Pollock and other gadoids. Journal of Fish Biology., No. 50, 2000. p. 1074-1086.

<sup>144</sup> BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; CABELLO, P. H. and TRAUB-CSEKO, Y. M. Op Cit. p. 51-65.

<sup>145</sup> DE WOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. In: Journal do Fish Biology., Vol. 56, No. 1, 2000. p. 461-473.

<sup>146</sup> O'REILLY, P. T.; CANINO, M. F.; BAILEY, K.M. and BENTZEN, P. Op Cit. p. 1074-1086.

**Tabla 4: Número de individuos evaluados (*n*) por población, heterozigosidad observada (*H<sub>o</sub>*) y esperada (*H<sub>e</sub>*), coeficiente de endocruzamiento (*F<sub>IS</sub>*), valor de *p* para desvío de equilibrio Hardy Weinberg (*p*) y diversidad génica (*dg*) basado en una muestra de 44 individuos.**

<b>Locus</b>		<b>JA</b> <i>n: 15</i>	<b>CA</b> <i>n: 17</i>	<b>JB</b> <i>n: 12</i>
Bh5	(GT) <sub>13</sub>			
H <sub>o</sub>		1	1	0,83
H <sub>e</sub>		0,828	0,905	0,848
F <sub>IS</sub>		-0,217	-0,108	0,018
P		0,003*	0,000*	0,039*
Dg		0,821	0,903	0,848
Bh6	(GT) <sub>14</sub>			
H <sub>o</sub>		0,75	0,857	0,833
H <sub>e</sub>		0,88	0,905	0,893
F <sub>IS</sub>		0,154	0,055	0,068
P		0,244	0,8487	0,1775
Dg		0,886	0,907	0,894
Bh14	(TTA) <sub>8</sub>			
H <sub>o</sub>		0,6	0,706	0,636
H <sub>e</sub>		0,64	0,47	0,44
F <sub>IS</sub>		0,067	-0,524	-0,429
P		0,0018*	0,0492*	0,4798
Dg		0,643	0,463	0,445
Bh16	(TAA) <sub>8</sub>			
H <sub>o</sub>		1	1	1
H <sub>e</sub>		0,69	0,73	0,69
F <sub>IS</sub>		-0,458	-0,377	-0,459
P		0,0389*	0,2981	0,0954
Dg		0,686	0,726	0,686
Bh17	(GTTT) <sub>5</sub> (GGTTT) <sub>4</sub>			
H <sub>o</sub>		0	0,059	0
H <sub>e</sub>		0,75	0,71	0,318
F <sub>IS</sub>		1	0,917	1
P		0,000*	0,000*	0,0020*
Dg		0,752	0,706	0,318
<b>Media H<sub>o</sub></b>		<b>0,67</b>	<b>0,72</b>	<b>0,66</b>
<b>Media H<sub>e</sub></b>		<b>0,75</b>	<b>0,74</b>	<b>0,64</b>
<b>Total F<sub>IS</sub></b>		<b>0,1190</b>	<b>0,0208*</b>	<b>- 0303*(Aneva)</b>
<b>Media dg</b>		<b>0,758</b>	<b>0,741</b>	<b>0,638</b>

Valor de significancia (P<0,05).

#### 6.4 TEST DE EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.

Las tres poblaciones presentaron más de un locus desviado de las proporciones esperadas para el equilibrio de Hardy-Weinberg (JA: Bh5, Bh14, Bh16 y Bh17; CA: Bh5, Bh14 y Bh17; JB: Bh5 y Bh17). En las tres poblaciones el locus Bh5 y Bh17 se desviaron de las proporciones esperadas de Hardy-Weinberg (Tabla 4). Este desvío está dado por exceso o déficit de heterocigotos como lo evidencia el valor  $F_{IS}$  (valores negativos y positivos respectivamente). Este test fue calculado por el método de randomizaciones.

La desviación del equilibrio de Hardy Weinberg, para las dos poblaciones indicó pérdida de variabilidad genética, que puede ser el resultado de la acción de algún tipo de fuerzas que están actuando sobre estas poblaciones para alterar su equilibrio, fuerzas como la deriva génica, la selección natural en la población salvaje o selección artificial no intencionada en la población cultivada y el sistema de cruzamiento.

Similares resultados en el test de Equilibrio de Hardy-Weinberg fueron encontrados por Carvalho y Galetti Jr.<sup>147</sup>; los cuales encontraron por lo menos un locus desviado de las proporciones esperadas para este test.

Mientras Hatanaka et al.<sup>148</sup>, al estudiar dos poblaciones de *Prochilodus argenteus* en la región de la represa de Tres Marias (MG), en el río São Francisco, determinaron que al realizar muestreos en tres años no consecutivos, dos de los cuatro loci microsatélites evaluados presentaron desvíos del equilibrio de Hardy Weinberg en los tres muestreos, mientras que otro locus presentó desvío del equilibrio Hardy Weinberg únicamente en el primer año de muestreo y en los dos siguientes ya no presentó desvío, demostrando, que una población puede alcanzar el equilibrio en una generación de apareamientos aleatorios.

#### 6.5 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.

Tres pares de locus asociados no aleatorios entre genotipos de los cinco locus en las tres localidades (Bh05 & Bh14, Bh05 & Bh16 y Bh14 & Bh16) se encuentran en desequilibrio de ligamiento (Tabla 5). Sanches y Galetti Jr.<sup>149</sup>, encontraron desequilibrio de ligación en dos pares de locus (Bh08 & Bh13 y Bh06 & Bh17), los cuales pueden estar indicando la posibilidad de que estén ligados; mientras que Carvalho y Galetti Jr.<sup>150</sup>, no encontraron ninguna significancia estadística para las

---

<sup>147</sup> CARVALHO e GALETTI. Op Cit., p. 33

<sup>148</sup> HATANAKA, T., HENRIQUE-SILVA, F. y GALETTI Jr, P. Op Cit., p. 1-7

<sup>149</sup> SANCHES e GALETTI. Op Cit.

<sup>150</sup> CARVALHO e GALETTI. Op Cit., p. 33

asociaciones no aleatorias entre los genotipos de los seis loci en las tres localidades, asumiendo independencia estadística entre los loci.

**Tabla 5: Desequilibrio de ligación analizado para los cinco locus a través del test de Chi - cuadrado ( $X^2$ ), valor de significancia (p).**

PAR DE LOCUS	$X^2$	DF	P
Bh05 & Bh06	5.923	4	0,205
Bh05 & Bh14	13.921	6	0,031*
Bh06 & Bh14	2.888	4	0,577
Bh05 & Bh16	19.592	6	0,003*
Bh06 & Bh16	2.487	4	0,647
Bh14 & Bh16	18.285	6	0,006*
Bh05 & Bh17	8.274	6	0.219
Bh06 & Bh17	2.894	4	0.576
Bh14 & Bh17	7.398	6	0.286
Bh16 & Bh17	9.502	6	0,147

(p < 0,05)

Fuente. Esta investigación

## 6.6 RIQUEZA ALELICA

El locus que presentó mayor riqueza alelica es Bh6 y el de menor es el locus Bh14, mientras que la población con mayor riqueza alelica fue CA. (Tabla 6)

**Tabla 6. Valores de riqueza alelica para las tres localidades del rio São Francisco (JA, CA y JB).**

Locus	JA	CA	JB
<b>Bh5</b>	7,142	9,789	6,909
<b>Bh6</b>	10,489	10,628	10,572
<b>Bh14</b>	3,000	2,000	2,000
<b>Bh16</b>	4,857	5,255	4,913
<b>Bh17</b>	4,930	4,519	2,993
<b>Media</b>	6,084	6,438	5,477

Fuente. Esta investigación

## 6.7 VARIABILIDAD GENÉTICA INTRA POBLACIONAL.

Las tasas de mutación de los microsatélites traen importantes consecuencias para la estimativa de  $F_{ST}$ , porque de hecho la probabilidad de identidad de los genes disminuye altas tasas de mutación. Se sabe que la expectativa de  $F_{ST}$  bajo completa diferenciación no será siempre uno, de hecho en la mayoría de los casos, por efecto del alto polimorfismo (debido a las altas tasas de mutación) que drásticamente disminuye las expectativas de las estimativas del parámetro<sup>151 152 153</sup>.

Los valores estimados de  $F_{ST}$  ( $\theta$  weir y Cockerham<sup>154</sup>), para los pares de muestras están en la Tabla 7. No se observó diferencias significativas entre JA y CA, indicando homogeneidad genética entre estas localidades, en relación a los marcadores microsatélites, mientras que para los pares JA vs. JB y CA vs. JB mostraron diferencias significativas, esto equivale decir que las muestras comparadas debieron ser retiradas de por lo menos dos poblaciones. Valores similares fueron encontrados Hatanaka, Henrique- Silva y Galetti Jr<sup>155</sup>; los cuales encuentran una leve pero significativa diferenciación poblacional, reflejando la existencia de diferentes pools genéticos en las localidades.

**Tabla 7: Valores estimados de  $F_{ST}$  (par a par) y su significancia, después de la corrección de Bonferroni, para los pares de muestras (en paréntesis valores de p).**

	JA	CA	JB
JA	–	<b>NS 0,0051</b> (0,31667)	<b>0,1115*</b> (0,01667)
CA	–	–	<b>0,0902*</b> (0,01667)

.NS: No Significativo (0,016667) ( $P > 0,05$ )

La interpretación de los valores de  $F_{ST}$  es una actividad compleja, pues valores idénticos de algunos parámetros pueden ser estimados de diferentes patrones de

<sup>151</sup> CHARLESWORTH, B. Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability. In: Molecular Biology and Evolution. Vol. 15, No. 1, 1998. p. 538-543.

<sup>152</sup> WRIGHT, Op Cit.

<sup>153</sup> HEDRICK, P. W. Op Cit., p. 313-318.

<sup>154</sup> WEIR, B. S. And COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution., Vol. 38, 1984. p. 1358 – 1370.

<sup>155</sup> HATANAKA; HENRIQUE-SILVA and GALETTI. Op Cit., p. 4

frecuencias alélicas<sup>156</sup>. Para esta interpretación, se han sugerido que valores entre 0 a 0,05 indican débil diferenciación genética; valores entre 0,15 a 0,25, diferenciación moderada; y valores encima de 0,25 indican una alta diferenciación<sup>157</sup>.<sup>158</sup>. De acuerdo con ese criterio, el valor estimado de  $F_{ST}$  en este trabajo indica una moderada estructuración poblacional en *Brycon orthotaenia*.

Las subpoblaciones de *B. orthotaenia*, analizadas en este trabajo, debe ser considerada como parte una población “meta población” dentro del área delimitada por las barreras de Três Marias y de Sobradinho (alto y medio Río San Francisco), un área de cerca de 1.200 Km de extensión, con decenas de tributarios (Permanentes y temporarios) utilizados para la reproducción de esos peces y otros peces migradores.

La competencia por grandes recursos y de buena calidad es muy común en la naturaleza, pues los individuos para vez de sobrevivir necesitan de los mejores recursos disponibles. Considerando que del área río debajo de la represa carece de las condiciones óptimas para la reproducción, se espera que los especímenes más vigorosos tengan los mejores hábitats como las corrientes tributarias estableciendo territorios y dejando los hábitats menos favorables para los individuos más débiles durante la migración de peces<sup>159</sup>.<sup>160</sup>. Además estudios anteriores han demostrado que los especímenes de la región C (hábitat de subpoblación JA), la cual ofrecen condiciones más favorables de reproducción son más grandes que los peces de la región A (hábitat de la subpoblación JB) y B (hábitat de la subpoblación CA).

En el hábitat de la subpoblación JA, en su confluencia con el río São Francisco, el río Abaeté provee más alta temperatura del agua, promedios altos de oxígeno y gran corriente de agua que las condiciones que se presentan río abajo de la represa<sup>161</sup>. Además, es posible que los individuos de las diferentes unidades presenten un comportamiento de comigración durante el periodo reproductivo. Este modelo sugiere que el pez en la región JA podría ser fragmentado en varias unidades de poblaciones y que durante el periodo reproductivo solamente una fracción migra hacia la represa, mientras la mayor migración posiblemente sería hacia localidades con condiciones medioambientales más favorables para la reproducción (Figura 21). Además se sabe que las represas hidroeléctricas crean nuevos obstáculos a los peces migradores impidiendo la dispersión natural,

---

<sup>156</sup> WRIGHT, S. Op Cit.

<sup>157</sup> WRIGHT, S. Op Cit.

<sup>158</sup> HARTL and CLACK. Op Cit.

<sup>159</sup> KREBS, J. R. and DAVIES, N. B. An Introduction to Behavioural Ecology. Blackwell Scientific Publications. Oxford., 1996. p. 420.

<sup>160</sup> HATANAKA, Terumi e GALETTI Jr., Pedro Manuel. Op Cit., p.19-25.

<sup>161</sup> SATO, Y.; MIRANDA Mot; BAZZOLI N. e RIZZO E. Impacto do reservatório de Três Marias sobre a piracema à jusante da Barragem. Em: XI Encontro Brasileiro de Ictiologia., 1995. p. 2.

afectando directamente la supervivencia y reproducción, pues existen cambios termales e hidrodinámicos en el agua<sup>162</sup>.

**Figura 21: Modelo de estructura genética de *B. orthontaenia* de la región de Três Marias (Rio São Francisco), modelo de población estructurada. Los cuadros DE colores indican las distintas unidades reproductivas, las flechas indican las rutas migratorias.**



Fuente. Esta investigación

Estudios poblacionales realizadas por otros autores en esta especie y en otros peces migradores en el río San Francisco llegaron a conclusiones semejantes a los encontrados en este trabajo; Wasko y Galetti Jr.<sup>163</sup> estudiaron poblaciones de *Brycon orthontaenia*, de la región de Três Marias, a través de RAPD, el cuál determinó que las muestras colectadas cerca de Jusante de Barragen presentan diferencias genéticas de otra muestra hecha a 40 Km de la barrera; según los autores, los peces colectados en la región de la barrera posee menor heteroziguidad (0,57) al compararlos con peces muestreados en otra región (0,64).

<sup>162</sup>AGOSTINHO, Angelo Antonio; JÚLIO, Jr. H. F. E BORGUETTI, J. R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para a sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. Em: Rev Unimar Vol. 14. 1992. p. 89 -107.

<sup>163</sup> WASKO e GALETTI, Op Cit., p. 133 -136.

En este mismo sentido, es oportuno resaltar que en ese estudio fue encontrada una banda de 1.200 pb presente en el 100% de los individuos en la barrera, mientras que la misma banda fue detectada en apenas 27% de los peces colectados en la otra región. Los autores sugieren que los animales colectados en la región de la barrera de Três Marias pueden representar un único stock de *B. Orthontaenia*, en cuanto los individuos colectados en la región a la Jusante de la confluencia entre los ríos San Francisco y Abaeté pueden representar un stock compuesto de por lo menos dos pools genéticos diferentes.

De la misma manera que Hatanaka y Galetti Jr.<sup>164</sup>, se podría proponer tres hipótesis para explicar la posible estructura genética observada en Matrinchã en la región de Tres Marías: la primera es que el pez río abajo entre la confluencia de los ríos Abaeté y San Francisco (región C) comprende una población panmictica, en la cuál durante el periodo de reproducción, una fracción migra hacia la represa; el más alto coeficiente de similitud observando en individuos del río debajo de la represa (región A) es el resultado de la corriente genética.

La segunda hipótesis podría reflejar la conducta seguidora de los individuos Matrinchã, similar a las poblaciones de trucha silvestre. En este caso, los animales de la región C comprenden una meta población con distintas poblaciones reproductivas, las cuales históricamente completan su migración a las diferentes partes de este sistema hidroeléctrico. Las diferencias genéticas son determinadas por senderos de evolución de la crianza de poblaciones de cada río tributario, mientras las similitudes genéticas remanentes representan el supuesto grupo genético de un ancestro común.

En la tercera hipótesis una fracción menor de la meta población completa su migración hacia la represa (región A) durante el periodo reproductivo, mientras la mayor parte posiblemente migra hacia las localidades mas favorables para la reproducción (modelo de población estructurada). Los individuos de las diferentes poblaciones presentan un comportamiento de comigración durante el periodo reproductivo.

Por otra parte Barroso et al.<sup>165</sup>, encontraron diferencias altas en la población cercana a la represa, por lo que se ve afectada la migración; mientras que Carvalho y Galetti Jr.<sup>166</sup>, no observaron diferencias significativas entre las tres localidades, indicando alta homogeneidad genética entre las mismas.

---

<sup>164</sup> HATANAKA e GALETTI, Op Cit., p.23 -24.

<sup>165</sup> BARROSO; HILSDORF; MOREIRA; CABELLO and TRAUB-CSEKO, Op Cit., p. 62.

<sup>166</sup> CARVALHO e GALETTI, Op Cit.

## 6.8 DIVERSIDAD GENÉTICA.

Los locus Bh5 y Bh17 no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, porque presentan exceso y déficit de heterocigotos. El desequilibrio de ligación detectado para los pares de locus Bh05 & Bh14, Bh05 & Bh16 y Bh14 & Bh16, pueden estar indicando la posibilidad de que los mismos están ligados.

Por tanto, en este estudio fueron caracterizados 5 locus de microsatélites polimórficos de *Brycon orthotaenia*, los cuales pudieron ser analizados en gel de poliacrilamida, sin que se necesite de grandes demandas financieras. Estas características los tornan herramientas potencialmente útiles para estudios de poblaciones naturales o de cautiverio tanto para la especie cuanto para otras especies del género.

A pesar del número pequeño de muestras parece no haber influenciado en los resultados, ya que se pudo analizar sin mayor problema, encontrando diversidad genética, datos que coinciden con los encontrados en los trabajos de Souza<sup>167</sup>, Wasco y Galetti<sup>168</sup>, Hatanaka y Galetti<sup>169</sup> y Hatanaka et al.<sup>170</sup>, siendo este último el único que utilizó marcadores microsatélites.

Loci con muchos alelos, como los microsatélites, tienen la capacidad sin precedentes de detectar y describir diferencias genéticas entre poblaciones<sup>171, 172</sup>. En tanto, diferencias genéticas estadísticamente significativas no siempre son biológicamente o evolutivamente significantes<sup>173</sup>.

La diversidad genética actual es el resultado de millones de años de evolución, sin embargo, pérdidas irreparables pueden ocurrir muy rápido<sup>174</sup>. Las subpoblaciones locales de *B. orthotaenia* probablemente deben ser influenciadas por la migración reproductiva anual que proporciona un gran flujo génico entre ellas.

---

<sup>167</sup> SOUZA, A. B. Análise da variabilidade genética do surubim do São Francisco, *Pseudoplatistoma corruscans* (Pisces, Pimelodidae): Subsídios à conservação e ao cultivo da espécie. Tese de Doutorado-Universidade Federal de São Carlos, São Paulo., 2003. p. 148.

<sup>168</sup> WASKO e GALETTI. Op Cit., p.125.

<sup>169</sup> HATANAKA e GALETTI. Op Cit., p.19-25.

<sup>170</sup> HATANAKA; HENRIQUE-SILVA and GALETTI. Op Cit., p. 308 – 310.

<sup>171</sup> HEDRICK, P. W. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. In: Evolution. Vol. 53. 1999. p. 313.

<sup>172</sup> KALINOWSKI, S. T. ¿How many alleles should be used to estimate genetic distances?. In: Heredity., Vol. 88, 2002. 62-65.

<sup>173</sup> HEDRICK, Op Cit. p. 316.

<sup>174</sup> NIELSEN, E. E. and KENCHINGTON, E. Prioritizing marine fish and shellfish populations for conservation: ¿a useful concept?. Fish and fisheries., Vol. 2, 2001. p. 328 – 343.

## 6.9 DISTANCIA E IDENTIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES.

La mayor distancia genética se presentó entre JA Vs. JB como se puede constatar en los valores encontrados en la Tabla 8.

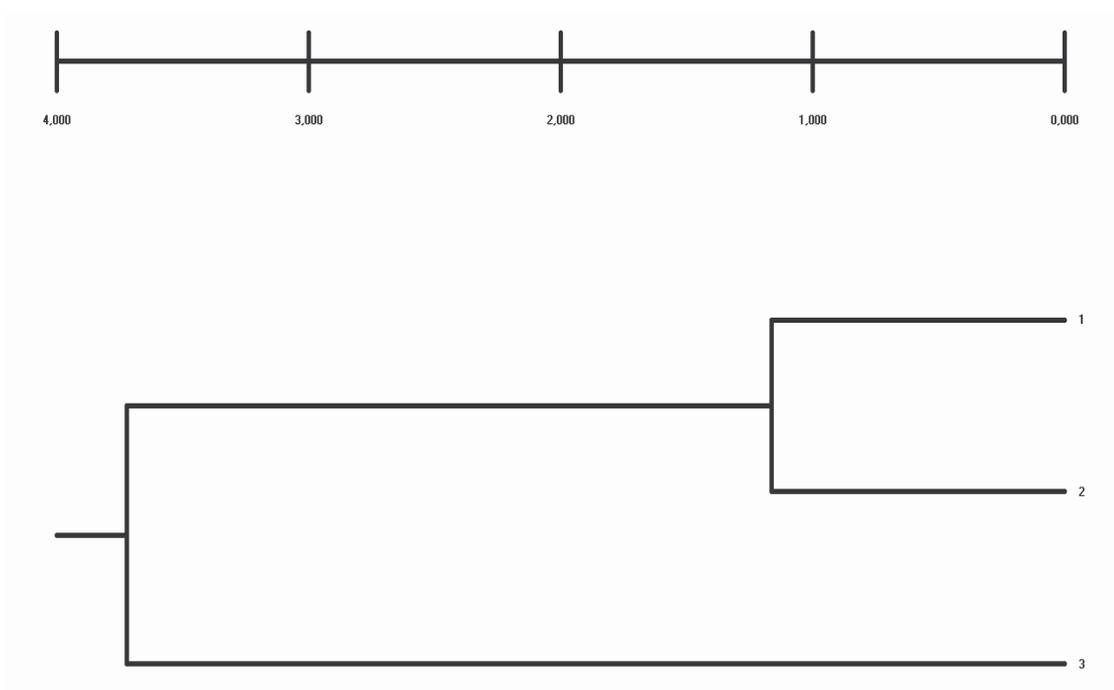
**Tabla 8: Valores de distancia e identidad genética para las poblaciones de JA, CA y JB.**

<b>POBLACIONES COMPARADAS</b>	<b>Distancia</b>	<b>Identidad</b>
JA vs. CA	0,1165	0,8901
JA vs. JB	0,4245	0,6541
CA vs. JB	0,3204	0,7259

Fuente. Esta investigación

El análisis de UPGMA permitió el agrupamiento de las tres poblaciones del río São Francisco (JA, CA y JB), el cuál determinó que las poblaciones JA y CA son cercanas una de la otra como se puede observar en la figura 22, indicando alta semejanza entre estas dos localidades, mientras que la población JB tiene mayor diferencia, lo que indicó que es una población con menor parentesco. Los valores de los nudos se encuentran en la Tabla 9.

**FIGURA 22: Dendrograma exhibidor de parentesco genético entre individuos de *B. orthontaenia*, basado en un análisis grupal UPGMA. (1= JA, 2 = CA, 3 = JB).**



Fuente. Esta investigación

**Tabla 9: Análisis UPGMA. Agrupamiento usando Nei's (1972). Distancia original.**

Nodo de Distancia	Valor	Poblaciones Incluidas
1	0,1165	1 2
2	0,3725	1 2 3

Fuente. Esta investigación

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1 CONCLUSIONES

- Todos los loci analizados produjeron un total de 39 alelos diferentes para los cinco pares de primers estudiados, variando en un rango de 3 a 14 alelos por locus; la frecuencia alelica vario entre 0.029 a 0.833. Los locus evaluados presentan frecuencias alelicas diversas, tanto intra como inter poblacionales.
- La heterozigosidad observada en las poblaciones estudiadas varió de cero en el locus Bh17 en JA y JB; hasta uno, tanto en el locus Bh16 en las tres poblaciones, así como en el locus Bh5, pero únicamente en las poblaciones JA y CA.
- El comportamiento de la heterozigosidad observada en las poblaciones generalmente fue mayor que la heterozigosidad esperada, excepto en los locus Bh6 y Bh17, donde se presenta menor que He; en cuanto a la media de este parámetro generalmente, la Ho es menor, excepto en la población JB; la diferencia es mínima (0.02 a 0.08).
- Fueron detectados diferencias genéticas entre los peces de las localidades JA vs. JB y CA vs. JB, ósea, los datos de microsatélites revelan una estructuración poblacional moderada, sugiriendo la existencia de por lo menos dos pool génicos para estos peces migradores; la estructuración se pudo ver alterada por la construcción de la barrera de Três Marias, la cual impide la migración de los peces de está especie.
- De acuerdo a los valores obtenidos mediante los cálculos del índice de Fijación ( $F_{ST}$ ), existe un flujo génico cerrado entre las localidades en estudio, lo que sugiere la presencia demás de un grupo poblacional entre las tres poblaciones de la represa de Três Marias. En conclusión B. *Orthontaenia* presenta diferenciación poblacional mostrando por lo menos dos unidades poblacionales y un restringido flujo genético en la población. Además en el presente trabajo se encontró que los valores estimados de  $F_{ST}$  en este trabajo se encontró entre 0,0051 y 0,1115 lo que indica una moderada estructuración poblacional en *Brycon orthontaenia*.
- En el estudio fueron caracterizados 5 locus de microsatélites polimórficos de *Brycon orthotaenia*, los cuales pudieron ser analizados en gel de poliacrilamida, sin

que se necesite de grandes demandas financieras. Estas características los tornan herramientas potencialmente útiles para estudios de poblaciones naturales o de cautiverio tanto para la especie cuanto para otras especies del género.

- El manejo de recursos con importancia pesquera como es el caso de *B. orthontaenia*, el reconocimiento de la variabilidad genética con el objetivo de diferenciar stocks puede ser de gran utilidad, para maximizar de manera sostenible el rendimiento de las capturas e identificar el impacto de las actividades antrópicas en procesos ecológicos y evolutivos.
- La mayoría de las represas hidroeléctricas se han construido sin un estudio previo y exhaustivo del impacto ambiental, lo que ha generado el deterioro y hasta el exterminio de muchas especies siendo los peces uno de los grupos más afectados, por los cambios en sus habitats reproductivo, alimenticio y primordialmente en su estructura genética.
- Los hallazgos reportados en este estudio revelan implicaciones importantes para el manejo de la pesquería, la acuicultura y la conservación de bancos de peces de *B. orthontaenia* en la región de Três Marias de la cuenca del Río São Francisco.

## **7.2 RECOMENDACIONES**

- Realizar posteriores estudios de variabilidad genética en *Brycon orthontaenia*, donde se utilice mayor número muestral, más localidades, diferentes estaciones del año y más loci hipervariables, como los microsatélites, lo cual despejará el escenario existente.
- Estos estudios son de considerable importancia cuando se piensa en la elaboración de proyectos que buscan la conservación de recursos naturales. Por tanto, es evidente la utilidad cada vez mayor de los estudios con marcadores moleculares a cerca de los grupos taxonómicos y poblaciones de peces. Su importancia abarca desde las cuestiones evolutivas hasta la elaboración de programas de manejo de conservación y auxilio en la planeación de un manejo adecuado de stocks cultivados en acuicultura.
- Desarrollar estudios de variabilidad genética en especies icticas Colombianas, mediante la utilización de la técnica de microsatélites con el fin de obtener óptimos resultados.

- Contemplar dentro de los planes de conservación de especies icticas los estudios poblacionales con técnicas moleculares modernas, las cuales garantizan datos reales y altamente confiables.
- Al momento de realizar un proyecto de construcciones de represas hidroeléctricas, contemplar el impacto que tendrá en las especies existentes en el lugar e incluir dentro del proyecto la construcción de canales o gradas para la migración de peces.

## BIBLIOGRAFÍA

AGOSTINHO, Angelo Antonio. Itaipu reservoir (Brasil): Impacts of impoundments on the fish and fisheries. In: COWXI, G. Rehabilitation os freshwaters fisheries. Bodmin, UK: Fishing news Book. 1995. p. 184.

AGOSTINHO, Angelo Antonio; JÚLIO, Jr.H.F. e BORGUETTI, J. R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para a sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. Em: Rev Unimar., Vol. 14, 1992. p. 89 -107.

ALJANABI, Salah M. and MARTINEZ, Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. In: Nucleic Acids Research., Vol. 25, Cap. 22. Brasília: brasil.1997. p. 4692-4693

AVISE John C. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman and Hall. 1994. p. 511.

\_\_\_\_\_. Molecular markers, natural history and evolution. 2<sup>a</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates. Inc: 2004. p. 684.

BARROSO, Renata Melon; HILSDORF, Alexandre W. S.; MOREIRA, Heden L. M.; MELLO, A. M.; GUIMARÃES, E. F.; CABELLO, Pedro H.; TRAUB-CSEKO, Yara M. Identification and characterization of microsatellites *loci* in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). In: Molecular Ecology Notes, Vol. 3, 2003. p. 298.

BARROSO, Renata Melon; HILSDORF, Alexandre W. S.; MOREIRA, Heden L. M.; CABELLO, Pedro H.; TRAUB-CSEKO, Yara M. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. In: Aquaculture., Vol. 1, No. 247, 2005. p. 51-65.

BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E.; MENOYO, D.; BAUTISTA, J. M. Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. In: Aquatic Living Resources., Vol. 1, No.16, 2003. p. 362-369.

BOTSTEIN, D; WHITE R.L; SKOLNICK M. and DAVIS R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. In: Hum. Genet., Vol. 1, No. 32, 1980. p. 331.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes na bacia do rio São Francisco). Lugar: Minas Gerais: Ministério da irrigação – CODEVASF, 1988. p. 115.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, KZ de S. de; LOPES, BS. Peixes do Pantanal: Manual de identificação. Lugar: Brasília: Embrapa - SPI; Corumbá: Embrapa – CPAP, 1999. p. 184.

BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. Measuring genetics variability in plant populations. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding: part A. In: Amsterdam: Elsevier Science, 1983. p. 219-239.

CAPPIO, L. F.; MARTINS, A. e KIRCHNER, R. O Rio São Francisco. Petrópolis, Brasil: Editora Vozes, 1995. p.110.

CARVALHO, Gary R. and PITCHER, Tony J. Molecular genetics in fisheries. New York: Chapman and Hall, 1995. p. 131.

CARVALHO, Luis e GALETTI Jr., Pedro Manuel. Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) na Bacia do Rio São Francisco, Região de Três Marias (MG). In press.

CASTRO, R. M. C. and VARI, R. P. *Moojenichthys Miranda-Ribeiro* (Pisces: Ostariophysi: Characidae), a phylogenetic reappraisal and redescription. In: Proc. Biol. Soc. Wash., Vol. 3, No.103, 1990. p. 525-542.

COMINCINI, S.; LEONEI, P.; REDAELLI, L.; DE GIULI, L.; ZLLANG, Y.; FERRETI, L. Characterization of bovine microsatellites by silver staining. In: Journal of Animal Breeding and genetics, No. 112, 1995. p. 415 – 420.

CHARLESWORTH, B. Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability. In: Molecular Biology and Evolution., Vol. 15, 1998. p. 538-543.

DERGAM, J. A.; PAIVA, S. R.; SCHAEFFER, C. E.; GODINHO, Alexandre L. e VEIRA, F. Phylogeography and RAPD PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. In: Genet. Mol. Biol., Vol. 1, No. 25, 2002. p. 379-387.

\_\_\_\_\_. Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi and Paraná rivers. In: Genet. Mol. Biol., Vol. 21, No. 4, 1998. p. 496.

DE WOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. In: Journal of Fish Biology., Vol. 56. 2000. p. 461-473.

ESTEVEZ, F. A.; AMORIM, J. C. C.; CARDOSO, E. L. e BARBOSA, F. A. R. Caracterização limnológica preliminar da represa de Três Marias (MG) com base em alguns parâmetros ambientais básicos. Em: Ciencia e cultura., Vol. 37, No. 1, 1985. p. 608 – 617.

ESTOUP, A.; PRESA, P.; KRIEG, F.; VAIMAN, D. and GUYOMARD, R. (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellite: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). In: Heredity. Vol. 71. 1993. p. 488-496.

FERREIRA, Márcio Elias e GRATTAPAGLIA, Dario. Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el análisis genético. 1ª ed. Brasília: Embrapa – Cenargen., 1998. p. 220

FUTUYMA, Douglas Joel. Biologia Evolutiva. 2ª Ed. Riberão Preto, SBG/CNPq, 1992. p. 631

GARCÍA DE LEÓN, F. J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of Europe sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). In: Molecular Ecology., Vol. 6. 1997. p. 51 – 62.

GALHARDO, E. y TOLEDO FILHO, S. A. Estudo genético-bioquímico de pirapitinga do sul, *Brycon* sp da Estação da Paraibuna CESP, Em: Ciência e Cultura, vol. 39, 1987. p. 722.

GERY, J. Characoids of the World. TFH publications, Neptune city, In: New Jersey., 1977. p. 672.

GODINHO, Alexandre L. E. ¿Os peixes de Minas em 2010?. Em: Ciência Hoje., Vol. 16, No. 91, 1993. p. 49.

GODINHO, Hugo Pereira and GODINHO, Alexandre L. Fish communities in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. In: Acta Limnologica Brasiliensia., Vol. 5, 1994. p. 187-197.

GODINHO, Hugo Pereira. Fisheries management and conservation in southeastern Brazil: Current status and needs. In: Action before extinction – Conserving fish gametic diversity, An International Workshop. Vancouver, (Feb, 1998). p. 16-18.

GODOY, M. P. Locais de desovas de peixes num trecho do rio Mogi Guassu. Estado de São Paulo, Brasil. Em: Revista Brasileira de Biologia., Vol. 14, 1954. p. 375 – 396.

\_\_\_\_\_. Peixes do Brasil suborden characidae, Bacia do Rió Mogi Guassu. Vol. II. Peracicaba, SP. Ed. Franciscana., 1975. p. 219 – 397.

GOLDSTEIN, D. B. Et Al. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Em: Genetica., Vol. 139, No. 1, 1995. p. 471.

GOUDET J. FSTAT Version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. In: Journal Heredity., Vol. 86, 1995. pp, 486 – 486.

GRIFFITHS, ANTHONY J. F.; MILLER, JEFFREY H.; SUZUKI, DAVID T.; LEWONTIN, RICHARD C. y GELBART, WILLIAN M. Genética. Séptima Edición. McGRAW-HILL / Interamericana de España, S.A.U., 2002. p. 860.

HALDANE, J. B. S. A note on Fisher's theory of the origin of dominance and a correlation between dominance and linkage. In: Am. Nat., Vol. 64, 1930. p. 87–90.

HATANAKA, Terumi; HENRIQUE-SILVA, Flavio and GALETTI Jr, Pedro. A polymorphic, telomeric-like sequence Microsatellite in Neotropical fish *Prochilodus*. In: Cytogenet Genome Res., Vol. 98, 2002. p. 308 – 310.

HATANAKA, Terumi e GALETTI Jr., Pedro Manuel. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory fresh water fish species. In: Genet. Mol. Biol., Vol. 1, No. 26, 2003. p.19-25.

HARTL, D.L and CLACK, A. G. Principles of Population Genetics. Sunderlands: Sinauer Associates, Inc. 1997.

HEDRICK, P. W. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. In: Evolution., Vol. 53, 1999. p. 313-318.

HILSDORF, A. Biologia Molecular: Uma realidade para a Aqüicultura. Panorama da Aqüicultura (janeiro/fevereiro). 1997. p. 10-12.

HILSDORF, A. W. S.; AZEREDO-ESPIN, A M. L.; KRIEGER, M. H.; KRIEGER, J. E. Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Curvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. In: Aquaculture., No. 214, 2002. p. 81-91.

HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characidae). Bull. Br. Mus. In: Nat. Hist. (Zool.), Vol. 43, No. 1, 1982. p. 1-47.

HORN, M. H. Evidence for dispersal of fig seeds by the fruit-eating characid fish *Brycon guatemalensis* Regan in a Costa Rican tropical rain forest. In: *Oecologia.*, Vol. 109, 1997. p. 259-264.

KALINOWSKI, S. T. ¿How many alleles should be used to estimative genetic distances?. In: *Heredity.*, Vol. 88, 2002. 62-65.

JARNE, P., LAGODA, P. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree.*, Vol. 11, No. 10, 1996. p. 424 – 429.

KELLY, L.; POSTIGLIONI, A.; DE ANDRES, D. F.; GAGLIARDI, R.; BIAGETTI, Br.; FRANCO J. Variabilidad genética de los caballos criollos del Uruguay. *Archivo de medicina veterinaria.*, Vol. 34, No. 1, Valdivia. P. 2002.

KREBS, J. R. and DAVIES, N. B. *An Introduction to Behavioural Ecology.* Blackwell Scientific Publications. Oxford., 1996. p. 420.

LAHIRI, D. K. and NURNBERGER, J. I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. In: *Nucleic Acids Research.* No. 19, 1991. p. 5444.

LEWINSOHN, T. M. e PRADO, P. I. *Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento.* São Paulo: Editora Contexto. 2002.

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr, C. J.(Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America.* Ed EDIPUCRS. Porto Alegre, RS., 2003. p. 742.

LIMA, F. C. T. and CASTRO, R. M. C. *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). In: *Ichthyological Explorations of Freshwaters.*, Vol. 11, No. 2, 2000. p. 155-162.

LINS, L. V.; MACHADO, A. B. M.; COSTA, C. N. R. e HERMANN, G. *Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção: contendo a lista oficial de fauna ameaçada de Minas Gerais.* Belo Horizonte, Brasil: Fundação Biodiversitas, 1997. p. 55.

LOWE-MCCONNELL, R. H. *Fish communities in tropical freshwaters: their distribution, Ecology and Evolution.* London: longman., 1975. p. 337.

\_\_\_\_\_. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais.* São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999.

LUCENA, C. A. S. Estudio filogenético de la familia Characidae con una discusión de grupos naturales propuestos (Teleostei, Osthariophysi, Characiformes). São Paulo – SP, Tesis de doctorado. Instituto de biociências, universidad de São Paulo., 1993. p. 158.

MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F. e GALETTI JR., Pedro. Manuel. Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. In: Hydrobiologia., No. 527, 2004. p. 223-225,

MARGARIDO, Vladimir and GALETTI Jr., Pedro Manuel. Chromosome studies in fish of the genus Brycon (Characiformes, Characidae, Bryconidae). In: Cytobios., Vol. 85, 1996. p. 219-228.

MARTINS, Cesar; WASKO, Adriana Pinto; OLIVEIRA, Carla e FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. In: Genet. Mol. Biol., Vol. 26, No.1, 2003. p. 38.

MENDONÇA, J. O. J. e MELO, J. S. C. Introdução. I Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero Brycon. 1994. p. 1.

MIRANDA, M. O.; RIBEIRO, L. P.; ARANTES, F. S.; SIQUEIRA, A. M. e DINIZ, M. G. Diagnóstico do setor pesqueiro no estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil: Superintendência do Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE), 1988. p. 30.

MOREIRA, H.L.M. Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microsatélite. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999. p. 20 – 40.

MOYSÉS, C. B. e ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). In: Genet. Mol. Biol., Vol. 1, No. 25. 2002. p. 407

MULLIS, K. e FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. In: Methods Enzymol., No. 55, 1987. p. 350

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. In: Genetics., Vol. 89, 1978, p. 583-590.

\_\_\_\_\_. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY. 1987.

NIELSEN, E. E. and KENCHINGTON, E. Prioritizing marine fish and shellfish populations for conservation: ¿a useful concept?. *Fish and fisheries.*, Vol. 2, 2001. p. 328 – 343.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). Polución y degradación del ambiente. Disponible en internet: <http://www.fao.org/docrep/005/AC8675/AC867500.htm#Toc>.

O'REILLY, P. T.; CANINO, M. F.; BAILEY, K.M.; BENTZEN, P. Isolation of twenty low stutter di- and tetranucleotide microsatellites for population analyses of walleye Pollock and other gadoids. *In: Journal of Fish Biology.* Vol. 1, No. 50. 2000. p. 1074-1086.

ORTÍ, G. and MEYER, A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *In: Syst. Biol.*, Vol. 46, No.1, 1997. p. 100.

PAIVA, M. P. Grandes represas do Brasil. Brasília: EDITERRA, 1982. p. 192.

PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M. D.; BOOTON, G. and FUERST, P. A. What Molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *In: Ecology.*, Vol. 1, No. 79, 1998. p. 361-382.

PAVLOV, D.S. Structures assisting the migrations of non-salmonid fish: USSR. *FAO Fisheries Technical Paper.* 1989. p. 308.

PETRERE, M. River fisheries in Brazil: a review. *Regulated Rivers. Research and Management.* Vol. 4. 1989. p. 1 – 16.

PFEIFFER, A.; OLIVIERI, A.M. and MORGANTE, M. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* k.). *In: Genome.*, Vol. 40, 1997. p. 411-419.

PORTUGAL, L. P. S. Revisão sistemática do gênero *Triporthus* Cope (*Teleostei, Characiformes, Characidae*). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências de São Paulo., 1990.

PUBL. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa. Vol. 2, (jun. 2004). p. 27-37.

RASSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C. and TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis.* Vol. 12. 1991, p.113-118.

RAYMOND, M. Y ROUSET, F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact test and ecemenicism. In: Journal Heredity., Vol. 86, 1995. p. 249.

RIBEIRO, L. P. e MIRANDA, M. O. T. Localização de juvenis de surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) em lagoas marginais do rio São Francisco – Município de Januária/ MG. Superintendência do Desenvolvimento da Pesca – SUDEPE (Relatório), Belo Horizonte., 1990. p. 29.

RICHARD and TORPE. Infinite allele mutation model. 2001

RINQUELET, R. A. SR/5. Polución y Degradación del Ambiente con Referencia a la Acuicultura. En: Instituto de Limnología. La Plata. Argentina. 2005. p. 3.

SAKAMOTO, T., DANZMANN, R. G.; GHARBI, K.; HOWARD, P.; OZAKI, A.; KHOO, S. K.; WORAM, R. A.; OKAMOTO, N.; FERGUSON, M. M.; HOLM, L. E.; GUYOMARD, R. and HOYHEIM, B. A Microsatellite Linkage Map of Rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*).

SANCHES, Alexandra e GALETTI Jr., Pedro Manuel. Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação. In press

SAMBROOK, J. and RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. I, II, III, 3<sup>a</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SATO, Y. Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões. São Carlos: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de São Carlos, 1999. (Tese, Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais)., 1999. p. 179

SATO, Y. e GODINHO, Hugo Pereira. Peixes da bacia do Rio São Francisco. Em: Lowe-McConnell: Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Lugar: EDUSP., 1999. p. 407.

SATO, Y.; MIRANDA Mot; BAZZOLI N. e RIZZO E. Impacto do reservatório de Três Marias sobre a piracema à jusante da Barragem. Em: XI Encontro Brasileiro de Ictiologia. 1995. p. 2

SATO, Y. e OSÓRIO, F. M. F. A pesca profissional na região de três Marias, MG. Em: Anais do V Encontro Anual de Aqüicultura de Minas Gerais. Editorial,, 1986. p. 91.

SLATKIN, M. Hitchhiking and associate overdominance at a Microsatellite locus. In: Molecur Biology and evolution., No. 12, 1995. p. 473-480.

- SPRECHER, C. J.; PUERS, C.; LINS, A.M. SC and HUMM, J.W. General Approach to Analysis of Polymorphic Short Tandem Repeat Loci. In: Biotechniques., Vol. 20, 1996. p. 266-276.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. Biología Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Brasil. 2001. p. 192.
- SOUZA, A. B. Análise da variabilidade genética do surubim do São Francisco, *Pseudoplatistoma corruscans* (Pisces, Pimelodidae): Subsídios à conservação e ao cultivo da espécie. Tese de Doutorado-Universidade Federal de São Carlos, São Paulo., 2003. p. 148.
- STANSFIELD, WILLIAM D. Teoría y problemas de genética. Serie de compendios Schaum. Segunda edición. MCGRAW-HILL / interamericana de Mexico, S.A., 1990. p. 407.
- SYKES, B. As Sete Filhas de Eva. A ciência que revela nossa herança genética. Rio de Janeiro: Brasil. Record., 2003.
- TAKAHATA, N. Gene identity and genetic differentiation of populations in the finite island model. In: Genetics., Vol. 104, 1983. p. 497–512.
- TAUTZ, D. and RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. In: Nucl. Acids Res., Vol. 2, 1984. p. 4126-4138.
- TORRES, R. A. New frontiers in conservation biology: the era of the genome. In: The Braz. J. Nat. Conserv., Vol.1, No. 2, 2003. p. 62.
- UJ, A. Etude comparative de l'osteologie cranienne dos poissons de la famille des Characidae et son importance phylogenetique. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences de l'Université de Genève. 1990.
- VAL, L. A and ALMEIDA-VAL, M. F. Adaptative features of amazon fishes. Hemoglobins of Brycon cf. Cephalus and Brycon cf. Erythropterum (pisces). Revista Brasileira de Genética., Vol. 11, No. 1, 1998. p. 27 – 37.
- VARI, R. P. e. MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: An Overview. In: MALABARBA, L. R. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 603
- WASKO, Adriana Pinto e GALETTI Jr., Pedro Manuel. RAPD analysis in Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. In: Hydrobiologia., No. 474, 2002. p.137.

WEIR, B. S. And COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. In: *Evolution.*, Vol. 38, No. 1, 1984. 1358 – 1370.

WEITZMAN, S.H. The phylogenetic relationships of *Triportheus*, a genus of South American Characid fishes. *Stanford Ichthyological Bulletin.*, Vol. 7, No. 4, 1960. p. 239-244.

WELSH, J. e McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. In: *Nucl. Acids Res.*, Vol. 1, No.18, 1990. p. 7218

WIKIPEDIA FOUNDATION. ESTRUCTURA GENÉTICA. En: Wikipedia: La enciclopedia Libre. España. (Sitada el 3 de octubre de 2007). Disponible en Internet, URL: [http://es.wikipedia.org/wiki/Estructura\\_Genética](http://es.wikipedia.org/wiki/Estructura_Genética).

\_\_\_\_\_. En: Wikipedia: La enciclopedia Libre. España. (Sitada el 3 de octubre de 2007). Disponible en Internet, URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/Microsatélites>.

\_\_\_\_\_. En: Wikipedia: La enciclopedia Libre. España. (Sitada el 3 de octubre de 2007). Disponible en Internet, URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/PCR>.

WILLIAMS, J. G. K. ; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A. and TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. In: *Nucl. Acid. Res.*, Vol. 1, No.18, 1990. p. 6535.

WOYNAROVICH, E. The hydroelectric power plants and the fish fauna. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, Vol. 24, 1991. p. 2531-2536.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. In: *Ann Eugen.*, Vol. 15, No. 1, 1951. p. 323-354.

\_\_\_\_\_. *Evolution and the Genetics of Populations. The Theory of Gene Frequencies.* The University of Chicago Press, Chicago., vol. 2, 1969.

\_\_\_\_\_. *Evolution and the genetics of populations. VI. Variability within and among natural populations.* Univ. of Chicago Press, Chicago. 1978

\_\_\_\_\_. The shifting balance theory and macroevolution. In: *Annu. Rev. Genet.*, Vol. 16, 1982. p. 1–19.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. University of Alberta, 1999

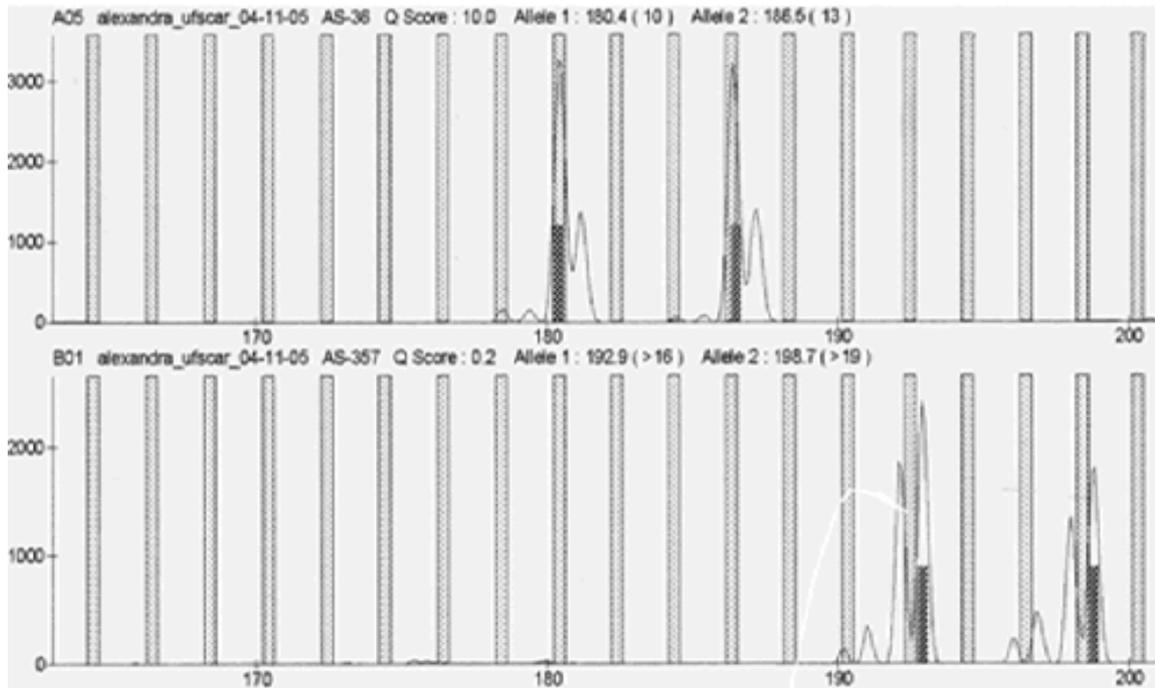
ZANATA, A. M. Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon* Müller & Troschel, 1844 (Characidae; Characiformes). Doctoral Thesis. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 2000. p. 358.

ZANE, L.; BARGELLONI, L. PATARNELLO, T. Strategies for microsatellites isolation: a review. In: Molecular Ecology., Vol. 1, No. 1, 2002. p. 1 – 16.

ZHENG, W.; STACEY, N.E.; COFFIN, J. and STROBECK, C. Isolation and characterization of microsatellite loci in the goldfish *Carassius auratus*. In: Mol. Ecol., Vol. 4, No.1, 1995. p. 791-792.

# ANEXOS

**ANEXO A. EL GENOTIPAJE DEL LOCUS BH6 A TRAVÉS DEL SECUENCIADOR PE BIOSYSTEMS, SE UTILIZO PRIMERS MARCADOS CON NED JUNTAMENTE CON PATRÓN ROX® GENE SCAN - 350.**



**ANEXO B. GELES DE POLIACRILAMIDA.**

**Figura 1: Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh8 (Monomorfico) en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.**



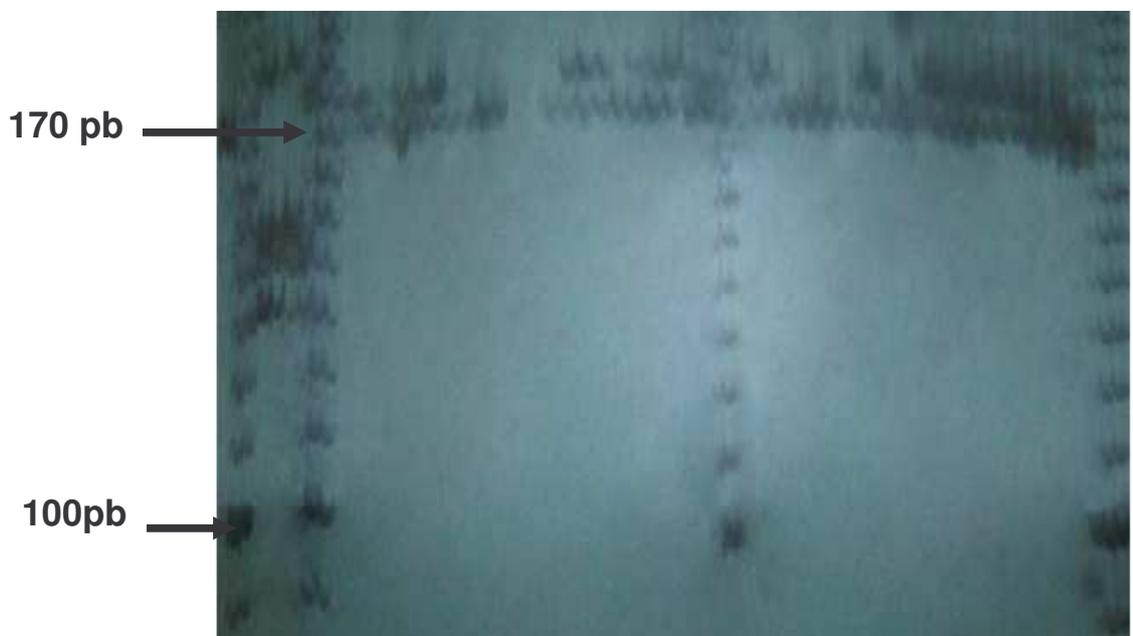
**Figura 2: Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh15 (Monomorfico) en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.**



**Figura 3: Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh5 en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.**



**Figura 4: Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh14 en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.**



**Figura 5: Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh16 en diferentes individuos de Brycon orthotaenia.**



**Figura 6: Perfiles producidos por las ampliaciones del locus Bh17 en diferentes individuos de Brycon orthotaenia**



**ANEXO C. MATRICES UTILIZADAS EN LOS DIFERENTES PROGRAMAS ESTADISTICOS.**

**1. Matriz utilizada en el programa GENEPOP.**

*Brycon orthotaenia*

Bh05					
Bh06					
Bh14					
Bh16					
Bh17					
Pop					
JA05,	208238	186190	167182	142148	204204
JA07,	208238	180180	167182	142148	204204
JA08,	208238	180196	167182	142151	205205
JA10,	208238	196218	167182	142151	204204
JA12,	208238	180180	167182	142148	204204
JA14,	204234	180198	167182	142145	204204
JA30,	208240	0	173173	133142	204204
JA31,	208240	200202	173173	133142	200200
JA33,	210240	0	173173	133142	200200
JA34,	0	182196	173182	133142	204204
JA35,	208240	186196	173182	133142	300300
JA37,	210240	0	173173	133145	205205
JA42,	210240	190200	173182	133142	195195
JA46,	212242	192220	173173	133142	195195
JA48,	210240	196196	173173	133142	200200
Pop					
CA18,	204234	190190	173182	142145	204204
CA19,	208238	190212	173182	142145	204204
CA20,	210240	196204	173182	142151	204204
CA21,	208240	182188	173182	133139	204204
CA23,	210240	196196	173182	133142	200200
CA24,	210240	180188	173173	133148	200200
CA25,	208238	0	173173	133145	200200
CA26,	212242	180204	173182	133145	200200
CA27,	206236	180190	173182	133142	200200
CA28,	206236	0	173173	133142	205205
CA36,	210240	180186	173173	133145	204204
CA38,	210240	200220	173182	133151	204300
CA39,	204234	0	173182	133142	204204
CA40,	204234	192204	173182	133142	195195
CA41,	204234	190192	173173	133142	195195
CA43,	208240	190196	173182	133151	200200
CA44,	212244	196202	173182	133142	200200

Pop					
JB22,	210240	196204	173182	133139	205205
JB357,	208240	192198	173173	133145	195195
JB358,	208240	180220	173173	133145	195195
JB359,	208240	196204	173173	133145	195195
JB360,	206236	186200	173173	133142	195195
JB361,	206236	196202	173182	133142	195195
JB362,	206236	196202	173182	133148	195195
JB363,	206236	190192	173182	133142	195195
JB364,	204204	196196	173182	133148	200200
JB365,	206206	198218	173182	133142	195195
JB366,	206240	196198	173182	133142	195195
JB367,	210244	190190	0	133145	195195

## 2. Matriz utilizada en el programa FSTAT.

Brycon orthotaenia

Bh05

Bh06

Bh14

Bh16

Bh17

pop	5	6	14	16	17	
JA05,	208238	186190	167182	142148	204204	
JA07,	208238	180180	167182	142148	204204	
JA08,	208238	180196	167182	142151	205205	
JA10,	208238	196218	167182	142151	204204	
JA12,	208238	180180	167182	142148	204204	
JA14,	204234	180198	167182	142145	204204	
JA30,	208240	000000	173173	133142	204204	
JA31,	208240	200202	173173	133142	200200	
JA33,	210240	000000	173173	133142	200200	
JA34,	000000	182196	173182	133142	204204	
JA35,	208240	186196	173182	133142	300300	
JA37,	210240	000000	173173	133145	205205	
JA42,	210240	190200	173182	133142	195195	
JA46,	192220	173173	133142	195195		
JA48,	210240	196196	173173	133142	200200	
pop						
CA18,	204234	190190	173182	142145	204204	
CA19,	208238	190212	173182	142145	204204	
CA20,	210240	196204	173182	142151	204204	
CA21,	208240	182188	173182	133139	204204	

CA23,	210240	196196	173182	133142	200200
CA24,	210240	180188	173173	133148	200200
CA25,	208238	000000	173173	133145	200200
CA26,	212242	180204	173182	133145	200200
CA27,	206236	180190	173182	133142	200200
CA28,	206236	000000	173173	133142	205205
CA36,	210240	180186	173173	133145	204204
CA38,	210240	200220	173182	133151	204300
CA39,	204234	000000	173182	133142	204204
CA40,	204234	192204	173182	133142	195195
CA41,	204234	190192	173173	133142	195195
CA43,	208240	190196	173182	133151	200200
CA44,	212244	196202	173182	133142	200200
Pop					
JB22,	210240	196204	173182	133139	205205
JB357,	208240	192198	173173	133145	195195
JB358,	208240	180220	173173	133145	195195
JB359,	208240	196204	173173	133145	195195
JB360,	206236	186200	173173	133142	195195
JB361,	206236	196202	173182	133142	195195
JB362,	206236	196202	173182	133148	195195
JB363,	206236	190192	173182	133142	195195
JB364,	204204	196196	173182	133148	200200
JB365,	206206	198218	173182	133142	195195
JB366,	206240	196198	173182	133142	195195
JB367,	210244	190190	000000	133145	195195

### 3. Matriz utilizada en el programa TFPGA.

1, 0308,0305,0103,0305,0303  
1, 0308,0101,0103,0305,0303  
1, 0308,0107,0103,0306,0404  
1, 0308,0713,0103,0306,0303  
1, 0308,0101,0103,0305,0303  
1, 0106,0108,0103,0304,0303  
1, 0309,0000,0202,0103,0303  
1, 0309,1010,0202,0103,0202  
1, 0409,0000,0202,0103,0202  
1, 0000,0207,0203,0103,0303  
1, 0309,0307,0203,0103,0505  
1, 0409,0000,0202,0104,0404  
1, 0409,0509,0203,0103,0101  
1, 0510,0614,0202,0103,0101  
1, 0409,0707,0202,0103,0202

2, 0106,0505,0203,0304,0303  
2, 0308,0512,0203,0304,0303  
2, 0409,0711,0203,0306,0303  
2, 0309,0204,0203,0102,0303  
2, 0409,0707,0203,0103,0202  
2, 0409,0104,0202,0105,0202  
2, 0308,0000,0202,0104,0202  
2, 0510,0111,0203,0104,0202  
2, 0207,0105,0203,0103,0202  
2, 0207,0000,0202,0103,0404  
2, 0409,0103,0202,0104,0303  
2, 0409,0914,0203,0106,0305  
2, 0106,0000,0203,0103,0303  
2, 0106,0611,0203,0103,0101  
2, 0106,0506,0202,0103,0101  
2, 0309,0507,0203,0106,0202  
2, 0511,0710,0203,0103,0202  
3, 0409,0711,0203,0102,0404  
3, 0309,0608,0202,0104,0101  
3, 0309,0114,0202,0104,0101  
3, 0309,0711,0202,0104,0101  
3, 0207,0309,0202,0103,0101  
3, 0207,0710,0203,0103,0101  
3, 0207,0710,0203,0105,0101  
3, 0207,0506,0203,0103,0101  
3, 0101,0707,0203,0105,0202  
3, 0202,0813,0203,0103,0101  
3, 0209,0708,0203,0103,0101  
3, 0411,0505,0000,0104,0101  
0, 0000,0000,0000,0000,0000