

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE DOS POBLACIONES DE
PECES CURIMBATÁ (*Prochilodus lineatus*) MEDIANTE MARCADORES
MOLECULARES MICROSATÉLITES**

LIDIA DEL SOCORRO PINTA RODRÍGUEZ

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO, COLOMBIA
2007**

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE DOS POBLACIONES DE
PECES CURIMBATÁ (*Prochilodus lineatus*) MEDIANTE MARCADORES
MOLECULARES MICROSATÉLITES**

LIDIA DEL SOCORRO PINTA RODRÍGUEZ

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

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

**Codirector:
CARLOS SOLARTE PORTILLA
Zoot, PhD**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO, COLOMBIA
2007**

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

Artículo 1º del acuerdo N° 324 del 11 de octubre de 1996, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

PEDRO MANOEL GALETTI JUNIOR
Director

CARLOS SOLARTE PORTILLA
Codirector

ALVARO JAVIER BURGOS ARCOS
Jurado delegado

HERMAN JAVIER LÓPEZ ERASO
Jurado

San Juan de Pasto, 14 de noviembre de 2007.

Dedico a:

Dios por darme la fortaleza para enfrentar las adversidades de la vida y llevarme siempre por buen camino.

A mis padres Juan y Amalia, quienes me enseñaron a luchar siempre ante cualquier dificultad para salir adelante y a llegar siempre a la meta, a mis hermanos Cristina y Fabián por su apoyo incondicional para cumplir este sueño, a mis hermanos, Mauricio, Noraida, Juan Pablo, Milena, Lucia y Francisco, por su amistad, su apoyo y la compañía que me brindan día a día, a mis sobrinos Laura Andrea, Andrés Francisco, Juana Sofía e Isabel Alejandra, por ser una nueva inspiración y por brindar alegría espontánea todos los días.

Lidia Pinta

“Já ancorado na Antártida, ouvi ruídos que pareciam de fritura, pensei: “será que até aqui existem chineses fritando pasteis?”. Eram cristais de água dose congelada que faziam aquele som quando entravam em contato com a água salgada. O efeito visual era belíssimo. Pensei fotografar, mais fale para mim mesmo: “Calma, você terá muito tempo para isso...” Nos 367 dias que seguiam o fenômeno não se repetiu. “Algumas oportunidades são únicas. Como diz o Dalai lama: “Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito. Um se chama “Ontem” e o outro “Amanha”, portanto hoje e o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”.

Amyr Klínk

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Pedro Manoel Galetti Junior	Biol., Ph.D. Docente de Graduación y Post-graduación 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.
Luis Fernando Carvalho Costa	Biol., M.Sc, Dr.Sc (c). Estudiante de doctorado del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos. Brasil.
Alexandra Sanches	Biol., M.Sc, Dr.Sc Estudiante de Postdoctorado, Universidad Estatal Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
Alvaro Burgos Arcos	Zoot., M.Sc. Profesor del programa de Ingeniería en producción Acuícola, Universidad de Nariño.
Herman Javier López Erazo	Zoot., I.S., Esp. Profesor del programa de Ingeniería en producción Acuícola, Universidad de Nariño.
Marco Antonio Imuez Figueroa	Zoot., Esp. Profesor programa de ingeniería en producción acuícola, Universidad de Nariño
Priscila Pini Zenati	Biol., M.Sc, Dr.Sc (c). Estudiante de doctorado Universidad Estatal de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Patrícia Domingues de Freitas	Biol., Dr.Sc. Docente de Graduación y Post-graduación 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 doctorado del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos. Brasil.
William Orlando Burgos Paz	Zoot. Operativo técnico, programa de mejoramiento genético. Universidad de Nariño.
Janeth Derazo	Ingeniera en Producción Acuícola (c).
Mauricio Carillo Avila	Biol. Marino, M.Sc, Dr.Sc. (c). Estudiante de doctorado del departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de São Carlos. Brasil.
Luis Alfonso Solarte Portilla	Secretario Académico Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño.
Lucy Piedad Mejia Santacruz	Secretaria Programa de Ingeniería en Producción Acuícola, Universidad de Nariño.
Oscar Mejia Santacruz	Economista, Universidad de Nariño

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

A todas las personas que estudian y laboran en el laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética de la Universidad Federal de São Carlos.

De manera muy especial a Hernán Darío Cerón M., Ana Maria Ayala B. y Paola Andrea Ayala B., por su amistad.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	24
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GENERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
4. MARCO TEÓRICO	28
4.1 ASPECTOS GENERALES DE LA FAMILIA PROCHILODONTIDAE	28
4.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS DEL CURIMBATÁ <i>Prochilodus lineatus</i>	31
4.2.1 Clasificación taxonómica	31
4.2.2 Ecología	31
4.2.3 Descripción	31
4.2.4 Biología	32
4.2.5 Importancia	33
4.3 USO DE MARCADORES MOLECULARES EN ESTUDIOS DE PECES NEOTROPICALES	33
4.4 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA MIGRACIÓN DE PECES DE AGUA DULCE	34
4.4.1 Río Mogi-Guaçu	35
4.5 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	36
4.6 ELECTROFORESIS	37
4.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR	38
4.8 CARACTERIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE SECUENCIAS DE DNA SATELITE	39
4.9 MARCADORES MICROSATÉLITES	41
4.10 ESTRUCTURA DE POBLACIONES	44
4.11 GENÉTICA DE POBLACIONES	46
4.11.1 Variabilidad genética	47
4.11.2 Factores de evolución	48
4.11.3 Concepto de población	50
4.11.4 Frecuencia génica en poblaciones	51
4.11.5 Ley de Hardy Weinberg	51
4.11.6 Heterocigosidad	53
4.11.7 Consanguinidad	54

	Pág.	
4.11.8	Índice de fijación de Wright	55
4.11.9	Estructura genética	55
4.11.10	Flujo génico y estructura poblacional	56
5.	DISEÑO METODOLÓGICO	57
5.1	LOCALIZACIÓN	57
5.1.1	Laboratorio	57
5.1.2	Estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas	57
5.1.3	El río Mogi-Guaçu en la región de la cascada de Emas, Pirassununga, SP.	59
5.2	MATERIAL BIOLÓGICO	59
5.3	TÉCNICAS DE LABORATORIO	61
5.3.1	Extracción de DNA de tejidos sólidos	61
5.3.2	Cuantificación de DNA genómico	62
5.3.3	Reacción de PCR para marcadores microsatélites	62
5.4	GENOTIPADO DE LOCUS MICROSATELITES	66
5.4.1	Electroforesis en gel de agarosa 1%	66
5.4.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida, tinción con nitrato de plata	67
5.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	72
5.6	FORMULACIÓN DE HIPOTESIS	73
5.7	VARIABLES EVALUADAS	73
5.7.1	Frecuencias alelicas	73
5.7.2	Heterocigosidad	73
5.7.3	Estadísticos f de wright	74
5.7.4	Distancia e identidad genética	75
6.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76
6.1	VARIABILIDAD GENÉTICA INTRA POBLACIONAL	76
6.1.1	Frecuencias alelicas	80
6.1.2	Equilibrio de Hardy Weinberg	84
6.1.3	Heterocigosidad	86
6.2	VARIABILIDAD GENÉTICA INTER POBLACIONAL	89
6.2.1	Coeficiente de endogamia F_{IS}	89
6.2.2	Índice de Fijación F_{ST}	91
6.3	DISTANCIA E IDENTIDAD GENÉTICA	92
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	95
7.1	CONCLUSIONES	95
7.2	RECOMENDACIONES	96
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	97
	ANEXOS	107

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Descripción del ciclo de PCR para cada loci estudiado y temperatura de hibridación de los primers.	63
Tabla 2.	Descripción de los loci microsatélites, secuencias de los primers y amplitud alélica.	65
Tabla 3.	Número de alelos por locus y por población para los seis loci microsatélites analizados.	78
Tabla 4.	Descripción del número de individuos analizados por locus, numero de alelos por locus y numero de alelos exclusivos por locus para las dos poblaciones.	79
Tabla 5.	Heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) para las dos poblaciones de <i>Prochilodus lineatus</i> .	85
Tabla 6.	Coeficiente de endogamia F_{IS} para las dos poblaciones y para los loci juntos.	87
Tabla 7.	Valores de p usando el test de probabilidad de Raymond y Rousset mediante el método de cadena de Markov para la verificación del Equilibrio de Hardy Weinberg.	90
Tabla 8.	Índice de fijación F_{ST} para las dos poblaciones y para los loci juntos.	91

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Foto del departamento de Genética y Evolución (A) y el Laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética (B).	57
Figura 2. Foto de los estanques de cultivo (A) y de los estanques de hipofización de la piscicultura de Furnas (B).	58
Figura 3. Fotos de la cascada de Emas en el río Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP.	59
Figura 4. Localización de los lugares de colecta, la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas y el río Mogi-Guaçu.	60
Figura 5. Ejemplar de <i>Prochilodus lineatus</i> .	60
Figura 6. Transiluminador y sistema de fotodocumentación Edas 290, Kodak.	62
Figura 7. Termociclador modelo PTC 100.	64
Figura 8. Preparación de la reacción de PCR.	64
Figura 9. Aplicación de las muestras en gel de agarosa 1% para verificar amplificación.	66
Figura 10. Fragmentos amplificados mediante reacción de PCR para el locus Pc04 de las muestras de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas donde se evidencia el polimorfismo de este locus.	67
Figura 11. Cámara vertical para electroforesis en gel de poliacrilamida	69
Figura 12. Fragmentos amplificados mediante reacción de PCR para el locus Pc04 de las muestras de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas, en gel de poliacrilamida.	71

	Pág.
Figura 13. Cuantificación de DNA en gel de agarosa 0.8% de las muestras de <i>Prochilodus lineatus</i> provenientes de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas.	76
Figura 14. Loci amplificados mediante reacción de PCR que no se incluyeron en el análisis	77
Figura 15. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus Pc04	80
Figura 16. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus Pc07	81
Figura 17. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus Pc14	81
Figura 18. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus Pc17	82
Figura 19. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus PI	83
Figura 20. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus Plin	83
Figura 21. Dendrograma construido usando el agrupamiento UPGMA con la distancia original de Nei.	93

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Matriz de datos para los análisis mediante el programa GENEPOP	108
Anexo B. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus Pc04 de las dos poblaciones estudiadas.	110
Anexo C. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus Pc07 de las dos poblaciones estudiadas.	111
Anexo D. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus Pc14 de las dos poblaciones estudiadas.	112
Anexo E. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus Pc17 de las dos poblaciones estudiadas.	113
Anexo F. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus PI de las dos poblaciones estudiadas.	114
Anexo G. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus Plin de las dos poblaciones estudiadas.	115

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados
dNTPs: Desoxirribonucleótidos
EDTA: Ácido etilendiamino tetra acético
Ha: Hectárea = 10000 m²
Kg: Kilogramo
Km: Kilómetro
Km²: Kilómetro cuadrado
KCl: Cloruro de potasio
M: Molar
mg: Miligramo
MgCl₂: Cloruro de Magnesio
min: Minuto
ml: Mililitro
mM: Milimolar
μl: Microlitro = 10⁻⁶ L
NaCl: Cloruro de sodio
ng: Nanogramo = 10⁻⁹ gramos
pb: Pares de bases
pH: Potencial de Hidrogeniones
pmol: Picomolar
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm: Revoluciones por minuto
s: Segundos
SDS: Sulfato duodecil de sodio
TE: Tris-HCL + EDTA
Tris-HCL: Tris ácido clorhídrico
v: Voltios

GLOSARIO

ADN MICROSATÉLITE: Tipo de ADN con repeticiones muy cortas, entre uno y seis bases, tales como dinucleótidos, trinucleótidos o tetranucleótidos.

ADN POLIMERASA: Enzima capaz de sintetizar nuevas cadenas de ADN a partir de un ADN patrón.

ADN SATÉLITE: Repetición de alta frecuencia, desde 1000 hasta más de 100,000 copias de una unidad de repetición, comúnmente de 100 a 300 pares de bases, que se presenta en algunos loci del genoma.

ALELO: Una de las formas alternas de un gen existente en un locus.

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.

CODOMINANCIA: En biología molecular, situación en que un individuo heterocigótico exhibe dos bandas correspondientes a ambos alelos de un gen específico.

CODOMINANCIA: 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.

DERIVA GENÉTICA: Fuerza que puede cambiar la frecuencia génica y que se conoce como, chance, azar, proceso dispersivo o deriva genética, los cambios son el resultado de un proceso de muestreo en una población de tamaño limitado, solamente se puede predecir en magnitud pero no en dirección

DESNATURALIZACIÓN: Separación de las dos cadenas de la doble hélice del ADN, o ruptura severa de una molécula compleja sin que se destruyan los enlaces principales de sus cadenas.

DNA: Acido desoxirribonucleico, cadena doble de nucleótidos unidos entre sí. Molécula fundamental en la transmisión de los genes.

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

FLUJO GÉNICO: Intercambio de genes entre poblaciones diferentes aunque, por lo regular, con alguna relación.

FRECUENCIA ALÉLICA: Abundancia o escasez relativa de un gen respecto a su alelo o alelos

GEN: Unidad básica, tanto física como funcional, de la herencia, que transmite información de una generación a la siguiente. Es un segmento de ADN que incluye una sección transcrita y un elemento regulador que permite su transcripción.

GENOTIPO: Composición específica de alelos de toda la célula o, más comúnmente, de determinado gen o de un conjunto de genes.

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

HAPLOTIPO: Constitución genética de un cromosoma individual, se puede referir a un solo locus o a un genoma completo.

HIBRIDACIÓN: En biología molecular, la unión de secuencias complementarias de ADN y/o de ARN.

HOMÓLOGO: Correspondiente o similar en estructura, posición u origen.

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

LOCUS (PL. LOCI): Sitio específico de un cromosoma donde está localizado un gen, trozo definido de ADN.

MARCADOR: Ubicación física identificable en un cromosoma cuya herencia puede rastrearse.

MARCADOR GENÉTICO: 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.

MARCADOR MOLECULAR: Todo y cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen.

NUCLEÓSIDO: Base nitrogenada unida a una molécula de azúcar.

NICLEÓTIDO: Molécula compuesta por una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato; se trata del elemento estructural básico de los ácidos nucleicos.

PAR DE BASES: Las dos bases de nucleótidos que están situadas en diferente cadena de una molécula de ácido nucleico y que se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno. Las bases pueden emparejarse de dos maneras: adenina con timina en el ADN o con uracilo en el ARN, y guanina con citosina en ADN y ARN.

PAR DE GENES HETEROCIGÓTICO: Par de genes que tiene dos alelos diferentes en los dos cromosomas de un individuo diploide; por ejemplo, Aa o A1A2.

PAR DE GENES HOMOCIGÓTICO: Par de genes en que hay alelos idénticos en ambas copias del cromosoma; por ejemplo, AA o aa.

PATRÓN: Molécula que sirve como modelo para sintetizar otra molécula; por ejemplo, una molécula de ADN de cadena simple puede usarse como plantilla para sintetizar la cadena de nucleótidos complementaria.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Método para amplificar una secuencia de ADN en grandes cantidades mediante una polimerasa estable al calor y con cebadores apropiados, los cuales dirigen la amplificación de la región del ADN que interesa.

POLIMERASA: Término genérico para los enzimas que llevan a cabo la síntesis de un ácido nucleico, usando un patrón de ácido nucleico pre-existente y los nucleótidos apropiados, ribonucleótidos para el ARN y desoxiribonucleótidos para el ADN.

POLIMORFISMO: Aparición de diferentes formas asociadas con diversos alelos de un mismo gen.

RECURSOS GENÉTICOS: Genes que se encuentran en plantas y animales y que tienen un valor real o potencial para los seres humanos.

REGIONES FLANQUEANTES: Secuencias de ADN que se extienden a uno y otro lado de un gen, segmento de DNA con secuencia conocida.

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

SECUENCIAR: Determinar el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN o de ARN, o el orden de los aminoácidos en una proteína.

RESUMEN

Para el análisis de esta especie fueron evaluadas muestras de DNA tomadas del banco de DNA del Laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética de la Universidad Federal de San Carlos, SP, Brasil. Estas muestras fueron extraídas a partir de hígado y aletas de individuos de la especie *Prochilodus lineatus* provenientes de la cascadas de Emas, en el río Mogi-Guaçu, municipio de Pirassununga, SP y de la Estación de Hidrobiología y Piscicultura de la Hidroeléctrica de Furnas, MG.

Fueron evaluadas un total de 64 muestras de DNA; 32 de cada población. La metodología usada para esta evaluación fue la amplificación vía PCR de las regiones microsátélites a partir del DNA genómico usando primers complementarios a las secuencias únicas que flanquean los microsátélites. La detección de amplificación vía PCR se hizo en geles de electroforesis, utilizando agarosa. La observación de las bandas se hizo por coloración con bromuro de etidio; además se elaboraron geles de poliacrilamida basados en tinción con nitrato de plata con el fin de realizar el genotipado directamente sobre este gel.

Para esta evaluación fueron usados un total de seis primers, de los cuales, dos primers fueron diseñados para la especie *Prochilodus lineatus* y cuatro primers fueron descritos para la especie *Prochilodus costatus*, estos primers, fueron evaluados anteriormente en cada una de estas especies, mostrando polimorfismo.

El análisis estadístico fue realizado mediante la utilización de software como: GENEPOP, TFGA y FSTAT, además fue necesaria la utilización del software STATISTICA para evaluar la significancia de algunos datos obtenidos.

Se amplificó un total de diez loci microsátélites de los cuales seis amplificaron satisfactoriamente, dos no presentaron amplificación y dos no exhibieron polimorfismo, por lo tanto el porcentaje de loci polimórficos fue del 60%.

Para los seis loci analizados fue posible distinguir un total de ochenta y cuatro alelos, de los cuales cincuenta y tres fueron encontrados en la población de la Estación de Hidrobiología y Piscicultura de Furnas, y de estos el 28.30% son alelos exclusivos de esta población; en la población de Mogi-Guaçu se encontraron sesenta y cuatro alelos, y el 44.93% de estos son alelos exclusivos.

La heterocigosidad esperada varió, de 0.1724 en la población de Mogi-Guaçu a 0.8125 en población de la Estación de Hidrobiología y Piscicultura de Furnas, de esta manera la población de cultivo es la que presentó los valores más altos de heterocigosidad observada.

El valor medio del coeficiente de endogamia F_{IS} indico que las dos poblaciones presentan déficit de heterocigotos, debido a los apareamientos no aleatorios lo cual puede ser la causa de de los desvíos del equilibrio de Hardy Weinberg que se encontraron en esta investigación.

El índice de fijación F_{ST} mostró que las poblaciones tienen una moderada diferenciación, sin embargo no tienen una estructuración genética definida y son poblaciones que comparten genes por causa del elevado flujo génico ocasionado por la captura de reproductores del medio natural para ser reproducidos artificialmente en la Estación de Hidrobiología y Piscicultura de Furnas, con fines de repoblamiento.

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 FIS 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 FST 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 adecuada explotación de los recursos pesqueros requiere de seguimiento y acompañamiento. El abuso en la explotación de estos recursos naturales puede provocar la disminución de la variabilidad genética en las poblaciones y en ocasiones hasta el desaparecimiento de las especies existentes en un determinado lugar, tanto por el volumen de las capturas, como por el impacto causado por factores como el cambio de las condiciones ambientales del medio natural provocado por la construcción de barreras que impiden el desarrollo del ciclo de vida normal de las especies.

En Brasil, el cambio de las condiciones ambientales provocado por la construcción de represas esta afectando a las especies existentes en el curso de los ríos, especialmente a las especies migradoras como el *Prochilodus lineatus* que es una especie de importancia económica en el interior del Brasil, debido a su facilidad de cultivo y abundancia en ríos y ambientes naturales además por su alto índice de biomasa y captura en los ríos Mogi-Guaçu, Grande y Pardo. Estos peces migradores, nadan largas distancias río arriba, antes del periodo del inicio de las lluvias en la época de desove; por lo tanto la construcción de represas impide el desarrollo del ciclo normal de reproducción lo cual afecta a la supervivencia de estas especies.

La estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas fue creada a partir de la construcción de la represa de la hidroeléctrica de Furnas, con el objetivo de contribuir con la conservación de las especies de peces existentes en el curso del río Grande, principalmente las especies migradoras afectadas por la construcción de esta barrera. En esta estación se mantiene algunas especies de peces, las cuales se reproducen artificialmente en cautiverio, tomando también animales del medio natural para evitar problemas de consanguinidad; posteriormente los alevinos producidos son usados en programas de repoblamiento con el fin de aumentar la actividad pesquera y evitar el desaparecimiento de estas especies.

Sin embargo la adaptación de cualquier organismo a ambientes de cultivo, cuando se hace a través de la selección, puede causar la pérdida de variabilidad genética, ya que se mantiene ambientes estandarizados y el medio tiende a uniformizar genéticamente la población, eliminando los polimorfismos que surgen por causa de las mutaciones. En cambio en condiciones naturales además de las posibilidades de dispersión, las poblaciones están sometidas a cambios ambientales, lo cual facilita la adaptación de nuevos genotipos; teniendo en cuenta que la supervivencia de una especie o población depende, en gran parte, de su variabilidad genética, la cual esta íntimamente relacionada con el número de individuos utilizados como reproductores y el nivel de heterocigosidad existente entre ellos.

La utilización de técnicas de biología molecular en estudios de poblaciones naturales y cultivadas de peces; han aumentado intensamente en los últimos años, lo cual está permitiendo la exploración de la variabilidad genética de poblaciones de peces de diferentes especies, con lo que se abre un nuevo horizonte para el conocimiento de los recursos naturales existentes en la naturaleza, buscando la realización de planes de manejo para la conservación de especies naturales y cultivadas, por medio del conocimiento de su estructura poblacional, pues antes de iniciar un cultivo es imprescindible que se conozca la variabilidad genética de la población fundadora.

En este estudio fueron evaluadas dos poblaciones de peces *Prochilodus lineatus*, una de origen natural, con muestras tomadas en la cascada de Emas en el río Mogi-Guaçu y otra de cultivo, analizando individuos provenientes de la Estación de Hidrobiología y Piscicultura de Furnas, el objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad genética existente entre y dentro de las poblaciones; la evaluación se desarrolló mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites usando seis primers; dos primers aislados para esta especie, y cuatro primers descritos para la especie *Prochilodus costatus* con la finalidad de comparar los resultados obtenidos al evaluar las poblaciones con dos primers y los resultados obtenidos al evaluarlas con seis primers.

1. DEFINICION Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Los estudios biológicos de la ictofauna brasileña, tendientes a una selección de las especies de mayor interés económico para el desarrollo de una piscicultura racional se iniciaron en el año 1927 en los márgenes del río Mogi-Guaçu, en Pirassununga, estado de São Paulo, estos estudios tenían como finalidad la selección de especies nativas que, en la práctica de la piscicultura intensiva y extensiva, pudieran sustituir con ventaja el incremento del cultivo de la carpa *Cyprinus Carpio*, que se hacía en gran escala en la región sur del Brasil.

Una de las especies estudiadas inicialmente fue el curimbatá *Prochilodus lineatus* (*scrofa*), debido a características como, el sabor de su carne y su régimen alimentario iliófago. Sin embargo una de los principales problemas que se presentaron fue la reproducción, ya que los peces brasileños de aguas corrientes, principalmente los de mayor valor económico y deportivo tenían hábito migratorio, de amplitud no bien definida y maduración rápida de las gónadas y consiguiente desove, directamente influenciados por factores del medio. La posterior reproducción con la utilización de hipofisis de peces tuvo como fin el repoblamiento artificial de peces nativos de los ríos.

Más adelante en 1969 la demanda de energía eléctrica y el establecimiento de plantas hidroeléctricas sucesivas en un mismo cauce fluvial y teniendo en cuenta que en la actualidad existen 300 represas construidas con fines energéticos, la Superintendencia para el Desarrollo de la Pesca, del Ministerio de Agricultura, en 1971 estableció la norma mediante la cual los propietarios o concesionarios de represas en cursos de agua tomen medidas de protección para la fauna y la práctica de una piscicultura de repoblamiento con miras a la preservación de la ictiofauna regional mediante la construcción de Estaciones o Puestos regionales de hidrobiología y piscicultura.

Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado diversos trabajos de investigación mediante marcadores moleculares genéticos, con el objetivo, de evaluar la eficiencia de las medidas tomadas por las estaciones de hidrobiología y piscicultura, con relación a la preservación de los patrimonios genéticos existentes en la fauna acuática afectada por la construcción de las represas.

Estos estudios, mediante marcadores moleculares, son importantes para conocer la variabilidad genética existente entre y dentro de las poblaciones de peces e igualmente permiten establecer las diferencias o similitudes genéticas existentes entre ellas. De esta manera entre los marcadores moleculares usados en estudios de variabilidad genética, los microsatélites se constituyen en una herramienta bastante informativa que posibilita cuantificar la variabilidad genética existente y

de esta manera plantear estrategias, para desarrollar programas de conservación o mejoramiento genético de las especies estudiadas.

La aplicación de la técnica de microsatélites en el estudio de la variabilidad genética de poblaciones de peces del género *Prochilodus* ha sido usada en los últimos años con mayor frecuencia y con buenos resultados en el estudio de la estructura de poblaciones naturales de estos peces.

Los marcadores microsatélites, en la especie *Prochilodus lineatus*, fueron usados para evaluar la variabilidad genética de dos poblaciones de peces, una natural del río Mogi- Guaçu y otra de cultivo de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas; en la cual se usaron dos primers para la evaluación, la información producida por estos dos primer, no permitió con alta confiabilidad determinar la variabilidad, lo cual indicó la necesidad de ampliar el número de primers para la evaluación de estas poblaciones.

Los resultados de la presente investigación, permitirán confirmar o no los resultados obtenidos en la anterior investigación; adicionalmente, permitirán, fortalecer el concepto de la transferencia y uso de primers heterólogos entre especies relacionadas; en este caso, de la especie *Prochilodus costatus* en la evaluación de la variabilidad genética de *Prochilodus lineatus*, también servirán como base para el planteamiento y desarrollo de planes de manejo de las poblaciones de peces existentes en los ríos y estaciones de cultivo para evitar la pérdida de variabilidad genética que afecte la estructura de las poblaciones.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿La utilización de un mayor número de primers respecto a estudios anteriores de marcadores microsatélites, para determinar la variabilidad genética de dos poblaciones de peces *Prochilodus lineatus*, permite establecer con mayor confiabilidad la existencia de mayor variabilidad genética en una población de cultivo?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variabilidad genética de dos poblaciones de *Prochilodus lineatus*, una salvaje y otra de cultivo, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las frecuencias de los alelos en las poblaciones.
- Determinar polimorfismo entre y dentro de las dos poblaciones.
- Establecer el equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de cada una de las poblaciones.
- Evaluar el coeficiente de endogamia (F_{IS}) y el índice de fijación (F_{ST}) como medidas de diferenciación genética.

4. MARCO TEÓRICO

La íctiofauna neotropical de agua dulce es en biodiversidad la más rica del mundo. Se estima que existen en esta región cerca de ocho mil especies, de las cuales apenas seis mil, aproximadamente están descritas¹. Reis, et al.² hacen una estimativa de su diversidad, sugiriendo la existencia de cerca de seis mil especies de peces en esta región, mientras que el estimativo para el mundo alcanza un total de trece mil especies. En la región neotropical son encontradas setenta y un familias, en un total de cuatro mil cuatrocientas setenta y cinco especies validas y cerca de mil quinientas cincuenta especies de peces aun no descritas.

Uno de los ordenes, mas importantes, los Characiformes, presentan considerable importancia ecológica por su abundancia³, así como por participar expresivamente en la economía pesquera de la región y por poseer una variada especialización ecológica evidenciada por los diversos tamaños, formas y hábitos alimenticios de sus especies. Los Characiformes son un buen ejemplo de la complejidad de los patrones evolutivos frecuentemente vistos en la fauna tropical y subtropical, pues su confinamiento en hábitat exclusivamente de agua dulce, los torna íntimamente relacionados a la dinámica de la historia geológica haciendo que sean un importante modelo para estudios biogeográficos⁴.

4.1. ASPECTOS GENERALES DE LA FAMILIA PROCHILODONTIDAE

La distribución geográfica de los peces de la familia Prochilodontidae es limitada a los ríos de América del sur^{5, 6} y su ocurrencia ha sido confirmada en casi todas las cuencas hidrográficas sur americanas, enfatizando la abundancia y valor económico de esta especie. La familia Prochilodontidae incluye algunos de los más importantes peces consumidos en Colombia, Ecuador, Venezuela, Guyana,

¹ SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetics studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei; Loricariidae). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. & LUCENA, C.A. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Brasil. 1998. p. 387

² REIS, R.E.; KULLANDER, S. O.; FERRAIS Jr., C. J. Check list of freshwater fishes of Sout América. Porto Alegre, Brasil, 2003. p. 243.

³ LOWE-MCCONNELL, R. H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes neotropicais. São Paulo, Brasil, 1999. p. 36.

⁴ ORTÍ, G. & VARI, R. P. Characiformes pages. [on line]. In: MADDISON, D. W. The tree of life Project. 1996. disponible en Internet URL. <http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html>.

⁵ SCHUBART, O. y ROSA JR., H. Anotações sobre a biologia do curimbatá (Prochilodus) do rio Mogi. São Paulo, Brasil 1945. p. 15.

⁶ MAGO-LECCIA, E. Consideraciones sobre la sistemática de la familia Prochilodontidae (Osteichthyes, Cypriniformes), con una sinopsis de las especies de Venezuela. En: Acta Biológica de Venezuela. Venezuela, Vol. 8, No. 1, 1972. p. 69

Brasil, Perú, Bolivia y Argentina⁷. Abarca, también, importantes reservas de peces ya que en algunas regiones comprende mas del 50% de la comunidad de la ictiofauna⁸.

Aproximadamente 35 especies componen la familia Prochilodontidae^{9, 10}. De las cuales 24 son del genero *Prochilodus sp.* Sin embargo solo trece especies son válidas por que la mayoría de las descripciones es incompleta y dudosa¹¹. De esta manera, la sistemática de esta familia es considerada compleja, debido a la extraordinaria estabilidad de los caracteres morfométricos adoptados para la distinción de las especies^{12, 13}. El caracter mas seguro en la separación de las especies es el número de escamas, teniendo en cuenta esta caracterización, la especie con menor número de escamas es *Prochilodus vimboides*, en cuanto que la de mayor numero es *Prochilodus mariae*¹⁴.

El genero *Prochilodus* es conocido en Brasil con los nombres populares de curimatá, curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra y corimatá¹⁵. Las especies del género *Prochilodus* poseen características reproductivas en común, tales como: desove único por temporada con elevado número de ovas, fecundación externa y ausencia de cuidado parental¹⁶.

Los Prochilodontidae son iliofagos, se alimentan de detritus en los fondos lodosos¹⁷, son riofílicos (dependen de la corriente del ambiente natural fluvial), son considerados detritívoros, poseyendo así, unas adaptaciones anatómicas como labios gruesos, con una serie de dientes móviles y diminutos en forma de paleta

⁷ ROBERTS, T. R. Osteology and relationships of the Prochilodontidae, a south American family of Characoid fishes. Bull. Mus Comp. zool. Vol. 145 Nº 4, 1973. p. 222.

⁸ BOWEN, S. H. Detritivory in neotropical fish communities. Environmental Biology of fish, Vol. 9, No. 2, 1983, p. 140.

⁹ BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo – sistemática. In: Poluição e piscicultura. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, São Paulo, Brasil, 1972. p. 87.

¹⁰ ROBERTS, T. R. Op. Cit. p. 225.

¹¹ CASTRO, R. M. C. and VARI, R. P. Family Prochilodontidae in: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O. ; FERRAIS, Jr, C. J. (Ed). Check List of the Freshwaters of South and Central America. Porto Alegre. Brasil, EDIPUCRS. 2003. p. 67.

¹² GODOY, M. P. Sobre a sistemática do Curimatá ("*Prochilodus*" Agass.) do rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas e de outros afluentes do trecho superior do rio Paraná. Brasil. De Biol., Vol. 7 No. 4. 1947, p. 447.

¹³ MAGO-LECCIA. E. Op. Cit. p. 86.

¹⁴ *Ibíd.*, p. 86.

¹⁵ MAGALHÃES, A.C. Monographia Brasileira de Peixes Fluviais. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1931. p. 25.

¹⁶ LOWE-MCCONNELL. R. H. Op. Cit. p 38.

¹⁷ BRITSKI, H. A. Op. Cit. p. 88.

que sirven para raspar¹⁸ y estomago con paredes gruesa para triturar y digerir los detritus¹⁹.

Morfológicamente son caracterizados por un tamaño medio, que varía entre 40 y 42 cm, tienen el cuerpo comprimido, poseen una espina prominente, pre dorsal²⁰,²¹, y escamas ctenoides²² formando el anillo esteárico durante la época de desove²³.

Los ejemplares de este género presentan agilidad, su habilidad peculiar en época de desove es saltar grandes obstáculos; son capaces de realizar saltos de tres metros de altura y seis metros de amplitud durante la subienda, en la cascada de Emas en el río Mogi-Guaçu (Pirassununga, SP)²⁴.

Estos peces, aunque prefieren ambientes lenticos, son típicamente migradores, alcanzando largas distancias río arriba antes del periodo de inicio de las lluvias en época de desove²⁵. Durante el ciclo anual, nadan centenas de kilómetros a lo largo del río, en busca de alimento en las planicies inundadas²⁶ o en las lagunas marginales, las cuales se constituyen en lugares de alimentación por ser ambientes lenticos que presentan condiciones favorables a la circulación de las ovas y a la sobrevivencia en el estado larval y de alevino. Generalmente los peces permanecen en las lagunas hasta uno o dos años de edad, cuando están aptos para efectuar grandes migraciones, en búsqueda de la reproducción²⁷.

Las especies de la familia Prochilodontidae, no presentan territorialidad, poseen comportamiento pacífico, lo que los torna presas fáciles de algunos predadores, como *Serrasalmus* y *Hoplias*. Sin embargo, las grandes migraciones sirven para garantizar y preservar la sobrevivencia de las ovas y las larvas del ataque de los predadores²⁸.

¹⁸ MAGO-LECCIA, E. Op. Cit. p. 56.

¹⁹ ZARET, T.M. Evolutionary ecology of neotropical freshwater fishers. Dr. W. Jung Publishers, 1982, p. 61.

²⁰ SCHUBART, O y ROSA, Jr. H. Op. Cit. 18.

²¹ GODOY, M. P. *Peixes do Brasil Sub-orden Characoidei*. Bacia do rio Mogi-Guaçu, Editora Franciscana, Piracicaba, Brasil, Vol. 1, 1975. p. 150.

²² CASTRO, R. M. C. Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes). Tesis de Doctorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1990. p. 132.

²³ GODOY, M. P. Op. Cit. p. 152.

²⁴ GODOY, M. P. *Aquicultura: aquicultura, actividade multidisciplinar; escadas e outras facilidades para passagens de peixes, estações de piscicultura*. Eletrosul, Florianópolis, SC, Brasil. 1985. p. 30.

²⁵ BRITSKI, H. A. Op. cit. p. 89.

²⁶ SIVASUNDAR, A., BERMINGHAM, E., ORTÍ, G. Population struture and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American Rivers. *Molecular Ecology*, Vol. 10, 2001, p. 411.

²⁷ GODOY, M. P. Op. Cit. p. 154.

²⁸ MAGO-LECCIA, E. Op. cit. p. 59.

4.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS DEL CURIMBATÁ *Prochilodus lineatus*

4.2.1 Clasificación taxonómica. Este pez se encuentra clasificado de la siguiente manera²⁹.

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Characiformes

Familia: Prochilodontidae

Genero: *Prochilodus*

Especie: *P. lineatus*

Nombre binomial: *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)

4.2.2 Ecología. La localidad típica de ocurrencia del *Prochilodus lineatus* es la cuenca superior del río Paraná, envolviendo sobre todo los ríos Grande, Pardo y Mogi-Guaçu³⁰ donde representan, aproximadamente, la mitad de la biomasa de peces capturados en la cuenca³¹.

Prochilodus lineatus conocido popularmente como curimbatá presenta hábito migratorio³². Esta es la especie más abundante y de mayor importancia comercial en la pesca regional de río Mogi-Guaçu (SP), debido a su tamaño y a su sabor³³.

4.2.3 Descripción. Es un pez que puede llegar a medir hasta 70cm, presenta cuerpo comprimido y alto, cabeza larga. La boca es circular, proyectándose un poco para el frente cuando esta abierta, tiene labios gruesos y móviles, provistos de numerosos dentículos diminutos en dos series. Las aletas son escamadas en la base, y son de color cenizo con tonos amarillentos, sin presencia de manchas en los adultos. El cuerpo es de color cenizo con tonos verdes, siendo más oscuro en el dorso, con el vientre plateado, presenta línea lateral completa con 44 a 50 escamas y de 42 a 44 vértebras.

En cuanto a su régimen alimenticio, el curimbatá es un iliofago estricto, es decir, solo se alimenta de sedimentos. Entre las numerosas adaptaciones anatómico-fisiológicas, podemos citar la boca protráctil, la cavidad bucal en forma de V

²⁹ WIKIPEDIA FOUNDATION, *Prochilodus lineatus* En WIKIPEDIA la enciclopedia libre. España. (Citada 15 de agosto de 2007). Disponible en internet, URL: //es.wikipedia.org/wiki/prochilodus_lineatus.

³⁰ GODOY, M. P. Op. Cit. p. 160.

³¹ SCHUBART, O. A pesca na Cachoeira de Emas do Rio Mogi-Guaçu durante a piracema, de 1942 – 1943. Bol. Ind. Animal, São Paulo, Vol. 6, No. 4, 1943. p. 98.

³² GODOY, M. P. Op. Cit. p. 161.

³³ TOLEDO-FILHO, S.A., Distribuição espacial do curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, do rio Mogi-Guaçu. São Paulo Brasil. Ciência e Cultura. Vol. 35, 1983, p. 1112.

invertida, el estómago bicameral, la porción cardiaca es una cámara de almacenamiento, mientras que la pilórica, dotada de poderosa musculatura, se ocupa de la digestión mecánica y presenta numerosos pliegues pilóricos³⁴.

4.2.4 Biología. *Prochilodus lineatus* es una especie migradora, que realiza migraciones descendentes o aguas abajo entre enero y agosto con fines de alimentación, y ascendentes, o aguas arriba en la época de primavera con fines reproductivos en la región de la cascada de Emas, río Mogi-Guaçu (SP)³⁵. Posee, así, gran amplitud migratoria (600 a 700 kilómetros aproximadamente), donde el alto Mogi-Guaçu funciona como lugar de alimentación, crecimiento y engorde^{36, 37}.

La reproducción ocurre en el canal de los ríos y tiene su desarrollo inicial en lagunas marginales en las planicies de inundación, hasta alcanzar la maduración con dos años de edad³⁸.

El desove ocurre preferiblemente en la noche, coincidiendo con la elevación acentuada del nivel del agua^{39, 40}. Las crecientes funcionan como señal sincronizada para el desove y el pico de la creciente como finalizador del periodo reproductivo⁴¹. Durante las crecientes, los ríos reestablecen su conexión con las lagunas marginales, ofreciendo los nutrientes necesarios para el incremento de su productividad biológica⁴². Con la reproducción ocurriendo en este momento del año, los peces aumentan la probabilidad de que los nuevos individuos tengan acceso a los hábitat donde pasaran su etapa de alevino, ofreciéndoles protección y alimento^{43, 44}.

³⁴ CASTRO, R. M. C. Op. Cit. p. 157.

³⁵ GODOY, M. P. Op. Cit. p. 127.

³⁶ TOLEDO-FILHO, S. A., GODOY, M. P. E SANTOS, E. P. Curva de migração do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae) na bacia do rio Mogi-Guaçu. 1986. p. 24.

³⁷ TOLEDO-FILHO, S.A., GODOY, M.P. E SANTOS, E.P. Delimitação Populacional do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae) do rio Mogi-Guaçu, Brasil. Rev. Brasil. Biol., Vol. 47, No. 4, 1987, p. 505.

³⁸ AGOSTINHO, A. A.; VAZZOLER, A. E. A. M; GOMES, L. C. y OKADA, E. K. Estratificación espacial y comportamiento de *Prochilodus scrofa* en distintas fases del ciclo de vida, en la planicie de inundación del alto río Paraná y embalse de Itaipu. Paraná, Brasil: D' Hydrobiol. Trop. No. 26, 1993. p. 86.

³⁹ SCHUBART. Op. Cit. p. 98.

⁴⁰ GODOY, M. P. Op. cit. 1975, 164 p.

⁴¹ VAZZOLER, A. E. A. M.; LIZAMA, M. A. P. Influências ambientais sobre a sazonalidade reprodutiva. 1997.pp. 267 – 280 In VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (ed). A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e sócioeconômicos. Maringá: Brasil. EDUEM, 1997. p. 360.

⁴² JUNK, W. J.; BAYLER, P. B.; SPARKS, R. E. The flood pulse concept in river-floodplain system. In: Dodge, D. P. (ed). Proceedings of the International Large River Symposium. Canadian Special Publication, Fisheries and Aquatic sciences 106, Ottawa, Ontario, Canada. 1989, p. 117.

⁴³ LOWE-MCCONNELL, R. H. Fishcommunities in tropical freshwaters: their distribution, Ecology and Evolution. London: longman, 1975, p. 237.

⁴⁴ WELCOMME, R. L. Fisheries ecology of floodplain rivers. New York: Longman. 1979. p. 211.

4.2.5 Importancia. *P. lineatus* es una de las especies mas capturadas en el río Paraná, tanto en número como en biomasa. Estudios realizados entre 1987 y 1990 indican que esta especie es una de las más capturadas por la pesca profesional en el reservorio de Itaipu⁴⁵, además representa del 50% al 90% de la biomasa en el trecho inferior de la cuenca del río Paraná y en sus lagunas marginales^{46, 47}.

Su particular hábito alimenticio lo hace difícil de pescar con anzuelo, por lo cual se emplean distintos tipos de redes para su captura como, red de arrastre, trasmallo, tres telas, etc. Los ejemplares capturados son destinados al consumo local, a la exportación y a la producción de derivados como, aceite y harina⁴⁸.

4.3 USO DE MARCADORES MOLECULARES EN ESTUDIO DE PECES NEOTROPICALES

Estudios realizados utilizando la técnica de RFLP del mtDNA total, utilizando enzimas de restricción con sitio de reconocimiento de 6 pares de base (pb) indicaron la presencia de una baja variabilidad genética intra poblacional en *P. lineatus* del río Mogi-Guaçu - SP. Esto confirma la gran homogeneidad genética intra específica ligada al mtDNA total, encontrada en especies de piracema, como revelaron otros estudios poblacionales hechos con pacu e tambaqui⁴⁹.

Segun Revaldaves⁵⁰ no fue encontrado ningún indicio de estructuración poblacional para *P. lineatus* de diversas localidades con la técnica de RAPD. Los resultados parecen apuntar a la existencia de una única unidad panmictica de *Prochilodus lineatus* en las cuencas hidrográficas amazónica, del Plata y del São Francisco

Sin embargo, estudios realizados utilizando la técnica de marcadores RAPD (polimorfismo de DNA amplificado al azar), mostraron, entre muestras de *Prochilodus marggravii*, diferencias significativas en el coeficiente de similaridad,

⁴⁵ AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO Jr., H. F. y PETRERE Jr., M. Itaipu reservoir (Brasil): Impacts of impoundments on the fish and fisheries. In: COWXI, G. Reabilitation os freshwaters fisheries. Fishing news book. Bodmin, UK, 1994. p. 178.

⁴⁶ BONETTO, A. A. Fish of the Paraná System. In DAVIES, B. R. and WALKER, K. F. (Ed). The Ecology of River Systems, Holanda: Dordrecht. 1986. p. 575.

⁴⁷ CORDOVIOLA DE YUAN, E. Fish populations of lentic environments of the Paraná river. Brasil Hydrobiologia. Vol. 123, 1992. p. 163.

⁴⁸ WIKIPEDIA FOUNDATION. Curimbatá. En WIKIPEDIA la enciclopedia libre. España. (Citada 15 de agosto de 2007). Disponible en internet URL: //es.wikipedia.org/wiki/curimbatá.

⁴⁹ CALCAGNOTTO, D. Caracterização de bancos genéticos selvagens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através da análise do DNA mitocondrial. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil. 1998, p. 58.

⁵⁰ REVALDAVES, E.; RENESTO, E. y MACHADO, M.F.P.S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Parana river. Braz. Journal of Genetics, Vol. 20, 1997, p. 383.

sugiriendo la ocurrencia de estructuración de poblaciones en este grupo⁵¹ en el pez neotropical *Brycon lundii*, revelo una posible relación entre variación genética y área geográfica a través del índice de similaridad genética, frecuencia media de alelos y heterocigosidad media⁵².

4.4 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA MIGRACIÓN DE PECES DE AGUA DULCE

Nomura⁵³ enumera cinco razones importantes para estudiar las migraciones ícticas: determinar la velocidad de migración; determinar las distancias recorridas; estudiar al aumento de longitud o peso del cuerpo; describir la dirección de la migración (aguas arriba o abajo del río); para el cálculo de los índices de mortalidad.

Otra razón del estudio de la migración íctica es evaluar las repercusiones sobre la vida de los peces de presas y otros aprovechamientos hidráulicos, que modifican el ecosistema acuático. Hay dos sistemas básicos para el estudio de migraciones ícticas: con programas de marcado, que llevan mucho tiempo y son caros; con observaciones directas, que es el método más común y más económico.

Hay especies ícticas que ocupan las primeras etapas de su vida alimentándose y creciendo en agua dulce para migrar después y reproducirse en el mar, especies catadromas y otras con unas características de migración contrarias, ya que se crían en agua dulce y se alimentan en el mar, peces anadromos. Sin embargo, los primeros informes de América Latina se hicieron porque la gente estaba impresionada por las enormes migraciones ícticas dentro de las propias aguas dulces, fenómeno conocido como “piracema” por los indios americanos del sudeste del Brasil (pira = pez; cema = cardumen)⁵⁴.

Bonetto⁵⁵ clasificó la migración íctica en términos generales fundamentándose en los estudios de marcado en la parte argentina del río Paraná, como: reproductiva; térmica; trófica o nutricional; migraciones de crecimiento y migraciones que dependen de fenómenos especiales, como las originadas por variaciones en el nivel del agua y corrientes. Manifiesta que estos aspectos pueden ser coincidentes

⁵¹ HATANAKA, T. Estudos de marcadores cromossômicos e moleculares no peixe *Prochilodus marginatus* (*Prochilodontidae*), uma espécie de interesse econômico no rio São Francisco. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos. Sao Paulo, Brasil, 2001, p 70.

⁵² WASKO, A. P. y GALETTI JR., P.M.. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (*Characidae*) by fluorescence in situ hybridization (FISH). Brasil, *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 23, 2000, 137.

⁵³ NOMURA, H., Marcação e migração da piava *Leporinus copelandii* Steindachner, 1875 (*Osteichthyes, Anostomidae*) do Rio Mogi Guassu, São Paulo. Brasil, *Rev.Ceres*, Vol. 22, 1975 p. 334.

⁵⁴ SCHUBART. Op. Cit. p. 106.

⁵⁵ BONETTO, A.A., VERÓN M.C. y ROLDÁN, D. Nuevos aportes al conocimiento de las migraciones de peces en el Río Paraná. Brasil *Ecosur*, Vol. 8, 1981 p. 33.

y, en algunos casos, las características migratorias pueden ser muy complejas y difíciles de interpretar.

El nivel del agua, junto con la temperatura, se han estimado recientemente como los principales factores responsables de la migración^{56,57}. Bayley⁵⁸ indica que la fase lunar cuarto creciente está relacionada con la migración del “sábalo”, *Prochilodus platensis*, en el río Pilcomayo de Bolivia.

Las razones aducidas por Godoy⁵⁹ con respecto a por qué migran los peces aguas arriba para reproducirse, es que el exceso de grasas y proteínas acumuladas en el cuerpo deben ser metabolizadas con el ejercicio. Estos componentes se desglosan principalmente en ácido láctico, que activa la glándula pituitaria dejando en libertad las hormonas gonadotrópicas que, a su vez, provocarán el desarrollo de la gónada y la madurez del ovario.

4.4.1 Río Mogi Guaçu, Brasil. En el Mogi Guaçu, la migración íctica empieza en agosto hasta septiembre y las especies aparecen con la siguiente secuencia^{60, 61}^{62, 63, 64}, en primer lugar, migra la especie más pequeña, conocida con el nombre de “piquira”, y a continuación siguen las especies de mayor tamaño. Parece ser que una especie no desova aisladamente y que no todos los individuos de la misma especie desovan al mismo tiempo. El desove se produce siempre a finales de la tarde y durante la noche, cuando la temperatura del agua alcanza aproximadamente 24 °C⁶⁵.

Godoy^{66,67,68}, observó que las hembras de “curimbatá”, *Prochilodus scrofa*, que es el más importante pez en el río, están situadas cerca de las orillas durante las

⁵⁶ SCHUBART. Op. Cit. p. 99.

⁵⁷ GODOY, M.P. Age, growth, sexual maturity, behaviour, migration, tagging and transplantation of the Curimbatá (*Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881) of the Mogi Guassu River, São Paulo State, Brasil. An. Acad. Bras. Cienc., Vol. 31, 1959., p. 464.

⁵⁸ BAYLEY, P.B. Studies on the migratory characin, *Prochilodus platensis* Holmberg, 1889 (Pisces: Characoidei) in the R. Pylcomayo, South America. J. Fish Biol. Vol. 5, 1973, p. 29.

⁵⁹ GODOY, M.P. Dez anos de observações sobre periodicidade migratória de peixes do Rio Mogi Guaçu. Brasil, Rev. Bras. Biol. Vol. 27, 1967, p.10.

⁶⁰ GODOY, M.P. A piracema de 1944/1945 no Rio Mogi Guassu, Cachoeira das Emas. Bol. Minist. Agric., Rio de Janeiro, Brasil, Vol. 34 1946, p.107.

⁶¹ GODOY, M.P. Locais de desova de peixes em um trecho do Mogi Guassu, SP. Brasil Rev. Bras. Biol. Vol. 14, 1954, p.385.

⁶² GODOY, M.P. Op Cit. p. 456.

⁶³ GODOY, M. P. Op. Cit. p. 5.

⁶⁴ SCHUBART, O y ROSA, Jr. H. Op. Cit. p 25.

⁶⁵ MORAES FILHO, M.B. Y SCHUBART, O. Contribuição ao estudo do Dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae). Rio de Janeiro, Brasil, Ministério da Agricultura, Divisão de Caça e Pesca, 1955, p. 121.

⁶⁶ GODOY, M.P. Op Cit. p.106.

⁶⁷ GODOY, M.P. Op Cit. p. 382.

⁶⁸ GODOY, M. P. Op. Cit. p. 82.

migraciones aguas arriba mientras que los machos ocupan la parte central del río. Se observó que las hembras nadan hacia el centro durante algún tiempo para la fecundación y después vuelven a las orillas. El desove dura cinco minutos por término medio y localmente se denomina “rodada”. Algunos peces parece ser que continúan trasladándose río arriba incluso después del desove.

Los peces adultos del río Grande, que junto con el Paranaíba forma el río Paraná, se introducen en el río Pardo y Mogi Guaçu, subiendo por las escaleras para peces situadas en “Cachoeira das Emas”. Después de la reproducción vuelven para descansar y alimentarse en el río Grande. La distancia total que realiza un pez es aproximadamente 1100 km con diferentes velocidades diarias según las especies, el promedio de todas las especies es alrededor de 12 km/día, cuando van aguas arriba. También se produce una migración aguas arriba en la fase preadulta de la especie *P. scrofa* (± 10 cm LT), entre marzo y mayo hacia Cachoeira das Emas.

4.5 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Los estudios de polimorfismo genético a nivel de DNA típicamente comprenden un gran número de individuos. El tamaño de la muestra es invariablemente un componente fundamental en la obtención de un poder estadístico adecuado para llegar a estimativas confiables y pruebas de hipótesis. La posibilidad de analizar un gran número de individuos depende inicialmente de la capacidad de extraer su DNA en calidad y cantidad adecuadas de forma rápida y eficiente

Una de las consideraciones más importantes en el procedimiento de extracción de DNA es la manera utilizada para coleccionar y preservar el tejido ya que la cantidad y calidad de DNA son afectadas por la condición del tejido antes de la extracción. Es mejor usar material fresco.

La mayoría de los métodos de extracción de DNA comprenden cinco etapas básicas. En la primera se realiza la maceración mecánica para romper las paredes y membranas celulares del tejido. La maceración de tejido fresco puede ser realizada en presencia de nitrógeno líquido.

En la segunda etapa el tejido es resuspendido en un tampón de extracción, que contenga algún detergente antioxidante EDTA y el agente tamponante, con la finalidad de solubilizar las membranas lipoproteicas y desnaturalizar las proteínas preservando el DNA de la acción de enzimas de degradación. Esta suspensión se somete a una temperatura entre 50 y 65°C durante 15 a 65 minutos para facilitar su solubilización y homogeneización.

En la tercera etapa se somete la suspensión a una extracción con un solvente orgánico, cloroformo alcohol isoamilico. Las fases orgánica y acuosa son separadas mediante centrifugación. En esta extracción, los lípidos, proteínas y la mayoría de los polisacáridos son retenidos en la fase orgánica inferior, mientras que el DNA, RNA y algunos polisacáridos quedan retenidos en la fase acuosa en la parte superior.

En la cuarta etapa es adicionado un alcohol isopropanol o etanol a la fase acuosa. El DNA en presencia de sal y alcohol forma un precipitado frecuentemente visible a simple vista que puede estar en forma de hebras o sedimentado por centrifugación.

En la última etapa este precipitado de DNA/RNA es resuspendido en una solución tampón Tris EDTA que contiene RNAsa para degradar el RNA presente, restando solamente el DNA genómico deseado⁶⁹.

4.6 ELECTROFORESIS

La técnica de electroforesis fue desarrollada en los años 50 ganando fuerte adhesión a partir de la década del 60. La técnica se basa en la separación de moléculas como proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos a través de una matriz tamponada como almidón, agarosa o acrilamida. La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo con el tamaño y la carga eléctrica neta que poseen.

En el caso de los ácidos nucleicos el grupo fosfato es el responsable de la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo durante la electroforesis. Como la carga eléctrica neta de los fragmentos es negativa, la separación ocurrirá según el tamaño de los fragmentos.

La separación eficiente de los fragmentos de DNA que varían de 100 pb a 60 Kb puede ser verificada, utilizando agarosa, una forma refinada de ágar extraído de algas marinas. El proceso de separación de los fragmentos de DNA por electroforesis depende básicamente, del tamaño del fragmento, de la concentración de la agarosa y del voltaje aplicado durante la electroforesis.

Como la agarosa se comporta como si fuese un filtro, separando los fragmentos de diferentes tamaños durante la electroforesis, se observa que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente en dirección al polo positivo, mientras que los fragmentos de mayor

⁶⁹ FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Op. Cit. p. 122.

longitud migran lentamente. De esta forma, los fragmentos de diferentes tamaños son separados a lo largo de dos polos en el gel de agarosa.

Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo de la membrana, permitiendo obtener una mayor resolución en la separación de fragmentos de menor longitud. Mientras que la reducción de la concentración favorece la separación de fragmentos mayores. El incremento de voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos a lo largo de la matriz. El conocimiento de estas variables permite adecuar la condición ideal para proceder a la separación de fragmentos de DNA de diferentes tamaños⁷⁰.

4.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) es una técnica poderosa que comprende la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento de DNA en presencia de la enzima DNA polimerasa.

La técnica fue descrita por el científico norteamericano Kary Mullis en 1985. La reacción de PCR se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos, pequeñas moléculas de DNA de cadena sencilla, utilizados como iniciadores o Primers que delimitan la secuencia de DNA de doble cadena, blanco de la amplificación. Estos primers son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias a las secuencias específicas que flanquean la región blanco, el inicio de la síntesis comienza en dos diferentes posiciones en la molécula.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*) tiene como principal agente la enzima termo sensible DNA *Taq* polimerasa, que une nucleótidos dispersos en la reacción para montar una molécula, usando un DNA molde (DNA *témlate*). Una PCR se realiza en volúmenes muy pequeños entre 10 y 100 microlitros. Teóricamente es necesario apenas un blanco de molécula de DNA para que la reacción pueda ocurrir.

Los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 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 ADN. Otro factor relevante es la concentración de cloruro de magnesio un catión divalente que funciona

⁷⁰ *Ibíd.*, p. 124

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 °C⁷¹.

Un ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización, apareamiento y elongación o polimerización. En la primera el DNA de doble cadena es desnaturalizado mediante el aumento de la temperatura que puede variar de 92° a 95°C. En la segunda etapa, la temperatura es rápidamente reducida entre 35° y 60°C dependiendo esencialmente del tamaño del fragmento y la secuencia del primer utilizado, permite la hibridación DNA-DNA de cada primer con las secuencias complementarias que flanquean la región blanco.

En seguida la temperatura es elevada a 72°C para que la enzima DNA polimerasa realice la extensión de la cadena a partir de cada terminal 3' de los primers mediante la incorporación de nucleótidos utilizando como molde la secuencia blanco, de manera que una copia de esta secuencia es producida en el proceso.

Este ciclo se repite algunas decenas de veces. Una vez que la cantidad de DNA de la secuencia blanco se duplica en cada ciclo, la amplificación sigue una progresión geométrica de manera que después de unos 20 ciclos se produce más de un millón de veces la cantidad inicial de la secuencia blanco. Esta escala de amplificación permite, por lo tanto iniciar con cantidades mínimas de DNA (del orden de unos picogramos a unos nanogramos) y terminar la reacción con grandes cantidades de DNA de la secuencia específica de interés.⁷²

4.8 CARACTERIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE SECUENCIAS DE DNA SATELITE

Una importante característica de los eucariontes (con excepción de los hongos) es que sus cromosomas presentan una significativa cantidad de tipos de segmentos de DNA repetitivo, no encontrados en los procariontes. En ese grupo la presencia de intrones, grandes regiones inter genes, secuencias satélites, pseudogenes y muchas familias de elementos transponibles sugieren la existencia de un exceso de segmentos de DNA, que aparentemente no son frecuentemente sujetos a una fuerte presión selectiva negativa^{73, 74} entre los elementos repetitivos se encuentran

⁷¹ SYKES, B. *As Sete Filhas de Eva. A ciência que revela nossa herança genética.* Rio de Janeiro: Brasil. Record, 2003. p. 32.

⁷² FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Op. Cit. p. 37.

⁷³ WEINER, A. M.; DEININGER, P. L.; EFSTRATIADIS, A. Nonviral retropososns: Genes, Pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 55, 1986, p. 656.

las secuencias satélites que constituyen una fracción relativamente importante del genoma de los eucariontes superiores. Son secuencias no codificadoras, arregladas en cadena que generalmente están localizadas próximas a regiones heterocromáticas de los cromosomas, en los centrómeros y telómeros⁷⁵. Variando de 25% en algunas especies hasta 50% en otras⁷⁶.

Aun cuando una enorme diversidad de secuencias repetitivas puede estar presente en los organismos incluyendo los peces⁷⁷ la clase más intensamente estudiada es la de las secuencias repetidas arregladas en cadena. La complejidad de estas secuencias puede variar de dos pares de bases hasta dos kilo bases y el tamaño total de las cadenas formadas por las múltiples copias puede variar de menos de 100 pares de bases hasta más de 100 mega bases⁷⁸.

De acuerdo con la longitud del segmento repetido las secuencias repetidas en cadena han sido divididas en tres clases identificadas como microsátélites, minisátélites y satélites⁷⁹ el significado funcional de estas secuencias aun no es totalmente conocida, pero se considera que algunas clases de secuencias repetitivas deben desempeñar papeles importantes en el funcionamiento celular⁸⁰.

El DNA altamente repetitivo es arbitrariamente definido como aquellos cuyas secuencias están presentes en cerca de 10^4 o mas copias por genoma⁸¹. Históricamente el termino DNA satélite ha sido aplicado para caracterizar el DNA altamente repetitivo que puede ser distinguido del resto del DNA como una banda aislada, después de la centrifugación del DNA en un gradiente de densidad. Una definición mas general de DNA satélite incluye cualquier secuencia de DNA con una unidad monomérica de algunos pocos pares de bases, que es organizada en cadena de forma que el inicio de una cadena esta ligado al final de la precedente sin importar el hecho de que este DNA pueda ser o no posible de ser aislado por centrifugación en gradiente de densidad.⁸²

⁷⁴ CHARLESWORT, B.; SNTÉGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. Vol. 371. 1994. p. 217.

⁷⁵ *Ibid.* 217.

⁷⁶ WAGNER, R. P.; MAGUIRE, M. P.; STALLINGS, R.L. *Chromosomes: a synthesis*. Wiley-Liss, inc.; New York. 1993. p. 15

⁷⁷ OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M.; FORESTI, F. Chromosome Structure in fishes. In: *Some aspects of chromosome structure and functions*. R.C. SOBTI; OBE, G.; ATHWAL, R.S. eds. Narosa Publishing House, New Delhi, 2002, p. 105.

⁷⁸ STEPHAM, W.; CHO, S. Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics*. Vol. 136, 1994, p. 334.

⁷⁹ LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-Strand mispairing : a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* Vol .4, 1987. p. 218.

⁸⁰ EPPLEN, J. F.; EPPLEN-HAUPT, A. Aspects of tandemly organized, repetitives sequence in chromosomal DNA. In: *Some aspects of chromosome structure and functions*. R.C. SOBTI; OBE, G.; ATHWAL, R.S. eds. Narosa Publishing House, New Delhi, Cap 1, 2002, p. 8.

⁸¹ SINGER, M. F. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev. Cytol.* Vol. 76, 1982, p. 72.

⁸² WAGNER, R. P.; MAGUIRE, M. P.; STALLINGS, R.L. *Op. Cit.* p.17

4.9 MARCADORES MICROSATELITES

El termino microsatélite se refiere a una clase de DNA satélite y caracteriza marcadores de DNA de herencia codominante que posee patrón de herencia mendeliana. Microsatélites son secuencias de 1 a 6 bases repetidas en tandem, que están presentes en organismos procariontes y eucariontes, en menor o mayor abundancia, y pueden ser encontrados en regiones codificantes y no codificantes del genoma^{83, 84, 85}.

Las Secuencias Simples Repetitivas (SSR – Simple Sequencer Repeat) o loci microsatélites son altamente polimórficos, frecuentemente con más de una docena de alelos en un locus simple y teniendo altas tasas de mutación que están entre 10^4 a 10^3 por generación, estos locus son abundantes y ampliamente dispersos en el genoma de eucariontes⁸⁶.

La técnica utilizada para el análisis del polimorfismo de los microsatélites se basa en la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), en la cual se utiliza un par de *Primers* específicos (de 20 a 30 bases) para la amplificación de un determinado segmento de DNA, los cuales son complementarios a secuencias únicas que, en este caso, limitan un microsatélite.

Segmentos amplificados a partir de estos sitios casi invariablemente presentan un polimorfismo extensivo, resultante de la presencia de diferentes números de elementos simples repetidos. Así cada isla microsatélite, independientemente de el elemento repetido (CA, TG, ATG, etc), constituye un locus genético altamente variable, multialelico, de gran contenido informativo. Cada segmento amplificado de tamaño diferente, generalmente de varias decenas hasta algunas centenas de pares de bases, representa un alelo diferente del mismo loci⁸⁷.

La repetición dinucleotídica (CA)_n es una de las mas abundantes familias de microsatélites en los genomas de vertebrados, ocurriendo en una medida de 15 a 30 Kb^{88, 89, 90}. Los microsatélites predominantes en peces comprenden, hasta ahora, repeticiones de dos bases, usualmente (GT/CA)_n o (CT/GA)_n^{91, 92, 93, 94}.

⁸³ ZANE, L.; BARGELLONI, L. PATARNELLO, T. Strategies for microsatellites isolation: a review. *Molecular Ecology*. V. 11, 2002, p. 11.

⁸⁴ CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: Consensus and controversy. *Comp. Biochem. Phys.* Vol.126 , 2000 (Part B), p. 457.

⁸⁵ DEWOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromus fishes compares whit of her animals. *Journal Fish Biology*. Vol. 56, 2000 p. 467.

⁸⁶ LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotido repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal and Human Genetic*. Vol. 44, 1989, p. 399.

⁸⁷ FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Op. Cit. p. 55.

⁸⁸ STALLING, R. L.; FORD, A. F.; NELSON, D.; TORNEY, D. C.; HILDEBRAN, C. E.; MOYZIS, R. K. Evolution and distribution of (GTR)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*. Vol. 10, 1991, p. 911.

La unicidad y valor de los microsatélites surgen de su naturaleza multialélica, transmisión codominante, facilidad de detección por PCR, relativa abundancia, extensiva cobertura del genoma y exigencia de cantidades pequeñas de DNA⁹⁵.

Entretanto, para aprovechar el gran potencial de estos marcadores, es necesario un mejor entendimiento de cómo los microsatélites evolucionan dentro y entre especies. Es posible que las tasas de mutación sean tan altas que no permitan identificar el ancestral común entre las poblaciones, además de poder resultar en una convergencia excesiva de estados alélicos, conduciendo a una subestimación de la divergencia alélica entre poblaciones⁹⁶.

El tamaño de un alelo de microsatélite puede ser precisamente determinado por electroforesis de poliacrilamida, usando marcadores de DNA. Estos arreglos de microsatélites parecen ser altamente susceptibles a mutaciones alterando así su tamaño. El proceso responsable por las alteraciones pueden ser, errores en el apareamiento o errores durante la replicación del DNA. La alta tasa de mutación en las regiones de microsatélites conduce a una gran variación alélica y altos niveles de heterocigosidad. Es importante resaltar, sin embargo, que varios microsatélites exhiben niveles muy bajos de polimorfismo⁹⁷.

A pesar del mecanismo de evolución de los microsatélites aun no estar totalmente claros, ellos han sido ampliamente empleados debido a su alta variabilidad, lo que los torna en marcadores altamente poderosos. Varias medidas genéticas han sido utilizadas para el análisis de los microsatélites, como los R_{ST} ⁹⁸. Los microsatélites se han mostrado como una herramienta extremadamente ventajosa para el

⁸⁹ ESTOUP, A., PRESA, P., KRIENG, F., VAIMAN, D., GUYOMARD, R. (CT)_n and (GT)_n microsatellite: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, Vol. 71, 1993, p. 596.

⁹⁰ JURKA, J.; PETHIVAGODA, C. Simple repetitive DNA sequences for primates: compilation and analysis. *Journal of Molecular Evolution*. Vol. 40. 1995, p. 122.

⁹¹ GOFF, D. J. et al. Identification of Polymorphic simple sequence repeat in the genome of the zebrafish. *Genomics*. Vol. 14, 1992, p. 201.

⁹² ESTOUP, A., PRESA, P., KRIENG, F., VAIMAN, D., GUYOMARD, R. *Op. Cit.* p. 597.

⁹³ COLBOURNE, J. K.; NEFF, B. D.; WRIGHT, J. M.; GROSS, M. R. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment on mating success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Vol. 53, 1996, p. 344.

⁹⁴ LEE, W. J.; KOCHER, T. D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*. Vol. 49, 1996, p. 170.

⁹⁵ POWEL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAM, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science*. Vol. 1, No. 7, 1996, p. 219.

⁹⁶ FITZSIMMONS, N. N.; MORITZ, C.; MOORE, S. S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 12, No. 3, 1995, p. 434.

⁹⁷ RUZZANTE, D. E. A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellites data: bias and sampling variance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 55. 1998. p. 11.

⁹⁸ SLATKIN, M. A. Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies, *Genetics Society of America*. Vol. 139, 1995, p. 458.

mapeamiento del genoma de muchos organismos^{99, 100}. No obstante sus aplicaciones se extienden por diferentes áreas como estudios filogenéticos, forenses, de paternidad, genética de poblaciones, conservación y manejo de recursos biológicos¹⁰¹.

La estimación de las relaciones entre taxa muy relacionados se pueden tornar mas fáciles si caracteres que evolucionan de manera mas rápida fueran utilizados. Debido a su alta tasa de mutación, los microsatélites pueden ser bastante informativos para esos estudios¹⁰².

Teniendo en cuenta la expresión codominante y el multiallelismo, los marcadores microsatélites son los que poseen el más elevado contenido de información de polimorfismo, PIC (Polymorphism Information Content) en la terminología de marcadores moleculares¹⁰³.

El hecho de que los microsatélites sean encontrados generalmente en regiones 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 DNA mitocondrial, más problemática para los microsatélites. 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 cuestión¹⁰⁴.

Los microsatélites son muy frecuentes y están distribuidos al azar, permitiendo la más completa cobertura de cualquier genoma eucarionte. Se ha observado, en animales, que los sitios microsatélites están bien conservados entre especies relacionadas, lo cual permite en algunos casos, la transferencia de marcadores entre especies incluso entre géneros usando primers heterólogos¹⁰⁵.

Estas características, sumadas a que los segmentos polimorficos generados son lo suficientemente pequeños como para ser detectados vía PCR, hacen que los microsatélites sean los marcadores ideales para el mapeamiento genético y físico, para la identificación y discriminación de genotipos y en estudios de genética de poblaciones¹⁰⁶.

⁹⁹ SCHULER, G. D.; BOGUSKI, M. S.; STEWORT, E. A. A gene map of the human genome. Science. Vol. 247, 1996, p. 544.

¹⁰⁰ KNAPIK, E. W.; GOODMAN, A., EKKER, M. A microsatellite, genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). Nature genetics. Vol. 18, 1998, p. 340.

¹⁰¹ JARNE, P.; LUGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology and Evolution. Vol. 11, 1996, p. 428.

¹⁰² GOLDSTEIN, D. B. et al. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics. Vol. 139, 1995, p. 467.

¹⁰³ FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Op. Cit. p. 57.

¹⁰⁴ ZANE, L.; BARGELLONI, L. PATARNELLO, T. Op. Cit. p. 13

¹⁰⁵ FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Op. Cit. p. 57.

¹⁰⁶ Ibid. 57

La detección de secuencias microsátélites vía PCR se realiza en geles de poliacrilamida o agarosa especial de alta resolución, ya que es necesario un gel adecuado para la separación de segmentos que difieren en pocos pares de bases, dependiendo del número de nucleótidos del elemento repetido en el microsátélite. La visualización de las bandas puede hacerse directamente por coloración con bromuro de etidio o nitrato de plata o a través de autoradiografía utilizando primers marcados con radioisótopos en la reacción de PCR¹⁰⁷.

4.10 ESTRUCTURA DE POBLACIONES

Con el rápido avance de la genética molecular, ha aumentado considerablemente el entendimiento de la genética de las poblaciones, a través del uso de las técnicas de electroforesis de proteínas^{108, 109, 110, 111}. Análisis de fragmentos de restricción de DNA nuclear y mitocondrial^{112, 113, 114}. Amplificación de DNA con primers aleatorios^{115, 116}. Uso de secuencias simples repetidas (SSR)^{117, 118}. y secuenciamiento de DNA¹¹⁹.

¹⁰⁷ FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Op. Cit. p. 57.

¹⁰⁸ SODSUK, P. K.; MCANDREW, B. J. Molecular systematics of three tilapiine genera *Tilapia*, *sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. *Journal of Fish Biology*. Vol. 39, 1991, p. 302.

¹⁰⁹ SODSUK, P. K.; MCANDREW, B. J.; TURNER, G. I. Evolutionary relationship of the lake Malawi *Oreochromis* species: evidence from allozyme. *Journal of Fish Biology*. Vol. 47, 1995, p. 325.

¹¹⁰ LARGIADEU, C. R.; SCHOLL, A. Genetic introgression between native and introduced brown trout *Salmo trutta* L. populations in the Rhône River basin. *Molecular Ecology*, Vol. 5, 1996, p. 424.

¹¹¹ JORDAN, W. C.; VERSPOOR, E.; YOUNGSON, A. F. The effect of natural selection on dynamics of genetic divergence among populations of the atlantic Salmon. *Journal of Fish Biology*. Vol. 57, 1997, p. 556.

¹¹² HANSEN, M. M.; MENSBERG, K-L. D. RASMUSSENG, G.; SIMANSEN, V. Genetic variation within and among danish brown trout (*Salmo trutta* L.) hatchery strains assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Aquaculture*. Vol. 153, 1997a, p. 19.

¹¹³ ROGNON, X.; GUYOMARD, R. Mitochondrial DNA differentiation among east and west African Nile tilapia populations. *Journal of Fish Biology*, Vol. 5, 1997, p. 205.

¹¹⁴ TESSIER, N.; BERNATCHES, L.; WRIGHT, J. M. Population structure and impact of supportive breeding from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in land-locked Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Molecular Ecology*. Vol. 6, 1997, p. 745.

⁹² BARDOKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD techniques in tilapia fish; species and subspecies identification. *Heredity*, Vol. 27, 1994, p. 120.

¹¹⁶ DINESH, K. R.; CHAN, W. K.; LIN, T. M.; PHANG, V. P. E. RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. *Asian Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, Vol. 3, Nº. 2, 1995, p. 116.

¹¹⁷ SLETTAN, A.; OLSAKER, I.; LIE, O. Segregation studies and linkage analyses of Atlantic salmon microsatellites using haploid genetics. *Heredity*, Vol. 78, 1997, p. 622.

¹¹⁸ BERNATCHES, L.; DEMPSON, J. D.; MARTIN, S. Microsatellite gene diversity analyses in anadromous Arctic char, *Salvelinus alpinus*, from Labrador, Canada. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Science*. Vol. 55, 1998, p. 1267.

¹¹⁹ ZARDOYA, R.; VOLLMER, D. M.; CRADDOCK, C.; STREELMAN, J. T.; KARL, S.; MEYER, A. Evolutionary conservation of microsatellites flanking regions and their use in resolving phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proceeding of Royal Society London B*. Vol. 236, 1996, p. 1595.

La accesibilidad relativamente simple de un gran número de individuos puede ser realizada a través de estas técnicas. En función de eso un gran número de locus génicos puede ser examinado y utilizado para evaluar el nivel de variación entre diferentes especies, al mismo nivel taxonómico, entre poblaciones de la misma especie, entre individuos dentro de una misma población, e igualmente entre individuos. Especies de importancia comercial requieren riguroso manejo de la investigación en relación a su estructura de poblaciones. Existe evidencia creciente que muchas poblaciones basados en larvicultura^{120, 121} y otros establecidos para el aumento de poblaciones naturales fueron modificados en su estructura y composición génica y se han tornado endogámicos, ya sea por las prácticas de larvicultura o sea por la selección no intencional, los cuales se tornan menos adaptados sobre las condiciones naturales o de cautiverio¹²².

Los estudios encaminados a la conservación de poblaciones o especies de peces de importancia económica o en riesgo de extinción ofrecen datos que constituyen una base esencial en la toma de medidas de manejo de poblaciones salvajes o cultivadas.

La interacción de las diversas áreas de estudios poblacionales, tales como biología, ecología y genética es una tendencia actual. En esta última, el desarrollo de técnicas que posibilitan la detección de la evolución de diferentes genotipos enriqueció la gama de herramientas utilizables para suplir necesidades tales como identificación de individuos y estimativa del grado de parentesco entre ellos, la delimitación de poblaciones de interés, estimativa del grado de variabilidad de las mismas, como también de su historia reciente, y estimativa del grado de similaridad entre poblaciones y especies, con la construcción de árboles filogenéticos. Todos estos parámetros componen la biodiversidad, que es asumida esencial para el equilibrio ambiental.

Con respecto a los recursos pesqueros, la preocupación en adquirir conocimientos de las características poblacionales accesible por los métodos de estudios genéticos está ligada tanto a las necesidades ecológicas de conservación ambiental como al aumento de la demanda de alimentos como resultado del crecimiento poblacional humano. Las alteraciones ambientales causadas por la presencia humana y la explotación excesiva de los recursos pesqueros han tenido respuestas

¹²⁰ STONE, C. E.; TAGGART, T. B.; FERGUSON, A. Single locus minisatellite DNA variation in European populations of Atlantic salmon (*Salmo trutta* L.). *Hereditas* Vol. 126, 1997, p. 273.

¹²¹ REILLY, A.; ELLIOT, N. G.; GREWE, P. M. CLABBY, C.; POWEL, R.; WARD, R. D. Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their ancestral Canadian population: Comparison of microsatellites DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation. *Aquaculture*. Vol. 173, 1999, p. 461.

¹²² TESSIER, N.; BERNATCHES, L.; WRIGHT, J. M. *Op. Cit.* p. 747.

como modificaciones en los patrones poblacionales de varias especies de peces. Estas respuestas son reflejadas en características esenciales como tamaño de la población, reproducción, crecimiento, alimentación y migración.

Con los conocimientos adquiridos a partir de las investigaciones acerca de los diversos aspectos genéticos de los recursos pesqueros, se espera poder implantar con seguridad las normas de explotación de los mismos, permitiendo generar propuestas de manejo para manutención o recuperación de diversas especies en la naturaleza, evaluar impactos de actividades antrópicas tales como la explotación excesiva de recursos naturales y la introducción de especies exóticas o la existencia de híbridos dentro de especies protegidas.¹²³

4.11 GENÉTICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones es la rama de la genética cuya problemática es describir la variación y distribución biológica, con el objeto de dar explicación a fenómenos evolutivos. Para ello, define a una población como un grupo de individuos de la misma especie y que están aislados reproductivamente de otros grupos afines.

Estas poblaciones, están sujetas a cambios evolutivos en los que subyacen cambios genéticos, los que a su vez están influenciados por factores como: selección natural y deriva génica que actúan principalmente disminuyendo la variabilidad de las poblaciones o migración y mutación que actúan aumentándola.

Cabe destacar, que la pérdida de variabilidad genética en las poblaciones trae consigo dos graves problemas: 1) Coarta la posibilidad de que el hombre pueda realizar mejoramiento genético en especie de interés comercial y/o recreativo y 2) Disminuye la adaptación de las especies ante nuevos cambios ambientales.

Por su parte, la presencia de variabilidad genética es deseable no solo para mejoramiento genético o conservación de especies, ya que el rol fundamental de la variabilidad genética es ser la materia prima para los procesos evolutivos, sin variabilidad no hay evolución. El accionar de estos factores con las poblaciones en el tiempo, permite la existencia de

¹²³ MARQUES, Débora Karla Silvestre. Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros, Corumbá. Brasil, Embrapa Pantanal, 2002. p. 18.

gran número de especies con variadas estructuras poblacionales y formas de vida¹²⁴.

4.11.1 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 como recombinación, o por radiaciones. Estas mutaciones pueden ser letales o dar origen a caracteres de adaptación a las condiciones impuestas por el ambiente como clima o 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 idéntica información genética en el ADN, lo que se conoce como variabilidad genética.

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 población¹²⁵.

¹²⁴ WIKIPEDIA FOUNDATION, Genética de poblaciones En WIKIPEDIA la enciclopedia libre. España. (Citada 4 de octubre de 2007). Disponible en internet, URL: [//es.wikipedia.org/wiki/geneticadepoblaciones](http://es.wikipedia.org/wiki/geneticadepoblaciones).

¹²⁵ NEI, M. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY. 1987.

4.11.2 Factores de evolución. Los principales factores que influyen en la evolución de las especies, son:

Mutación. Las mutaciones constituyen una de las fuerzas que pueden cambiar las frecuencias génicas de una población, su importancia reside en ser la fuente primaria de variación en las poblaciones, por la creación de nuevos alelos.

Como definición general de mutación se puede decir que se trata de un cambio o de un error en el proceso de autoduplicación de un gen, de tal forma que se origina un nuevo alelo, que se diferencia del original en su efecto sobre la expresión de la característica sobre la que actúa.

La frecuencia con que se producen las mutaciones es en general muy baja. Aunque la frecuencia no es la misma para todos los genes, se puede estimar como cifra promedio entre 10^{-4} y 10^{-8} por generación (una en 10 mil y una en 100 millones de gametos). Con la sola mención de estas cifras se puede inferir que las mutaciones por sí solas, como fuerza que cambia la frecuencia génica, son de poca importancia. Sin embargo, en el proceso evolutivo de las especies donde se considera miles o millones de años, juegan un papel muy importante, como origen de la variación genética¹²⁶.

Selección. La selección se refiere a las tasas diferenciales de supervivencia y reproducción. Y provoca cambios en las frecuencias de ciertos genotipos en la población.

A este proceso de supervivencia y reproducción diferenciales de los distintos tipos de organismos, Darwin le dio el nombre de selección natural por analogía con la selección artificial llevada a cabo por los criadores de animales y plantas cuando seleccionaban deliberadamente algunos individuos de algún tipo preferible a los demás.

La probabilidad relativa de supervivencia y la tasa de reproducción de un fenotipo o genotipo recibe actualmente el nombre de aptitud darwiniana, eficiencia darwiniana o eficacia biológica aunque los genetistas a veces hablan, algo vagamente, de la aptitud de un individuo, el concepto de aptitud se aplica realmente a la reproducción y supervivencia medias de los individuos de una clase fenotípica o genotípica. Debido a sucesos fortuitos ocurridos durante la vida de los individuos, es incluso posible que dos individuos con el mismo genotipo y el mismo ambiente tengan distintas tasas de supervivencia y

¹²⁶ CARDELINO, Ricardo y ROVIRA, Jaime. Mejoramiento genético animal. Montevideo, Uruguay; Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur. p 5.

reproducción. Lo que cuenta es la aptitud de un genotipo considerada como la media de todos sus portadores.

La aptitud es una consecuencia de la relación entre el fenotipo del organismo y el ambiente en el cual vive, de modo que el mismo genotipo tendrá distintas aptitudes en distintos ambientes. Esta diferencia se debe en parte a que la exposición a diferentes ambientes durante el desarrollo da lugar a diferentes fenotipos a partir de los mismos genotipos.

Un aumento del alelo que tenga la mayor aptitud implica que aumente la aptitud media de la población es su conjunto, de modo que la selección también puede describirse como un aumento en la eficacia biológica media. Esta propiedad no conduce necesariamente a una situación óptima de la especie en su conjunto, por que las diversas aptitudes solo se definen en relación con el resto de las aptitudes de la población. Es la aptitud relativa no la absoluta la que aumenta con la selección. La población no se hace necesariamente más grande o crece más rápido, ni resulta menos probable que se extinga¹²⁷.

Migración. Al hablar de migración, estamos involucrando dos procesos: la inmigración y la emigración. La inmigración constituye la llegada de nuevos individuos a una población y la emigración la salida. Interesa fundamentalmente la inmigración y el efecto que puede tener en las frecuencias génicas de la población. Salvo el caso, muy raro y especial, de que los individuos que llegan tengan las mismas frecuencias génicas que ya existen en la población a la cual se incorporan, la inmigración es una causa de cambio en las frecuencias génicas. Puede ser poco o muy importante, dependiendo de la cantidad y la constitución genética de los inmigrantes¹²⁸. El cambio en la frecuencia alélica es proporcional a la diferencia entre las frecuencias de la población receptora y la población donante y la proporción de individuos o alelos provenientes de esta¹²⁹.

Deriva genética. Otra fuerza que puede cambiar la frecuencia génica se conoce como chance, azar, proceso dispersivo o deriva genética a diferencia de los cambios en frecuencia génica por mutación selección y migración, que se pueden describir en dirección y magnitud, los cambios debidos a la deriva genética, siendo resultantes de un proceso de muestreo en una población de tamaño limitado, solamente se pueden predecir en magnitud pero no en dirección.

¹²⁷ GRIFFITHS, ANTHONY J. F.; MILLER, JEFFREY H.; SUZUKI, DAVID T.; LEWONTIN, RICHARD C. y GELBART, WILLIAN M. *En:* Genética. Séptima Edición. McGRAW-HILL / Interamericana de España, S.A.U. 2002. p. 728.

¹²⁸ CARDELINO y ROVIRA Op. Cit. p. 33.

¹²⁹ GRIFFITHS, MILLER, SUZUKI, LEWONTIN y GELBART. Op. Cit. p. 725.

En poblaciones de tamaño grande las leyes de la probabilidad se cumplirán mejor en el muestreo de gametos que dan origen a los individuos de la próxima generación, en otra palabras, estas muestras de gametos serán mas representativas de la composición genética de los padres.

Si tenemos una población de tamaño N donde p y q son las frecuencias génicas, se tiene una probabilidad p de que la población se fije para el alelo A y pierda el alelo a , y una probabilidad q de que se fije para el alelo a y pierda el alelo A . Cuanto menor sea el tamaño de la población, tanto más rápido ocurrirá esta fijación o perdida.

Hay una relación estrecha entre la deriva genética y la consanguinidad, ya que ésta se origina en poblaciones pequeñas, donde forzosamente los individuos que se aparean, a pesar de ser al azar, están emparentados¹³⁰.

4.11.3 Concepto de población. Una población desde el punto de vista genético, no es solamente un grupo de individuos, sino de individuos que se reproducen. Cuando se habla de genética de poblaciones, no hace referencia simplemente a los individuos que la componen, sino también a la transmisión de genes de una generación a la otra.

Los genes de una población tienen continuidad de generación en generación, pero no los genotipos en los cuales ellos aparecen. Un individuo recibe, normalmente una muestra de los genes de cada uno de sus padres, contenidos en los gametos que se unieron para darle origen. Los procesos de segregación y recombinación, descritos por las leyes de Mendel y que tienen como base biológica la meiosis, determinan que lo que se herede sean nuevas combinaciones de los genes de ambos padres; a no ser pequeños segmentos de genes ligados, por estar muy próximos en el cromosoma.

Otra definición muy usada es la de comunidad reproductiva que comparte un patrimonio genético o "gene-pool", que esta constituido por todos los genes que los individuos poseen. Una población se puede representar como un proceso continuo, con un estado diploide (individuos) y uno haploide (gametos). La población puede ser considerada como un súper organismo, continuo en el espacio y en el tiempo, pero compuesto por individuos discontinuos y mortales. Se la puede describir en cualquier momento determinado, consistiendo esa descripción en la media, la variabilidad, las correlaciones, la estructura

¹³⁰ CARDELINO y ROVIRA. Op. Cit. p. 34

familiar, etc., para cada una de las características que se analice. Generalmente, una población no tiene una fecha de nacimiento definida como la tiene un individuo¹³¹.

4.11.4 Frecuencia génica en poblaciones. El término frecuencia génica o frecuencia alélica, se refiere a si un gen o alelo es relativamente abundante o escaso, con referencia al otro gen o genes, alelo o alelos que pueden ocupar un determinado locus.

En una población hay el doble de genes que de individuos, porque todos los individuos son diploides, y un homocigoto para un alelo tiene dos copias de ese alelo, mientras que un heterocigoto sólo tiene una copia. Por ello, en el caso de un locus con dos alelos se calcula la frecuencia de un alelo contando los homocigotos y añadiendo la mitad de los heterocigotos.

$$p = f_{A/A} + \frac{1}{2} f_{A/a} = \text{frecuencia del alelo A}$$

$$q = f_{a/a} + \frac{1}{2} f_{A/a} = \text{frecuencia del alelo a}$$

$$p + q = f_{A/A} + f_{A/a} + f_{a/a} = 1$$

Si hay múltiples alelos, la frecuencia de cada alelo es simplemente la frecuencia de los homocigotos, más la mitad de la suma de las frecuencias de los heterocigotos en los que aparece el alelo.

La frecuencia para un gen puede variar entre los valores de 0 y 1. Si un gen tiene frecuencia 1, quiere decir que el otro alelo no existe en la población, de tal manera que todos los individuos son homocigotos para ese gen y no existe variación ninguna para ese locus. Se dice que este gen está fijado en esta población.

La variación genética existe siempre y cuando los genes tengan frecuencias mayores que 0 y menores que 1. La suma de las frecuencias de los genes que ocupan un mismo locus es siempre igual a 1¹³².

4.11.5 Ley de Hardy Weinberg. En el año 1908 se publicaron de manera independiente, los trabajos del matemático inglés G. H. Hardy y el médico alemán W. Weinberg sobre “Proporciones mendelianas en una población mixta” y “Prueba de la herencia en humanos” respectivamente

¹³¹ Ibid. p. 30.

¹³² Ibid. p. 7.

que presentaban los conceptos que se sintetizan en la ley que lleva sus nombres.

Una manera de formular la ley de Hardy Weinberg es: en una población de tamaño grande, sujeta a régimen de apareamientos aleatorios y en ausencia de selección, mutación y migración, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación, estando las frecuencias genotípicas determinadas por las frecuencias génicas

Se deben aclarar algunos de los términos utilizados en la formulación de la ley de Hardy Weinberg.

Tamaño de la población: La condición es que se trate de una población grande, o sea, lo suficientemente grande como para que los fenómenos de deriva genética o de muestreo de gametos no tengan importancia. Teóricamente, se dice que se trabaja con poblaciones de tamaño infinito, aunque esto sea sólo un concepto. Para dar un ejemplo, si de un apareamiento $Aa \times Aa$ se obtienen cinco progenies, muy difícilmente se tendrá una proporción mendeliana 1:2:1. Si el número es cinco mil, ya se aproxima mucho a las proporciones esperadas.

Apareamientos aleatorios: Significa que cualquier individuo en la población tiene la misma chance de aparearse con cualquier individuo del sexo opuesto. Lo mismo se puede expresar en términos de gametos en vez de individuos, diciendo que todos los gametos masculinos tienen la misma probabilidad de fecundar a todos los gametos femeninos. Esta condición se llama también panmixia y a la población sujeta a este tipo de apareamientos, panmíctica. Es importante aclarar que esto se refiere al locus considerado.

Ausencia de selección, mutación y migración: Significa que no hay ningún factor que quite, agregue o modifique los genes que posee la población. La selección es la eliminación de genes, la mutación es la transformación de genes en otros y la migración es el aporte de nuevos genes a la población. Si algunas de estas fuerzas actúan, no se puede lograr un estado de equilibrio o de estabilidad en la población.

Al estado de una población en que las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes, de acuerdo con las condiciones mencionadas en la ley de Hardy Weinberg, se le llama "equilibrio de Hardy Weinberg". Explica el hecho de que grandes poblaciones con panmixia, aun con alguna presión de selección, permanecen genéticamente variables.

En una población en equilibrio, las frecuencias génicas y las frecuencias genotípicas guardan una relación matemática y cualesquiera que sean las frecuencias genotípicas iniciales, una generación de apareamientos aleatorios es suficiente para establecer el equilibrio; constancia de frecuencias génicas y genotípicas de generación en generación.

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = P + H + Q = 1$$

Donde:

P :es la frecuencia del genotipo AA
H : es la frecuencia del genotipo Aa
Q :es la frecuencia del genotipo aa
 $p = P + \frac{1}{2} H$: es la frecuencia del alelo A
 $q = Q + \frac{1}{2} H$: es la frecuencia del alelo a

Este resultado es consecuencia directa de la definición de apareamientos aleatorios y de las leyes de la probabilidad: la probabilidad o frecuencia del genotipo AA será la probabilidad de que un gameto A masculino con frecuencia o probabilidad p se una con un gameto A femenino con frecuencia o probabilidad p, o sea la multiplicación de ambas probabilidades $p \times p = p^2$, ya que son eventos independientes, de igual manera se calculan las probabilidades de Aa, la suma de las frecuencias Aa y aA, $pq + pq = 2pq$ y de aa $q \times q = q^2$.

4.11.6 Heterocigosidad. Una medida de la variación genética es la magnitud de la heterocigosidad de un locus en una población, que se refiere a la frecuencia total de individuos heterocigotos para ese locus. Si un alelo tiene una frecuencia muy alta y la del resto es cercana a cero, entonces habrá muy poca heterocigosidad porque, por necesidad, la mayoría de los individuos serán homocigóticos para el alelo más abundante. Se espera que la heterocigosidad sea máxima cuando hay muchos alelos de un locus, todos ellos con la misma frecuencia.

La heterocigosidad es simplemente igual a la frecuencia del genotipo A/a de cada población. Cuando se considera más de un locus, hay dos modos posibles de calcular la heterocigosidad. En primer lugar, se puede calcular la media de las frecuencias de los heterocigotos en cada locus aislado. Alternativamente, se puede considerar cada haplotipo como una unidad y calcular la proporción de todos los individuos portadores de dos formas haplotípicas o gaméticas diferentes¹³⁴.

¹³³ Ibid. p. 9.

¹³⁴ GRIFFITHS, MILLER, SUZUKI, LEWONTIN, y GELBART. Op.Cit. p. 721.

4.11.7 Consanguinidad. El concepto de consanguinidad o endogamia se origina del hecho de que muchas veces los individuos que se aparean son parientes. Como parientes podemos definir a dos o más individuos que tiene por lo menos un antepasado común. Los individuos cuyos padres son parientes, pueden recibir el mismo gen por el lado paterno y por el lado materno. El individuo cuyos progenitores están emparentados, se dice que es consanguíneo o que tiene consanguinidad.

En una población, el apareamiento entre parientes se puede originar por apareamientos dirigidos, también surge en poblaciones con apareamientos al azar, porque cuando el tamaño de la población es pequeño resulta inevitable que muchos de los individuos que se aparean son parientes.

En ambos casos, la consecuencia es la aparición de individuos con consanguinidad, lo que lleva a un aumento de la homocigosis¹³⁵.

Coefficiente de consanguinidad. El coeficiente de consanguinidad fue definido por Sewall Write (1922) como “inbreeding coefficient” con el símbolo F . es una propiedad del individuo y cuando se habla de F en una población se refiere al promedio de los coeficientes de consanguinidad de todos los individuos de la población.

Se define el coeficiente de consanguinidad del individuo X , simbolizado F_x , como la probabilidad de que un individuo, para un determinado locus, sea homocigoto idéntico es decir, posea copias del mismo gen. En otras palabras es la probabilidad de que los genes en los gametos que se unen para formar el individuo X sean idénticos por ascendencia. Dos genes a y b , son idénticos por ascendencia si una de las siguientes condiciones se cumple: 1) a es una copia de b (copia aquí es sinónimo de una duplicación meiótica); 2) b es una copia de a ; 3) a y b son ambas copias de un mismo gen en algún antepasado¹³⁶.

Población Endogámica. La probabilidad de la progenie de heredar dos copias genéticas que son idénticas por descendencias es mayor de lo que sería esperado por cruzamiento puramente aleatorio. Esa probabilidad, es llamada coeficiente de endogamia (F) de la población, aumenta cuanto mayor sea el grado de parentesco entre los individuos reproductores

¹³⁵ CARDELINO y ROVIRA Op. Cit. p. 172.

¹³⁶ Ibid. p. 173.

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 origen¹³⁷. La endogamia 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. $F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$ Mide endogamia total

F_{IS} : Endogamia entre individuos. $F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$ Mide la subdivisión poblacional

F_{ST} : Endogamia en poblaciones o índice de fijación. $F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$

Mide la subdivisión geográfica.

Donde:

H_I = Heterocigosidad observada (individuos heterocigotos) en las subpoblaciones

H_S = Heterocigosidad esperada (por H-W) en las subpoblaciones

H_T = Heterocigosidad esperada (por H-W) en la población total

F_{IS} varia en un rango de -1 a 1 donde, -1 significa exogamia, y 1 significa endogamia; mientras que F_{ST} varia de 0 a 1 donde, 0 significa panmixia y 1 significa fijación de alelos alternativos.

4.11.8 Índice de fijación de Wright. Mide la reducción de heterocigosidad 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)¹³⁸.

4.11.9 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

¹³⁷ FUTUYMA, Douglas Joel. Biología Evolutiva. 2ª Ed. Riberão Preto, SBG/CNPq, 1992. p. 631.

¹³⁸ KELLY, L.; POSTIGLIONI, A.; DE ANDRES, D. F.; GAGLIARDI, R.; BIAGETTI, Br.; FRANCO J. Variabilidad genética de los caballos criollos del Uruguay. Uruguay, Archivo de medicina veterinaria. Vol. 34, No. 1, Valdivia. 2002. p.30.

genética, es necesario comprender el patrón de variación genética de la especie, lo que significa evaluar los genotipos de diferentes individuos¹³⁹.

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 o subdivisiones de una especie en unidades locales intercrusantes, es resultado del equilibrio dinámico entre fuerzas que favorecen la diferenciación como la deriva, mutación y selección, diferentes en cada área y fuerzas homogeneizantes como la migración, selección purificadora, selección balanceadora, uniformes en cada área¹⁴⁰. Ella determina el patrón 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.

4.11.10 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.

¹³⁹ WIKIPEDIA FUNDATION, Estructura genética. En WIKIPEDIA la enciclopedia libre. España. (Citada 4 de octubre de 2007). Disponible en internet, URL: [//es.wikipedia.org/wiki/estructuragenética](http://es.wikipedia.org/wiki/estructuragenética).

¹⁴⁰ SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. Biología Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Brasil., 2001. p. 192.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

5.1.1 Laboratorio. La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética, ubicado en el departamento de Genética y Evolución, de la Universidad Federal de São Carlos, localizada en la Vía Washington Luís, Km 235 del municipio de São Carlos.

El municipio de São Carlos, esta localizado en el estado de São Paulo, Brasil. A 244 Km de la ciudad de São Paulo, su posición geográfica esta determinada por las coordenadas 22°01'22" de latitud sur y 47° 53'38" longitud oeste, presenta un clima lluvioso en verano y seco en invierno. La humedad relativa en verano es 76% y en invierno 54%; la altitud media es de 886 m y temperatura media anual de 19,6°C, con precipitación media anual de 1495,1 mm.

Figura 1. Foto del Departamento de Genética y Evolución (A) y el laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética (B)



A

B

Fuente. Esta investigación

5.1.2 Estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas. La estación esta localizada en la Hidroeléctrica de Furnas, en São José da Barra (MG), fue creada en 1975 y ocupa, actualmente, 93.931 m². Esta compuesta por un pabellón de hipofización, un laboratorio de microscopia, un laboratorio de química, un laboratorio de ictiología que cuenta con una colección de muestras de especies de peces ocurientes en el reservorio de Furnas, cuenta con 212 estanques externos, con una área total de 24.880 m², distribuidos de la siguiente manera:

- Tiene 36 estanques, 34 con 200 m² cada uno y dos de 1.000 m² cada uno construidos en concreto con fondo de arcilla compactada para mantener reproductores, producir plancton, larvicultura y alevinaje.
- Cuenta además con 160 estanques, 100 con 7,44 m² cada uno y 60 con 9,8 m² cada uno en concreto que se usan para alevinaje.
- Un tanque circular de concreto con 10 metros de diámetro, usado para poner los reproductores después de la hipofización
- Tiene también 15 tanques cavados en tierra, de los cuales, nueve totalizan un área de 2.770 m² con tamaños que varían de 200 m² a 690 m². Estos se utilizan para larvicultura, alevinaje y sirven para la observación del crecimiento de peces. Los seis restantes tienen un área total de 11.900 m², con tamaños diferentes entre 1.900 m² a 2.770 m² que sirven para mantener reproductores de peces migradores, para larvicultura y alevinaje
- Un lago colector con 6.852 m², utilizado en el cultivo de tilapias, que sirven de alimento para los peces carnívoros y para alimentar reproductores.

Figura 2. Foto de los tanques de cultivo (A) y de los estanques de hipofización de la piscicultura de Furnas (B).



A



B

Fuente. Esta investigación

En la Estación de Hidrobiología y Piscicultura de Furnas existen las siguientes especies de peces migradores: dourado (*Salminus maxillosus*), piau (*Leporinus frederici*), piapara (*Leporinus elongatus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*), pacu caranha (*Piaractus mesopotamicus*), piraicanjuba (*Brycon orbygnyanus*), jaú (*Paulicea lutkeni*) y el pintado (*Pseuplatystoma corruscans*). Los reproductores, machos y hembras son capturados en ríos, evitando el uso de reproductores oriundos de la estación de piscicultura, para que no haya problemas de consanguinidad.

5.1.3 El río Mogi-Guaçu en la región de cascadas de Emas, Pirassununga. El río Mogi-Guaçu nace en el estado de Minas Gerais, municipio de Cambui, a una altitud de 1650 m. posee una extensión total de 473 km, de los cuales 95,5 km. son recorridos en el estado de Minas Gerais. Atravesando la Sierra de Mantiqueira, entra en el estado de São Paulo donde recorre 377,5 km. de la nacimiento a Foz que ocurre en el río pardo. En el municipio de Viradouro el río sufre un desnivel de aproximadamente 1160 m ocasionando en muchos puntos grandes cascadas. El río Mogi-Guaçu, conjuntamente con los ríos Pardo y Grande constituye parte de la cuenca del Alto Río Paraná.

La cascada de Emas esta localizada en el kilómetro 255 del río Mogi-Guaçu, a 560 m de altura y a 21° 58' S y 47° 75' W donde el río tiene aproximadamente, 80 m de ancho y de 2 a 3 m de profundidad, la temperatura del río en esta región sufre una variación anual de cerca de 12° C a 31° C y el pH oscila entre 7 y 7,7, la turbidez, el color y la transparencia varían con las condiciones pluviométricas por lo tanto, en los meses mas lluviosos el río queda completamente turbio y de color marrón debido a la gran cantidad de sedimentos en suspensión¹⁴¹.

Figura 3. Fotos de la cascada de Emas en el río Mogi-Guaçu Pirassununga, SP.



Fuente. Esta investigación

5.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se evaluaron muestras de DNA de peces de la especie *Prochilodus lineatus*, tomadas del banco de tejidos y DNA del Laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética, perteneciente al Departamento de Genética y Evolución de la Universidad Federal de San Carlos, SP, Brasil.

¹⁴¹ GODOY, M. P. Op. Cit. p. 447.

5.3 TÉCNICAS DE LABORATORIO.

5.3.1 Extracción de DNA de tejidos sólidos. Para la extracción de DNA genómico de tejidos de hígado y aletas se utilizó una solución de digestión (NaCl; EDTA; Tris-HCl; RNAsa y SDS) y una solución de extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, mediante la técnica descrita por Sambrook et al¹⁴², con algunas modificaciones.

Aproximadamente 100 mg de tejido se colocaron en un crisol y se maceraron en nitrógeno líquido, con un mortero. Después de la maceración, se adicionaron cinco ml de solución de digestión compuesta por NaCl 0,4 M; EDTA 0,1 M pH 8,0; Tris HCl 0,01 M; SDS 0,1%; RNAsa 100 µg/ml. El material fue transferido a tubos plásticos de 15ml, posteriormente, se mantuvo por 90 minutos en baño maría a 37°C, y se homogeneizó la mezcla periódicamente.

Después, se adicionaron 100 µl/ml de Proteinasa K a la solución y se llevó el tubo a baño maría a 42°C por dos horas. Durante la permanencia en baño maría, se homogeneizó periódicamente el material por medio de movimientos suaves realizados con las manos. Esta fase tuvo como finalidad promover la digestión de componentes celulares como lípidos, proteínas y RNA.

Después de esta etapa, el tubo permaneció a temperatura ambiente; luego se adicionaron cinco ml de solución de extracción, compuesta por fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción de 25:24:1. El material se agitó suavemente por aproximadamente 20 minutos y, posteriormente, se centrifugó por 15 minutos a 10.000 rpm. El fenol precipita restos de tejidos al fondo del tubo, junto con las proteínas digeridas.

La fase acuosa que contenía el DNA y residuos de proteínas permaneció en una capa superior separada del fenol por una fina película. Los tubos se retiraron cuidadosamente de la centrifuga para que las fases no se mezclaran y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo con el uso de una micro pipeta. Esta etapa fue realizada con bastante cuidado para que la interfase no fuera aspirada.

A la solución transferida se adicionó NaCl 1 M para promover la precipitación de las proteínas y posteriormente se adicionó dos volúmenes de etanol 100 % frío. El tubo fue vertido algunas veces para promover la precipitación del DNA y, en seguida, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos. El DNA en contacto con el etanol forma una nube que frecuentemente puede ser observada a simple vista, aun antes de la centrifugación. En caso de no aparecer, después de la etapa de centrifugación puede ser visualizado un pellet en el fondo del tubo.

¹⁴² SAMBROOK, J. y RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. 2001

Se descartó el sobrenadante y luego se adicionaron dos ml de etanol 70 % frío, para retirar los residuos de reactivos. El material se centrifugó por cinco minutos y el sobrenadante fue descartado cuidadosamente para que el pellet no se desprendiera del fondo del tubo. El DNA se mantuvo en un proceso de secado durante toda la noche en estufa a 37°C y posteriormente se resuspendió en 300 µl de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8,0), después se transfirió a tubos plásticos de un ml y se almacenó en congelador a temperatura de -20°C.

5.3.2 Cuantificación de DNA genómico. La cuantificación del DNA fue realizada mediante la elaboración de un gel de agarosa al 0.8%.

Al gel se le adicionó bromuro de etidio y después de la solidificación, se aplicaron, las muestras y el marcador de peso molecular de 100pb, luego el gel se sometió a electroforesis durante treinta minutos a 80 voltios. Con posterioridad a la corrida electroforética, el gel fue observado en transiluminador y su imagen fue capturada por el sistema de foto documentación Edas 290 (kodak). (Figura 6)

Figura 6. Transiluminador y sistema de foto documentación Edas 290 de Kodak



Fuente. Esta investigación

El DNA impregnado con bromuro de etidio sobre la luz ultra violeta, emitida por el transiluminador, permitió la visualización de una banda de alto peso molecular, correspondiente a la molécula de DNA. La estimativa de la cantidad de DNA se realizó por medio de la comparación entre el tamaño e intensidad de la banda del marcador de peso molecular y el de las muestras.

5.3.3 Reacción de PCR para marcadores microsatélites. Después de la cuantificación, se diluyó 50 µl de DNA para obtener una alícuota de 50 ng/µl, para uso diario, el resto fue guardado en el banco de DNA del laboratorio.

Se amplificó un total de diez loci microsatélites de los cuales; Pc04, Pc07, Pc10, Pc11, Pc12, Pc14, Pc16 y Pc17 se amplificaron con el uso de Primers descritos para la especie *Prochilodus costatus*¹⁴³ y dos loci PI y Plin, se amplificaron con primers descritos para *Prochilodus lineatus*¹⁴⁴; Los loci fueron aislados en el Laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética de la Universidad Federal de San Carlos. SP, Brasil. (Tabla 1)

Tabla 1. Descripción de los loci microsatélite, secuencias de los Primers y amplitud alélica.

Loci microsatélites	Secuencia de los de primers	Amplitud alélica (pb)
Pc04	F: GCCTTTTATATGGCAGTATC R: GTTCTGTTTTCCAGTTAGTG	130-160
Pc07	F: TCTCACAGAGACTAACATGA R: TCTAGGGTTCACAACTTC	228-300
Pc14	F: CGTGAATGTGCTTTATATGC R: AATGCCATTTCTGATTAAGG	166-202
Pc17	F: ACGGTAATGATGGGTATTTG R: CGTTGTTTAACCCTTCTCAG	140-200
PI	F: TGACTGTGAACACGGTCACGC R: ACACAAGTAGAACATACCTCTG	170-220
Plin	F: GTCCATCACACGAGAAAC R: CTCCTCCCTTTCCTAATG	140-230

Las reacción de amplificación de los loci microsatélites fue realizada en un termociclador GENEAMP PCR System 2400 – Perkin Applied Biosistemas o MJ Research, INC modelo PTC 100 Programable Thermal Controller. (Figura 7)

¹⁴³ CARVALHO COSTA, Luis Fernando. Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) na bacia do rio São Francisco, região de três márias (MG). Tese de mestrado. Universidad Federal de Sao Carlos. 2006. p. 70.

¹⁴⁴ HATANAKA, T; HENRIQUE-SILVA, F y GALETTI Jr, P. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in Neotropical fish *Prochilodus*. Cytogenet Genome Res. Vol. 98, 2002, p. 309.

Figura 7. Termociclador modelo PTC 100



Fuente. Esta investigación

La reacción de PCR para la amplificación de las regiones con los microsatélites fueron preparadas con un volumen final de 10 μ l que contenía: 1 μ l de tampón de reacción 10X (Tris – HCL 200 mM pH 8,4 y KCL 500 mM *Invitrogen Life Technologies*); 0,3 μ l de MgCl₂ 1,5 mM; 0,8 μ l de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 2,5 mM, 1,0 μ l de cada *primer* (*forward* e *reverse*) 10 pmoles/ μ l, 0,2 μ l de *Tag* DNA polimerasa , 2 μ l de DNA 50 – 150 ng y 3,7 μ l de agua extra pura. Figura 8.

Figura 8. Preparación de la reacción de PCR



Fuente. Esta investigación

Las muestras de DNA fueron sometidas a reacción de amplificación por PCR, en un termociclador programado para un ciclo dependiendo del locus a amplificar, los ciclos para cada locus están descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción del ciclo de PCR para cada locus estudiado y temperatura de hibridación de los primers.

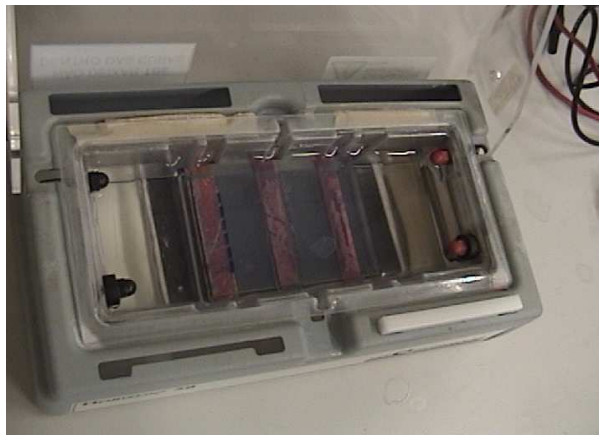
Ciclo	Locus						
	PC04	PC07	PC14	PC17	PL	PLI	
Desnaturalización inicial	94°C / 4 min	94°C / 4 min	94°C / 4 min	94°C / 4 min	94°C / 5 min	94°C / 5 min	
35 ciclos	Desnaturalización	94°C / 30 s	94°C / 30 s	94°C / 30 s	94°C / 30 s	94°C / 1 min	94°C / 1 min
	Hibridación	57°C / 30 s	48,1°C / 30 s	47°C / 30 s	53,1°C / 30 s	56°C / 1 min	56°C / 1 min
	Extensión	72°C / 30 s	72°C / 30 s	72°C / 30 s	72°C / 30 s	72°C / 1 min	72°C / 1 min
Extensión final	72°C / 20 min	72°C / 20 min	72°C / 20 min	72°C / 20 min	72°C / 20 min	72°C / 20 min	

Fuente. Esta investigación

5.4 GENOTIPADO DE LOCUS MICROSATÉLITES

5.4.1 Electroforesis en gel de agarosa 1%. Los fragmentos amplificados mediante la reacción de PCR fueron observados en gel de agarosa al 1% (1gr de agarosa, en 100 ml de TBE 1X, y se adicionó 4 µl de bromuro de etidio), se aplicó los productos de la reacción de PCR y se usó un marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen Life Technologies*) (Figura 9), luego se programó la fuente para la corrida electroforética a 100 Voltios durante aproximadamente una hora.

Figura 9. Deposito de las muestras en gel de agarosa 1% para verificar amplificación.



Fuente. Esta investigación

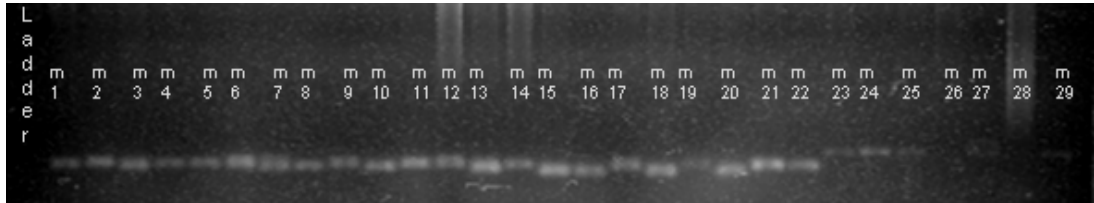
El tiempo de duración de la electroforesis dependió del tamaño del fragmento amplificado de tal manera que los fragmentos de menor tamaño requirieron menor tiempo de corrida electroforética que los fragmentos de mayor tamaño, además, se pudo monitorear, mediante la observación y seguimiento de la migración del color azul que ofrece el Azul de Bromofenol, que es mezclado con las muestras al momento de la aplicación.

Posterior a la migración electroforética, el gel fue observado en transiluminador de luz ultravioleta para verificar la amplificación de los fragmentos y su imagen fue capturada por el programa de fotodocumentación EDAS 290 Kodak.

Esta etapa fue importante para verificar si hubo amplificación de los fragmentos esperados. Para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados, se comparó las bandas producidas por el marcador de peso molecular, con las bandas producidas por las muestras, además de esta manera también se pudo establecer la presencia o ausencia de polimorfismo del locus en la población por medio de la

observación de diferencias en los tamaños de los fragmentos amplificados para cada individuo. (Figura 10)

FIGURA 10. Fragmentos amplificados mediante reacción de PCR para el locus Pc04 de las muestras de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas donde se observa el polimorfismo de este locus.



Fuente. Esta investigación

Sin embargo, 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.

Para el genotipado de los locus microsatélites y hacer la lectura de las bandas obtenidas se usó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida que es un gel mucho más poroso que ofreció una mayor separación de las bandas de acuerdo a su peso molecular de tal manera que fue posible distinguir los diferentes alelos, aun cuando estos difieran en pocos pares de bases.

5.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida, tinción con nitrato de plata. Este procedimiento fue realizado mediante el protocolo descrito por COMINCINI¹⁴⁵. Los siguientes ítems resumen las principales etapas desarrolladas en la electroforesis vertical en poliacrilamida.

❖ **Tratamiento de las placas.** Inicialmente se realizó un lavado del equipo de electroforesis. Las placas de vidrio una grande y otra pequeña se sumergieron en una solución NaOH 1N durante 30 minutos.

Posteriormente, estas se lavaron con una esponja suave usando detergente común. Los movimientos fueron delicados y en forma circular por toda la superficie de las placas. En seguida, las placas se enjuagaron, primero, con agua corriente utilizando una esponja y, posteriormente, con agua destilada. Después del lavado estas se secaron y en seguida se limpiaron con papel toalla humedecido con etanol puro.

¹⁴⁵ COMINCINI, S., LEONE, P., REDAELLI, L., DE GIVLI, L., ZANG, Y., FERRETI, L. Characterization of bovine microsatellites by silver staining. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, Vol. 112, 1995, p. 418.

Posterior al lavado de las placas, la placa de mayor tamaño recibió un tratamiento especial para que el gel permaneciera fijado en su superficie, el tratamiento consistió en aplicar, con el uso de una micro pipeta, la solución “Bind-Silane” compuesta por.

3 μ l de Bind-Silane
5 μ l de ácido acético glacial
1 ml de etanol puro

Esta solución se esparció por toda la superficie de la placa en un sentido único, con el uso de papel toalla. Es importante, que la parte superior de la placa, donde fue encajado el peine, no contenga Bind-Silane, para que el peine no se adhiriera a la placa.

Después de este tratamiento, la placa se secó por aproximadamente 30 minutos, y luego se retiró el exceso de la solución con papel toalla, humedecido con etanol puro. El papel se pasó sobre la placa en sentido perpendicular al de la etapa anterior.

La placa de menor tamaño también recibió un tratamiento especial, que consistió en utilizar una solución para evitar la adhesión del gel en su superficie, un ml de “Repel” puro se esparció a lo largo de toda la superficie de la placa, con el uso de un papel toalla. Este producto permaneció secándose por un período aproximado de 10 minutos. En seguida, se retiró el exceso de “Repel” con papel humedecido con etanol puro.

Después de la preparación de las placas, estas pudieron ser encajadas y montadas de forma apropiada para recibir el gel de poliacrilamida. Se ubicó los espaciadores en los laterales de la placa de mayor tamaño, posteriormente se ubicó la placa de menor tamaño sobre la otra y se cubrió los laterales de las dos placas, con cinta, para evitar que al momento de la aplicación del gel en el espacio formado entre las dos placas, este se derramara.

A continuación se procedió a la preparación del gel.

❖ **Preparación del gel.** La preparación del gel de poliacrilamida consistió en mezclar en un beaker los siguientes reactivos.

4,73 g de Acrilamida
0,16 g de Bisacrilamida
84 μ l de TEMED
700 μ l de Persulfato de amonio
3,3 ml de TBE 20x modificado
Agua extra pura hasta completar 70 ml

Es importante resaltar que durante este proceso el TEMED y el Persulfato de amonio se adicionaron por último, pues ellos aceleran el proceso de polimerización.

Después de la preparación de la solución, esta se aspiró, con una jeringa de 60 ml y se inyectó en el espacio formado entre las placas. El gel se aplicó de forma lenta para evitar la formación de burbujas. En esta etapa, la placa permaneció inclinada para facilitar la aplicación del gel.

Cuando la solución llenó todo el espacio entre las placas, se colocó el peine de forma invertida (con los dientes volteados para arriba) y se esperó por aproximadamente 30 minutos para que ocurriera la polimerización. Para controlar este proceso se monitoreó el resto de gel que quedo en el beaker, observando su solidificación.

❖ **Montaje del gel en la cámara de electroforesis.** Las placas que contenían el gel polimerizado se encajaron en el soporte de la cámara de electroforesis (Figura 11). En seguida se adicionó TBE 1,2 X (modificado) en el lugar indicado y se retiró el peine con cuidado, limpiando el canal formado, para que no quedaran restos de gel que pudieran obstruir la aplicación de las muestras de DNA. Para la limpieza de los canales se utilizó el mismo peine y también una pipeta tomando TBE de la cámara, haciendo movimientos rápidos y precisos para que un espacio se creara en el lugar.

Figura 11. Cámara vertical para electroforesis en gel de poliacrilamida



Fuente. Esta investigación

En seguida los electrodos se encajaron y la placa se precalentó durante una hora a 55 W. Posteriormente, con la fuente desconectada, se colocó el peine con los dientes hacia el gel, de modo que estos apenas entraran en la superficie.

❖ **Aplicación de las muestras y corrida electroforética del DNA.** Se aplicó de uno a cinco µl de producto PCR, dependiendo de la intensidad de la banda amplificada en el gel de agarosa, mezclado con un µl de tampón de corrida o azul de bromofenol. Los primeros canales, se dejaron libres ya que pueden presentar leves distorsiones después de la corrida electroforética.

Se aplicó un marcador de peso molecular de 10pb para posteriormente identificar el tamaño de los alelos. Los electrodos se encajaron en la cámara y la fuente se programó por aproximadamente una hora y 30 minutos a 55W. El tiempo de corrida electroforética dependió del tamaño del fragmento amplificado.

Después de la corrida electroforética, las placas se retiraron de la cámara para la tinción con nitrato de plata. Las placas se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente para proceder a su separación.

Antes de iniciar la tinción, se lavaron todos los recipientes, bandejas, con agua destilada, se llenó uno de ellos con aproximadamente un litro y medio de agua destilada y se reservó.

❖ **Tinción del Gel de poliacrilamida.** Las etapas a seguir resumen los principales pasos desarrollados en el proceso de tinción del gel de poliacrilamida con nitrato de plata.

1) Pretratamiento. Fijación del Gel. En un recipiente se preparó la solución fijadora: 1,5 litros de solución al 10% de etanol y ácido acético glacial.

150 ml de alcohol etanol
150 ml de ácido acético glacial
Agua destilada hasta completar 1,5 litros

Se separaron las placas con el uso de una espátula y se sumergió la placa de mayor tamaño en la solución, durante 20 minutos.

2) Lavado y Oxidación. En seguida se retiró el gel del fijador y se sumergió en agua destilada por un minuto y medio. Posteriormente, se colocó el gel en 1,5 litros de solución de ácido nítrico 1%.

23 ml de ácido nítrico 65%
1477 ml de agua destilada

La placa se mantuvo en esta solución durante tres minutos y se volvió a lavar con agua destilada por un minuto y medio.

3) Impregnación con Nitrato de Plata. Se sumergió el gel en 1,5 litros de solución que contenía.

1,5 g de nitrato de plata
2 ml de formaldehído 37%
Agua destilada hasta 1,5 litros

La placa permaneció en esta solución por 30 minutos. Posteriormente se lavó con agua destilada por 30 segundos. Hasta esta etapa el gel permaneció prácticamente inalterado. Por eso todos estos tratamientos químicos fueron cruciales para que la revelación ocurriera con éxito.

4) Revelación. Durante la revelación, el gel permaneció sumergido en 1,5 litros de solución que contenía.

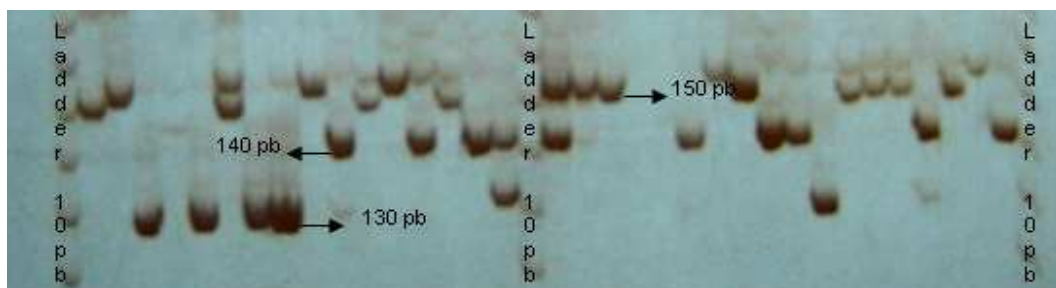
11,13 g de carbonato de sodio anhidro
2 ml de formaldehído 37%
7,5 ml de tiosulfato de sodio penta hidratado 200 mg/l.
1,5 litros de agua destilada

En esta etapa, los alelos fueron observados poco a poco, asumiendo una coloración ceniza, que se acentuó conforme permaneció en la solución. Se monitoreó el tiempo y la coloración del gel, interrumpiendo el proceso de revelación cuando las bandas asumieron el patrón deseado.

5) Interrupción y Lavado. La placa se sumergió en 1,5 litros de la solución de fijación utilizada en el prétratamiento por aproximadamente tres minutos.

La determinación del tamaño de los fragmentos amplificados mediante la PCR se realizó directamente sobre el gel de poliacrilamida por medio de la comparación de las bandas generadas por el marcador de peso molecular y las de los alelos de cada individuo en el locus estudiado (Figura 12).

FIGURA 12. Fragmentos amplificados mediante reacción de PCR para el loci Pc04 de las muestras de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas, en gel de poliacrilamida.



Fuente. Esta investigación

Posteriormente la placa se lavó en 1,5 litros de NaOH 1% hasta que el gel se desprendió de la superficie.

Por ser esta, una técnica de electroforesis más resolutive se pudo distinguir entre los alelos que difieren en pocos pares de bases y se identifico con mayor facilidad a los individuos con genotipo heterocigótico.

Posteriormente, el tamaño de los alelos presentes en cada locus para cada individuo fue registrado en una matriz de datos para ser analizados mediante programas estadísticos diseñados para análisis genéticos.

Cada software de análisis genético requiere un diseño específico de la matriz de datos compatible con sus requerimientos para ser ingresada al programa y así tener éxito en los análisis. (Anexo A)

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las frecuencias alélicas fueron estimadas con los programas GENEPOP 3.3¹⁴⁶ y TFPGA,¹⁴⁷ con estos mismos programas se determino el equilibrio de Hardy Weinberg ($p < 0.05$).

La heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) para cada locus fue calculada mediante el programa GENEPOP 3.3 y los valores de significancia para estas variables fueron calculadas mediante el programa STATISTICA 6.0.¹⁴⁸

La diferenciación poblacional fue estimada por los índices de fijación de Wright¹⁴⁹ F_{ST} y F_{IS} , para cada locus entre las poblaciones de acuerdo con el método basado en varianza de Weir y Cockerham¹⁵⁰ usando el programa FSTAT 2.9.3.2¹⁵¹. Para la estimación del grado de diferenciación genética entre las poblaciones, fueron calculados los valores de F_{ST} para los pares de poblaciones y su significancia estadística calculada mediante tests de permutación usando intervalos de confianza de 95% por Bootstrap, sobre los loci a través de FSTAT.

¹⁴⁶ RAYMOND, M. & ROUSET, F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact test and ecemenicism. Journal Heredity, Vol. 86, 1995, p. 248.

¹⁴⁷ MILLER, M. TFPGA, A Windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetics data. Version 1.3. Dep.. of Biological Sciences, Northern Arizona University, 2000.

¹⁴⁸ STAR SOFT INC. STATISTICA (Data analysis software system) version 6.0. disponible en internet, URL. www.statistica.com.

¹⁴⁹ WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. VI. Variability within and among natural populations. Univ. of Chicago Press, Chicago. 1978.

¹⁵⁰ WEIR, B. S. Y COCKERHAM, C. C. Estimating F-statics for the analysis of population structuring. Evolution, Vol. 38, 1984. p. 1361.

¹⁵¹ GOUDET J. FSTAT a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3. Disponible en Internet URL, <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

Los valores de identidad y distancia genética de Nei¹⁵² ¹⁵³ fueron calculadas mediante el programa TFPGA.

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

5.6 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

Ho: De acuerdo con la información molecular con microsatélites, los individuos de la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas no presentan variabilidad genética con relación a los individuos capturados en la cascada de Emas en el río Mogi-Guaçu.

H1: De acuerdo con la información molecular con microsatélites, los individuos de la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas presentan variabilidad genética con relación a los individuos capturados en la cascada de Emas en el río Mogi-Guaçu.

5.7 VARIABLES EVALUADAS

5.7.1 Frecuencias alélicas. La frecuencia de un alelo es la proporción de esa forma alélica del gen entre todas las copias del gen en la población. En una población hay el doble de genes que de individuos, por que todos los individuos son diploides, y un homocigoto para un alelo tiene dos copias para ese alelo, mientras que un heterocigoto solo tiene una copia.

Se calcula mediante el conteo del número de copias del alelo en la población, dividido por la suma de todos los alelos en esa población.

5.7.2 Heterocigosidad. La heterocigosidad de un locus en la población se refiere a la frecuencia total de individuos heterocigotos para ese locus. Si un alelo tiene una frecuencia muy alta y la del resto es cercana a cero, entonces habrá muy poca heterocigosidad porque, por necesidad, la mayoría de los individuos serán homocigóticos para el alelo más abundante. Se espera que la heterocigosidad sea máxima cuando hay muchos alelos en un locus, todos ellos con la misma frecuencia.

Heterocigosidad observada: Se calculo según Brown & Weir¹⁵⁴ mediante el calculo del número de individuos que son heterocigotos para un dato del locus génico.

¹⁵² NEI, M. Genetic distances between populations. Am. Nat. Vol. 106, 1972. p. 289.

¹⁵³ NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. Vol. 89, 1978. p. 588.

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

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

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

Heterocigosidad esperada. Proporción de individuos que serian heterocigotos si la población estuviese en equilibrio Hardy Weinberg; se calculo según Nei¹⁵⁵.

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

Donde p_i = Frecuencia estimada del i ésimo alelo

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

5.7.3 Estadísticos f de Wright. Fueron evaluadas dos medidas de diferenciación poblacional.

F_{IS} : La deficiencia o exceso de heterocigotos promedio en cada población. Es una forma de medir el desvío del equilibrio de Hardy Weinberg debido a patrones no aleatorios de apareamiento. Su rango varía de -1 a 1. Se calculo mediante la formula.

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

H_o = heterocigosidad observada.

H_e = heterocigosidad esperada

F_{ST} : El grado de diferenciación génica entre las poblaciones, en función de las frecuencias alélicas. Mide el grado de subdivisión a través de sus efectos de aumento de endogamia o reducción de heterocigosis con respecto a la misma población 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 la siguiente tabla.

¹⁵⁴ 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. 223.

¹⁵⁵ NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. In: Genetics., Vol. 89, 1978. p. 583

Cuando F_{ST} es la diferenciación genética es.

De 0 a 0,05	pequeña
De 0,05 a 0,15	moderada
De 0,15 a 0,25	grande
> 0,25	muy grande

5.7.4 Distancia e identidad genética. Es una medida estadística que provee una escala estandarizada para la cuantificación de las diferencias. Mide la deferencia entre dos genes, proporcional al tiempo de separación de un ancestro común.

5.7.4.1 Distancia genética. Medida de la semejanza genética entre dos poblaciones, fue estimada según Nei¹⁵⁶.

$$D = \ln I$$

Donde I = índice de identidad genética

Este valor varía de 0, más similares hasta 1, menos similares

5.7.4.2 Índice de identidad genética (I). Fue calculado según Nei¹⁵⁷, el cual utiliza las frecuencias alélicas de los 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 2 genes escogidos al azar en la población x ser idénticos.

$j_y = \sum y_i^2$ = probabilidad de 2 genes escogidos al azar en la población y ser idénticos.

$j_{xy} = \sum x_i y_i$ = probabilidad un gen de la población x y un gen de la población y escogidos al azar ser idénticos.

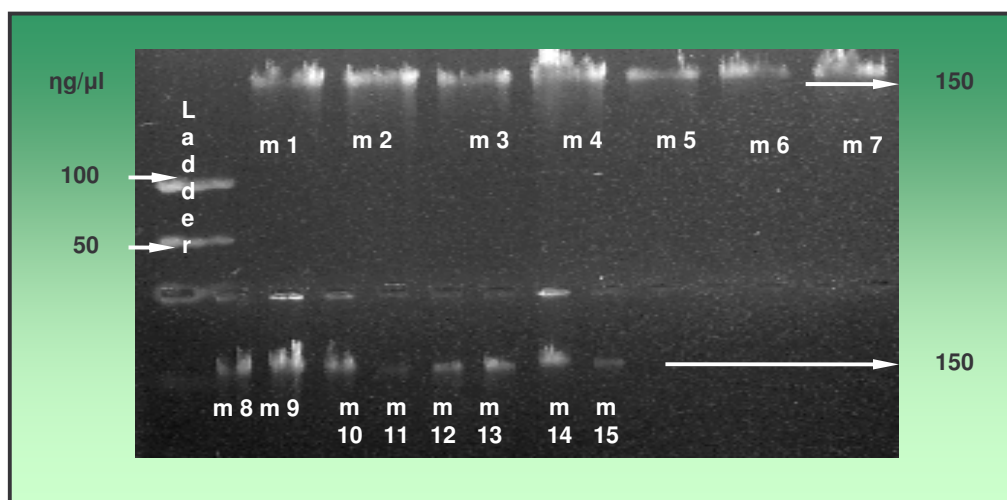
¹⁵⁶ NEI, Op Cit. p. 584.

¹⁵⁷ NEI. Op Cit. p. 586

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Después de la extracción del DNA, se realizó la cuantificación en gel de agarosa al 0.8%, el DNA extraído tuvo una concentración aproximada de 150 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$, cantidad suficiente para realizar las reacciones de PCR necesarias para esta investigación. (Figura 13)

FIGURA 13. Cuantificación de DNA en gel de agarosa 0.8 % de las muestras de *Prochilodus lineatus* de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas.



Fuente. Esta investigación

6.1 VARIABILIDAD GENÉTICA INTRA POBLACIONAL

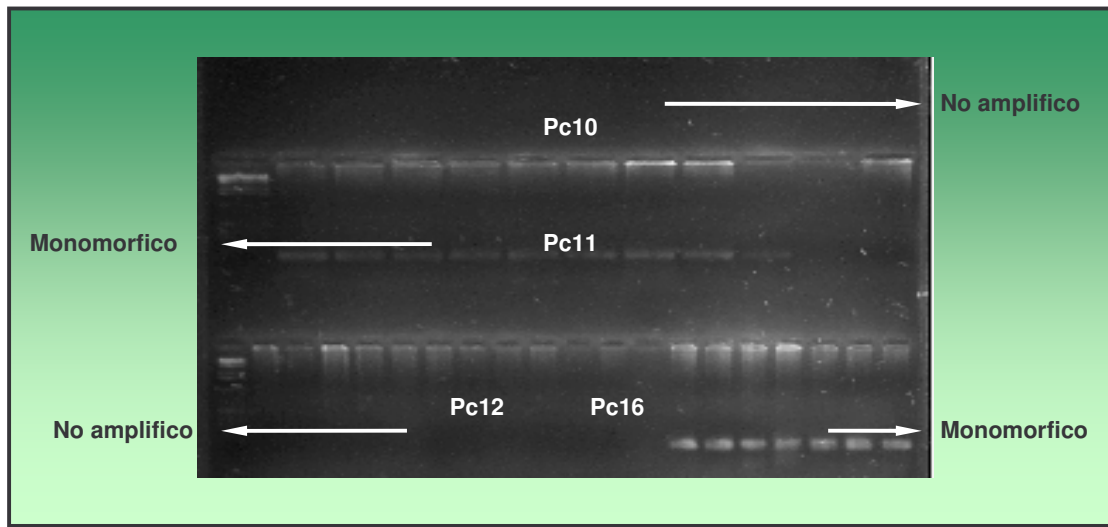
En el presente estudio se amplificaron 10 loci microsatélites, de los cuales seis fueron incluidos en los análisis debido a que los loci Pc10 y Pc12 no amplificaron y en los loci Pc11 y Pc16 no se detectó polimorfismo (Figura 14).

De acuerdo con estos datos la proporción de loci polimórficos para este estudio fue de 0.6, 60%.

La detección de polimorfismo intra e inter poblacional en las dos poblaciones estudiadas fue evaluada a partir de seis loci microsatélites, de los cuales uno es compuesto (Pc04), uno hexanucleotido (Pc07), dos dinucleotidos (Pc14, Plin) uno tetranucleotido (Pc 17) y uno pentanucleotido (PI).

Para la amplificación vía PCR de los loci microsatélites sometidos a análisis estadísticos fue necesario la utilización de *primers* específicos, que flanquean la región del DNA que contiene la secuencia repetitiva.

FIGURA 14. Loci amplificados mediante reacción de PCR que no se incluyeron en el análisis



Fuente. Esta investigación

Los seis loci microsatélites fueron sometidos a reacción de PCR en un total de sesenta y cuatro individuos de *Prochilodus lineatus*, 32 muestras de DNA provenientes de individuos de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas y 32 muestras de DNA provenientes de individuos de la cascada de Emas en el río Mogi-Guaçu, sin embargo algunos individuos no presentaron resultados de amplificación cuando fueron analizados en gel de agarosa 1% después de la reacción de PCR por lo tanto el número de individuos analizados por locus es diferente en cada población. (Tabla 4)

Los seis loci microsatélites analizados resultaron polimórficos debido a que la frecuencia de sus alelos fue menor a 0,95, y un gen polimórfico es aquel para el cual el alelo más común tiene una frecuencia de menos de 0,95.

De esta manera fue posible distinguir ochenta y cuatro alelos para los seis *primers* estudiados, el número de alelos por locus varió en un rango de seis alelos para el locus Pc07 y veintidós alelos para el locus Plin y el número promedio de alelos por locus fue catorce.

En la población de la estación de hidrobiología y piscicultura Furnas se detectó un total de cincuenta y tres alelos para los seis loci analizados y en la población de

Mogi-Guaçu se detecto un total de sesenta y nueve alelos para los seis loci analizados. (Tabla 3)

Tabla 3. Numero de alelos por locus y por población para los seis loci microsatélites analizados.

Locus	Furnas	Mogi-Guaçu	Total por locus
Pc04	7	12	12
Pc07	4	5	6
Pc14	8	12	16
Pc17	12	14	16
PI	8	13	13
Plin	14	13	21
Total por Población	53	69	84

Fuente. Esta investigación

Del total de alelos encontrados en las dos poblaciones, cuarenta y seis son alelos raros o poco comunes, o sea alelos que se encuentran solamente en una población o aquellos cuyas frecuencias alélicas son menores a 0.005.

En la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas se detectó un total de quince alelos raros, los cuales representan el 28.30% del total de alelos presentes en esta población y en la población de Mogi-Guaçu se encontró treinta y uno de estos alelos los cuales representan el 44.93% del total de los alelos de esta población. (Tabla 4)

El valor promedio de alelos por locus en las poblaciones fue de 8.83 para la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas y 11.5 para el río Mogi-Guaçu, y el promedio de alelos raros o poco comunes por población fue de 2.5 y 5.17 respectivamente.

TABLA 4: Descripción del número de individuos analizados por locus, número de alelos por locus y número de alelos exclusivos por locus para las dos poblaciones.

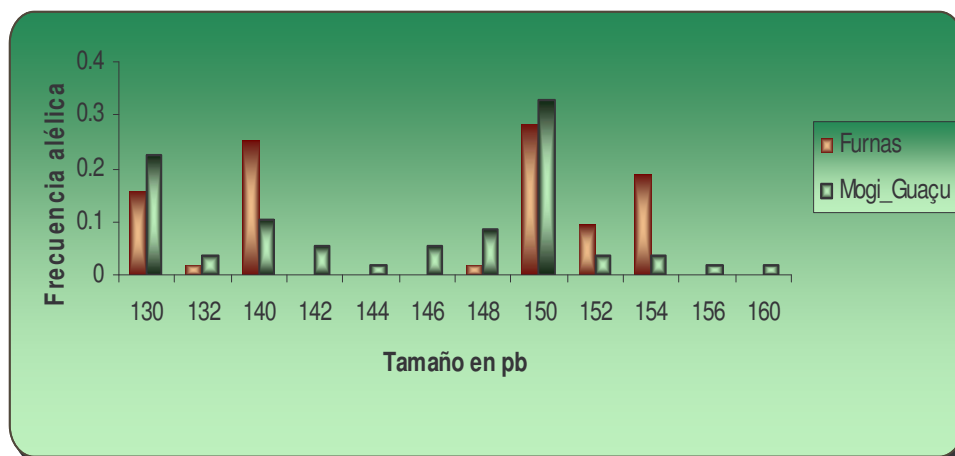
Población	Pc04	Pc07	Pc14	Pc17	PI	Plin	Media	Total	%
Piscicultura de Furnas									
No de individuos	32	31	31	30	32	31			
No. de alelos	7	4	8	12	8	14	8,83	53	
No. de alelos exclusivos	0	1	4	2	0	8	2,5	15	28,30
Río Mogi-Guaçu									
No de individuos	29	26	31	31	31	21			
No. de alelos	12	5	12	14	13	13	11,5	69	
No. de alelos exclusivos	5	2	8	4	5	7	5,17	31	44,93

Fuente. Esta investigación

6.1.1 Frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas se estimaron mediante el cálculo de la proporción de una forma alélica del gen entre todas las copias del gen dado en la población.

En el locus Pc04, la frecuencia alélica mas alta fue para el alelo de 150 pb, en las dos poblaciones, sin embargo el valor de frecuencia para la población de Mogi-Guaçu fue mayor con un valor de 0,328, que significa que el 32,8% de la población posee este alelo, mientras que en la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas fue de 0,281. (Figura 15) El número efectivo de alelos que hace referencia al número de alelos que se esperaría en un locus, en cada población, es mayor en la población de Mogi-Guaçu. (Anexo B)

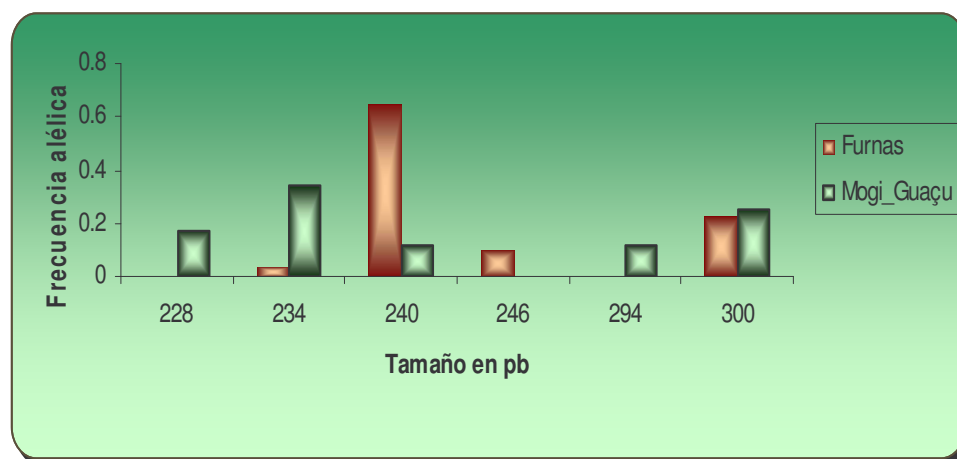
Figura 15. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus Pc04.



Fuente. Esta investigación

En el locus Pc07 cada población exhibe un alelo diferente, que posee la frecuencia mas elevada, de esta manera el alelo de 240 pb es el que presenta la mayor frecuencia en la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas con un valor de 0.645 (64.5%) y el alelo de 234 pb es el que tiene la mayor frecuencia en la población de Mogi-Guaçu con un valor de 0.346; (Figura 16) y el numero efectivo de alelos es mayor para la población de Mogi-Guaçu. (Anexo C)

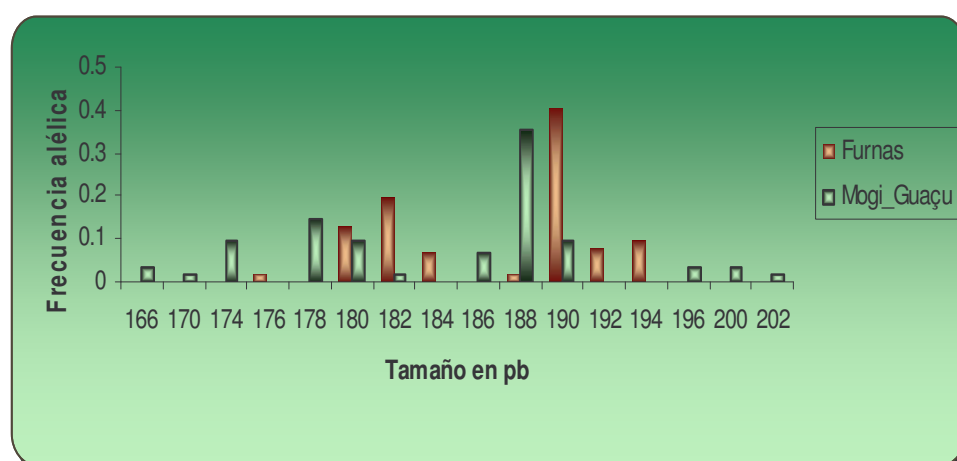
Figura 16. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus Pc07.



Fuente. Esta investigación

Con relación al locus Pc14, la frecuencia alélica mas alta se obtuvo en la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas, para la cual el alelo mas frecuente fue el de 190 pb con un valor de 0.403; 40.3% de la población posee este alelo, mientras que para la población de Mogi-guaçu el alelo mas frecuente es el de 188 pb, con una frecuencia de 0.335; 33.5% de la población posee este alelo (Figura 17) y el número efectivo de alelos es mayor en la población de Mogi-Guaçu. (Anexo D)

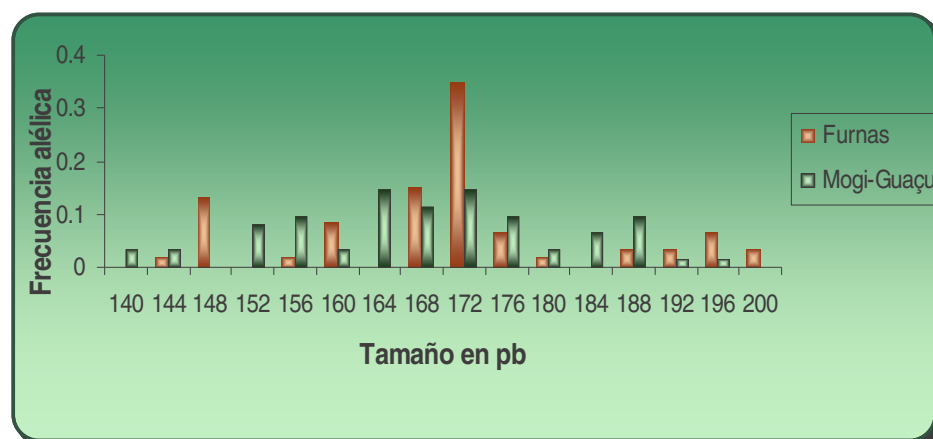
Figura 17. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus Pc14.



Fuente. Esta investigación

En las frecuencias alélicas del locus Pc17 para las dos poblaciones, se encontró que el alelo con mayor frecuencia para la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas es el de 172 pb con un valor de 0.350 (35%) mientras que en la población de Mogi-Guaçu dos alelos obtienen un mismo valor de frecuencia, con 0.145 o sea que un 14.5% de la población exhibe el alelo de 172 pb y el alelo de 164 pb, también esta presente en un 14.5% de esta población, además, este último alelo de 164 pb es un alelo exclusivo para la población de Mogi-Guaçu, lo cual quiere decir que este alelo esta presente en esta población, mas no se encuentra en la población de la piscicultura de Furnas. (Figura 18) El número efectivo de alelos para este locus fue mayor en la población de Mogi-Guaçu con un valor de 11.97 alelos. (Anexo E)

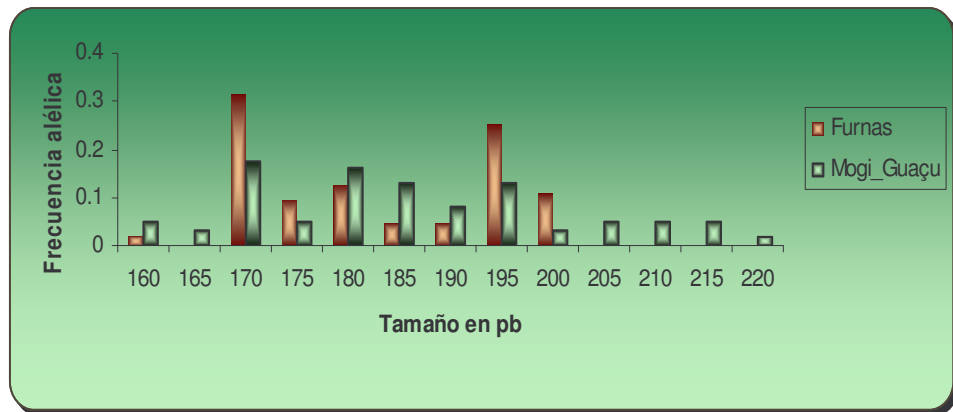
Figura 18. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos de locus Pc17.



Fuente. Esta investigación

Para el locus PI la mayor frecuencia alélica en las dos poblaciones fue exhibida por el alelo de 170 pb, no obstante la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas obtuvo un mayor valor de frecuencia con 0.313 (31.3%), mientras que para la población de Mogi-Guaçu el valor de frecuencia fue de 0.177. (Figura 19) La población de mogi-Guaçu presentó un mayor número efectivo de alelos. (Anexo F)

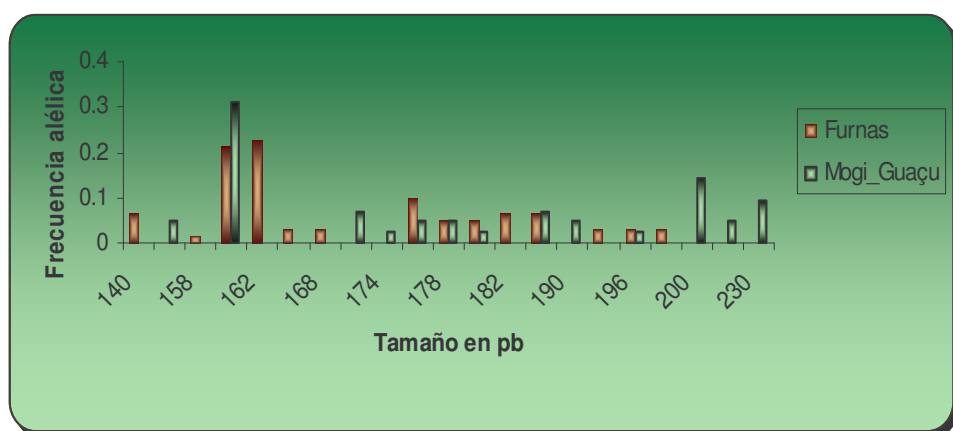
Figura 19. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus PI



Fuente. Esta investigación

En el locus Plin se estableció que la mayor frecuencia alélica se presentó en la población de Mogi-Guaçu con un valor de 0.310 (31%) para el alelo de 160 pb, mientras que en la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas, el alelo de mayor frecuencia fue el de 162 pb con un valor de 0.226 que significa que el 22.6% de esta población posee el alelo de 162 pb, además el alelo de 162 pb que presenta la mayor frecuencia alélica es un alelo exclusivo para la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas, por lo tanto no esta en la población de Mogi-Guaçu. (Figura 20) El numero efectivo de alelos en este locus es mayor en la población de de la Estación de Hidrobiología y Piscicultura de Furnas. (Anexo G)

Figura 20. Histograma comparativo de la frecuencia de los alelos del locus Plin



Fuente. Esta investigación

La frecuencia de los alelos en cada locus, o el porcentaje de estos en cada población representa la proporción de individuos de la población que después de la amplificación vía PCR exhibe determinado alelo ya sea en homocigosis o en heterocigosis puesto que estamos hablando de alelos y no de genotipos.

Los análisis estadísticos para las poblaciones de la especie *Prochilodus lineatus* de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas y del río Mogi-Guaçu indicaron la existencia de individuos distintos genéticamente, debidas a las diferencias encontradas en la distribución alélica para las poblaciones y la existencia de un elevado número de alelos exclusivos.

La presencia de alelos exclusivos, puede ser el resultado de los números pequeños de la muestra, del número pequeño de poblaciones analizadas o aun del alto nivel de polimorfismo encontrado en los loci estudiados¹⁵⁸

6.1.2 Equilibrio de Hardy Weinberg: El test de equilibrio de Hardy Weinberg, indicó que los seis loci analizados en las dos poblaciones muestran desvíos del equilibrio de Hardy Weinberg. ($p < 0,05$) (Tabla 5).

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.

Las desviaciones locales del equilibrio de Hardy Weinberg pueden ser producto de apareamientos no aleatorios y reducción del tamaño efectivo poblacional, ya que el tamaño efectivo poblacional es más pequeño que el tamaño real de la población por que cuando se considera el número o cantidad de animales que contribuyen una población, se hace referencia a aquellos individuos que han llegado a la edad de reproducirse, independientemente de que se reproduzcan o no. Los individuos que tienen el potencial de dejar descendientes son los que realmente interesan, ya que son los que tienen probabilidad de pasar algunos de sus genes a la próxima generación en la población; disminuye por una proporción sexual desigual y por la variación del éxito reproductor.¹⁵⁹

Los resultados encontrados en esta investigación que indican que la población del río Mogi-Guaçu no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg es contrario a estudios que han demostrado que poblaciones naturales de *Prochilodus lineatus*

¹⁵⁸ DAWSON, R.J.G., H.L. GIBBS, K.A. HOBSON & S.M. Yezerinac, Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*. Vol. 79, 1997, pp. 511.

¹⁵⁹ CARDELINO y ROVIRA. Op.Cit. p. 7.

presentan bajos niveles de endogamia reflejando la amplia dispersión de esta especie y su comportamiento panmictico. Además se demuestra que la población cultivada de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas al igual que otras poblaciones cultivadas de peces de esta especie no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg debido al alto nivel de endogamia.

TABLA 5: Valores de p usando el test de probabilidad de Raymond y Rousset para verificar el equilibrio Hardy Weinberg.

Locus	Valor de p	
	Furnas	Mogi-Guaçu
Pc04	0,0000	0,0000
Pc07	0,0432	0,0004
Pc14	0,0136	0,0005
Pc17	0,0008	0,0001
PI	0,0009	0,0003
Plin	0,0000	0,0000

Fuente. Esta investigación

Pini Zenatti¹⁶⁰, al estudiar las mismas dos poblaciones con los locus PL y Plin encontró que el locus PI se presento en equilibrio de Hardy Weinberg apenas en la población de Furnas ($P = 0,344$), mientras que el locus Plin no se presento en equilibrio Hardy Weinberg para ambas poblaciones

Galhardo y Toledo-Filho,¹⁶¹ en un estudio con transferina en *P. lineatus* establecieron que la población natural del río Mogi-Guaçu estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que una población cultivada del reservorio de Paraibuna mostró desvío del equilibrio de Hardy-Weinberg debido al alto nivel de endogamia, lo cual corrobora los datos que en poblaciones de cultivo

¹⁶⁰ PINI ZENATTI, Priscila. Análise da variabilidade genética do peixe *prochilodus lineatus* através da técnica de microssatélites. Monografia, Universidade Federal de São Carlos, 2004 p.31

¹⁶¹ GALHARDO, E. y TOLEDO-FILHO, S. A. Estudo genético bioquímico de populações natural e cultivada de *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Cienc. Cult. Vol 40 (Suppl. 7): 1988. p. 778.

generalmente existen altos niveles de endogamia que estarían provocando un déficit de heterocigotos y consecuentemente el desvío en las proporciones del equilibrio de Hardy Weinberg.

En un estudio realizado en peces de la planicie de inundación del alto río Paraná mediante marcadores moleculares RAPD, Renesto y Peres¹⁶² encontraron que la especie *Hoplias aff. Malabaricus* (traíra) presentó apenas dos locus en equilibrio Hardy Weinberg en cada población al comparar especímenes de ambiente fluvial (8 locus polimórficos) con especímenes de ambiente lacustre (9 locus polimórficos).

Hatanaka et al¹⁶³, 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.

También Carvalho¹⁶⁴, al estudiar tres poblaciones de *Prochilodus costatus* en la región de la represa de Tres Marias (MG) en el río São Francisco, mediante marcadores microsatélites, encontró que por lo menos dos locus de los seis estudiados presentaron desvío en el equilibrio de Hardy Weinberg en cada población, sugiriendo que la causa de los desvíos fue la deficiencia de heterocigotos, evidenciada por los valores positivos de F_{IS}

6.1.3. Heterocigosidad. El análisis de variabilidad genética reveló que la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas presentó valores de heterocigosidad observada más altos, con un valor máximo de 0.8125 que fue determinado para el locus PI, de esta manera es la población de cultivo la que exhibe mayor número de individuos con genotipo heterocigoto; mientras que los valores mas bajos de heterocigosidad observada fueron los correspondientes a la población natural, el mínimo valor fue de 0,1724 observado en el locus Pc04 del río Mogi-Guaçu. (Tabla 6) De acuerdo con lo anterior, la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas presentó mayor heterocigosidad observada media, con un valor de 0.5895.

¹⁶² RENESTO, E. y PERES, M. D. Estimativa da Variabilidade Genética de Peixes da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná Evidenciadas por Marcadores Moleculares. Universidade Estadual de Maringá. Maringá. Brasil. 2000. p. 5.

¹⁶³ HATANAKA, HENRIQUE-SILVA y GALETTI. Op cit. p. 5

¹⁶⁴ CARVALHO COSTA. Op. cit. p. 32.

El valor mas bajo de heterocigosidad esperada en las dos poblaciones fue de 0.5309 en el locus Pc07 de la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas, mientras que el valor más alto de 0.9164 lo presentó el locus Pc17 de la población de Mogi-Guaçu.

Tabla 6: Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) para las dos poblaciones de Prochilodus lineatus.

	Furnas		Mogi-Guaçu	
	HO	HE	HO	HE
Pc 04	0,3438	0,8021	0,1724	0,8288
Pc 07	0,5161	0,5309	0,4231	0,7760
Pc 14	0,7419	0,7753	0,5806	0,8302
Pc 17	0,8000	0,8311	0,6774	0,9164
PI	0,8125	0,8115	0,7742	0,9032
Plin	0,3226	0,8874	0,6190	0,8722
Promedio	0,5895	0,7730	0,5411	0,8545

Fuente. Esta investigación

Debido a la similitud de los datos medios de heterocigosidad observada y esperada en las dos poblaciones fue necesario aplicar el test de significancia de Mann Whitney o test de U ($p < 0.05$) donde se evaluaron los valores de heterocigosidad en las dos poblaciones y se obtuvo valores de $p = 0.630954$, $U = 15$ para la heterocigosidad observada y valores de $p = 0.149542$, $U = 9$ para la heterocigosidad esperada. Estos datos demuestran que existen diferencias estadísticas significativas en la heterocigosidad observada y esperada entre las dos poblaciones.

Al comparar los datos de heterocigosidad observada y esperada en cada población se pudo establecer la existencia de déficit de heterocigotos en las dos poblaciones, aun cuando este déficit es más evidente en la población de Mogi-Guaçu.

Debido a que la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas es una población de cultivo, se esperaría que presentara valores de heterocigosidad observados menores que la población de Mogi-Guaçu ya que esta podría estar siendo influenciada por factores de selección tanto morfológica como genética para características económicamente favorables, que podrían estar conllevando a una reducción de la heterocigosidad mas aun teniendo en cuenta que el número efectivo de reproductores empleados es pequeño al compararlo con una población natural. Sin embargo estos resultados se podrían explicar por que los peces usados como reproductores en la estación están siendo tomados del medio y reproducidos artificialmente.

La población de Mogi-Guaçu, por ser una población natural tendría una ventaja en este sentido, debido a que no esta sometida a ningún tipo de presión por selección y además el tamaño efectivo de la población es mayor, se esperaría que presentara valores de heterocigosidad mayores a los de la población de cultivo sin embargo en esta investigación se encuentra valores bajos de heterocigosidad que pueden ser el resultado de algún tipo de cuello de botella que esta afectando a la población natural en contra de los genotipos heterocigotos.

De acuerdo con los resultados encontrados en esta investigación el déficit de heterocigotos puede ser el causante de los desvíos del equilibrio de Hardy Weinberg. Probablemente, factores como combinación de alelos nulos y muestreos no aleatorios pueden ser los responsables por el déficit de heterocigotos y consecuentemente por los desvíos del equilibrio Hardy Weinberg encontrados en esta evaluación.

Para microsatélites, tradicionalmente, la existencia de alelos nulos, efecto Wahlund, apareamientos preferenciales y muestreos no aleatorios han sido señalados como los principales responsables por la deficiencia de heterocigotos en poblaciones naturales.¹⁶⁵

Existe también la posibilidad de algunos de los loci estar en regiones próximas de genes sobre selección, que en este caso podrían presentar menor variabilidad genética.¹⁶⁶

Sin embargo, los valores de heterocigosidad observada encontrados en esta evaluación, son mayores a los encontrados por Foresti et al¹⁶⁷ en poblaciones de

¹⁶⁵ GARCIA DE LEÓN, F. J. CHIKHI, L. BONHOMME, F. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of Europe sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus,1758). *Molecular Ecology*. Vol. 6. 1997. p. 56.

¹⁶⁶ SLATKIN. M. Hitchhiking and associate overdominance at a microsatellite locus. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 12. 1995. p. 478.

¹⁶⁷ FORESTI. F.; TOLEDO – FILHO, S. A. & ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Manejo de recursos genéticos em populações naturais de peixes. In: *Situação atual e perspectivas da ictiologia no*

cultivo de *Prochilodus lineatus* a través de marcadores RAPD, que obtuvo una heterocigosidad de 0,2745.

Carvalho Costa¹⁶⁸, en tres poblaciones naturales de *Prochilodus costatus* del río São Francisco, al analizar los mismos locus microsatélites evaluados en este estudio, encontró un valor de heterocigosidad medio de 0.48, sugiriendo que la especie probablemente tenga un gran tamaño efectivo poblacional y no haya experimentado ningún efecto cuello de botella.

Hatanaka et al¹⁶⁹ encontraron valores de 0.647 de heterocigosidad observada en poblaciones naturales de *Prochilodus argenteus* en la región de la represa de Tres Marias en el río São Francisco, donde la alta heterocigosidad y el elevado número de alelos exclusivos encontrado en uno de los lugares de colecta refuerza la idea que diferentes unidades reproductivas pueden coexistir, aumentando de alguna manera la heterocigosidad en la población.

6.2 VARIABILIDAD GENÉTICA INTER POBLACIONAL

6.2.1 Coeficiente de endogamia F_{IS} . Los resultados encontrados para cada locus demuestran, que los seis loci en la población de Mogi-Guaçu y los locus Pc04 y Plin en la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas presentan déficit de heterocigotos y además que el déficit de heterocigotos se debió a apareamientos no aleatorios dentro de las poblaciones (F_{IS}) ($p < 0.05$).

Los loci Pc07, Pc14, Pc17 y Pl en la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas no mostraron déficit de heterocigotos, evidenciado por los valores no significativos para el coeficiente de endogamia; esto se puede explicar por que la población de la estación de hidrobiología y piscicultura de Furnas es formada por individuos oriundos de poblaciones naturales, y puede estar ocurriendo flujo génico suficiente para contrarrestar la fuerza de la deriva genética y, así impedir la pérdida y/o fijación de alelos que llevarían a un déficit de heterocigotos. (Tabla 7)

Sin embargo, al analizar conjuntamente los seis loci, los valores de F_{IS} encontrados fueron positivos y difieren significativamente de cero, indicando déficit de heterocigotos en las dos poblaciones debidas al aumento del coeficiente de endogamia, por causa de los apareamientos no aleatorios.

La probabilidad del valor de F_{IS} se calculó por el método de randomizaciones, basado en 12000 randomizaciones y nivel de significancia de 5%. P_D : Es la

Brasil (Agostinho, A. A. & Benedito-Cecílio, E., eds.) Editora da Universidade Estadual de Maringá, Brasil, 1992. p. 62.

¹⁶⁸ CARVALHO COSTA. Op. cit. p. 32.

¹⁶⁹ HATANAKA, HENRIQUE-SILVA y GALETTI. Op cit. p. 5.

proporción de randomizaciones que generan un F_{IS} mayor que el observado, indicando probabilidad de déficit de heterocigotos. P_E : Es la proporción de randomizaciones que generan un F_{IS} menor que el observado indicando probabilidad de exceso de heterocigotos.

Tabla 7: Coeficiente de endogamia F_{IS} para las dos poblaciones y para los loci juntos.

Locus	Furnas			Mogi-Guaçu		
	F_{IS}	P_D	P_E	F_{IS}	P_D	P_E
Pc 04	0,5753*	0,0001	10,000	0,7949*	0,0001	10,000
Pc 07	0,0283	0,5018	0,6792	0,4597*	0,0001	10,000
Pc 14	0,0437	0,3772	0,7833	0,3041*	0,0005	0,9999
Pc 17	0,0380	0,3931	0,7226	0,2640*	0,0001	10,000
PI	-0,0012	0,5888	0,6048	0,1449*	0,0218	0,9943
Plin	0,6403*	0,0001	10,000	0,2954*	0,0011	0,9999
TOTAL	0,2400*	0,0001	10,000	0,3710*	0,0001	10,000

* Valores de F_{IS} que fueron significativamente diferentes de cero.

Fuente. Esta investigación

Pini Zenatti¹⁷⁰, al evaluar los locus PI y Plin obtuvo que el coeficiente de endogamia F_{IS} fue significativo para el locus Plin en ambas poblaciones. Sin embargo las medias de F_{IS} para las poblaciones de Furnas y Mogi-Guaçu fueron significativas, con valores de 0,337 y 0,188 respectivamente, lo cual indica déficit de heterocigotos en las dos poblaciones debidas apareamientos no aleatorios.

Carvalho¹⁷¹, al analizar tres localidades del río São Francisco, próximas a la barrera de la represa de Tres Marias, reporta valores medios de F_{IS} positivos para

¹⁷⁰ PINI ZENATTI. Op. Cit. p. 31.

¹⁷¹ CARVALHO COSTA. Op. Cit. p. 34.

los loci evaluados, demostrando que poblaciones naturales de *Prochilodus costatus* presentan déficit de heterocigotos evidenciado por los valores significativos para el coeficiente de endogamia.

Hatanaka et al.¹⁷² al estudiar dos poblaciones de la especie *Prochilodus argenteus* en el río São Francisco en dos lugares próximos a la represa de Tres Marias, reporta valores positivos de F_{IS} en por lo menos dos de los locus evaluados, de muestras tomadas en tres años no consecutivos demostrando pérdida de heterocigotos por apareamientos no aleatorios en las poblaciones.

6.2.2. Índice de fijación F_{ST} . Los valores de índice de fijación evidencian una baja diferenciación en los locus Pc04, Pc17, PI y Plin; una diferenciación moderada en el locus Pc14 y una gran diferenciación en el locus Pc07 para cada locus.

Tabla 8: Índice de fijación F_{ST} para las dos poblaciones y para los loci juntos.

Locus	F_{ST}
Pc04	0,0127
Pc07	0,2381
Pc14	0,1432
Pc17	0,0431
PI	0,0173
Plin	0,0354
Total	0,0814

Fuente. Esta investigación

Sin embargo el valor total de F_{ST} en estas poblaciones indica que existe una moderada estructuración poblacional, esto puede ser explicado por el efecto del flujo génico el cual contrarresta los efectos de la deriva genética homogeneizando las frecuencias alélicas en las poblaciones, introduciendo nuevos alelos, evitando de esta manera la diferenciación de las poblaciones.

¹⁷² HATANAKA, T., HENRIQUE-SILVA, F. y GALETTI Jr, P. Op Cit. p. 5.

El manejo de la estación de Hidrobiología y Piscicultura de Furnas provoca el efecto del flujo génico, que es generado por la utilización de individuos de ambientes naturales como reproductores para evitar problemas de consanguinidad, estos se capturan para luego ser reproducidos artificialmente en cautiverio dentro de la estación y posteriormente se sueltan al río para repoblar con el objetivo de preservar y mantener la especie, además de aumentar la actividad pesquera en el río.

Para la población del río Mogi-Guaçu, la ausencia de estructuración se debe a la amplia dispersión de la especie, que es una especie migradora, y a su comportamiento panmictico,

Revaldaves et al.¹⁷³, determinaron un bajo grado de diferenciación genética entre subpoblaciones de *Prochilodus lineatus*, provenientes de tres localidades de la cuenca del río Paraná; sugieren, que por lo menos en estos lugares de la planicie de inundación esta especie representa una única unidad reproductiva con alto flujo génico.

Carvalho¹⁷⁴, al estimar los valores de F_{ST} en tres localidades del río São Francisco, manifiesta que no se encontró diferencias significativas entre las tres localidades, indicando alta homogeneidad genética entre las mismas; afirmando que pueden hacer parte de una población casi panmictica dentro del área delimitada por las barreras de Tres Marias y el alto y medio río São Francisco, por lo cual afirma que las muestras comparadas deben haber sido retiradas de la misma población genética.

Hatanaka et al.¹⁷⁵, encontraron una leve pero significativa diferenciación poblacional en poblaciones de *Prochilodus argenteus* de la represa de Tres Marias, manifestando la existencia de diferentes pool genéticos en los dos lugares muestreados, sugiriendo la probable existencia de una gran metapoblación de *Prochilodus argenteus* habitando la cuenca del río São Francisco.

6.3 DISTANCIA E IDENTIDAD GENÉTICA

El agrupamiento UPGMA se estimó usando la distancia original de Nei¹⁷⁶; en el árbol se incluyen las dos poblaciones con un nodo, y la distancia genética estimada es de 0.5848, además, los seis loci soportan el nodo de distancia. Figura 21.

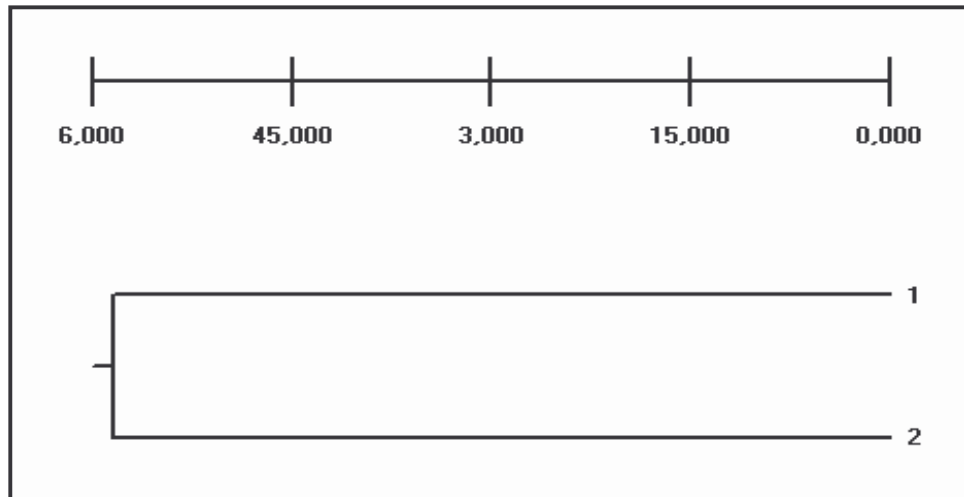
¹⁷³ REVALDAVES, E.; RENESTO, E. & MACHADO, M. F. P. S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. Braz. Journal of Genetics, Vol. 20, 1997, p. 383.

¹⁷⁴ CARVALHO COSTA. Op. cit. p 35.

¹⁷⁵ HATANAKA, T., HENRIQUE-SILVA, F. y GALETTI Jr, P. Op cit. p. 6.

¹⁷⁶ NEI, M, Op. Cit. 1972.

Figura 21: Dendrograma construido usando el agrupamiento UPGMA con la distancia original de Nei



La variación genética poblacional debe ser función tanto de la diversidad genética disponible originalmente para la especie como de procesos contemporáneos como selección, flujo génico, sistema de cruzamiento etc. Que regulan como aquella es posteriormente dividida dentro y entre las poblaciones.¹⁷⁷

Las investigaciones en genética de poblaciones de peces han contribuido enormemente para el entendimiento de cuestiones relativas a la estructuración de poblaciones salvajes o cultivadas de diversas especies, de su origen y características peculiares como éxito reproductivo, tasas de divergencia genética entre poblaciones, migración, tamaño de la población, selección natural y eventos históricos.¹⁷⁸

Los marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados en la identificación de poblaciones cultivadas o salvajes de muchas especies de peces ya que el conocimiento de la variabilidad genética de las poblaciones naturales y cultivadas de peces es de fundamental importancia para un manejo correcto de estas poblaciones.

Este tipo de estudios poblacionales son de importancia cuando se piensa en la elaboración de proyectos buscando la conservación de los recursos naturales. Por lo tanto, es evidente la utilidad cada vez mayor de estudios con marcadores

¹⁷⁷ AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. 2ª ed. Sunderland: Sinauer Associates. Inc. 2004. p. 648.

¹⁷⁸ PARKER *et al.*, 1998

moleculares acerca de los grupos taxonómicos y poblaciones de peces. Su importancia envuelve desde las cuestiones evolutivas hasta la elaboración de programas de manejo, para su uso en conservación, en planes de manejo adecuado de las poblaciones cultivadas y planes de mejoramiento genético.

La alternativa la reproducción de peces migradores con fines de repoblamiento debe ser escogida con cautela, pues se sabe de efectos de depresión por consanguinidad en algunas poblaciones repobladas, debido a la tendencia potencial de homogeneización de poblaciones estructuradas y consecuente pérdida de alelos y/o complejos génicos coadaptativos.

Como no existen estudios previos de la estructura genética de los peces migradores objeto de repoblamientos no se puede saber si estos repoblamientos pueden haber introducido la homogeneización en poblaciones previamente estructuradas en el caso de aquellos individuos lograr sobrevivir y obtener éxito reproductivo.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

La utilización de primers aislados para la especie *Prochilodus costatus* permitió establecer el grado de variabilidad genética de la especie *prochilodus lineatus*.

El uso de un mayor número de primers para la evaluación de la variabilidad genética de las dos poblaciones de peces *Prochilodus lineatus* permitió corroborar los resultados obtenidos anteriormente en un estudio con dos primers.

En la especie *Prochilodus lineatus* se encontró un alto número de alelos por loci y por población, sin embargo, las dos poblaciones presentaron déficit de heterocigotos, evidenciados por los valores positivos del coeficiente de endogamia F_{IS} el cual se encuentra mas marcado en la población natural del río Mogi-Guaçu que presenta los valores mas bajos de heterocigosidad.

Los seis loci estudiados en las dos poblaciones de *prochilodus lineatus* mostraron desvíos del equilibrio Hardy Weinberg; debidos al déficit de heterocigotos, y al efecto de los apareamientos no aleatorios dentro de las poblaciones confirmado por los resultados obtenidos para el coeficiente de endogamia. Los valores bajos de heterocigosidad en la población de Mogi-Guaçu pueden ser el resultado de algún tipo de selección natural o cuello de botella que este actuando sobre los genotipos heterocigotos para su reducción en la población y favoreciendo a los homocigotos para su aumento.

El índice de fijación encontrado en este estudio revela que el curimbatá, *Prochilodus lineatus* en los dos lugares estudiados posee una moderada diferenciación genética, que indica que no existe una estructuración poblacional definida y que el efecto del flujo génico generado por la captura de hembras y machos reproductores del medio natural tienden a homogeneizar las poblaciones.

Los estudios encaminados a la evaluación de la variabilidad genética de poblaciones naturales de peces nativos, mediante la utilización de marcadores moleculares microsatélites, puede ser una herramienta muy útil puesto que los resultados generados en este tipo de estudios proveen las bases necesarias para la elaboración de proyectos y estrategias en búsqueda de la conservación y el mejoramiento genético de las especies.

9.2 RECOMENDACIONES

Seguir los protocolos descritos en este estudio para futuros análisis de la variabilidad genética de poblaciones de peces con marcadores moleculares microsatélites por su eficiencia en el transcurso de esta investigación.

Usar los primers descritos en este estudio para el análisis de variabilidad genética de especies colombianas del genero *Prochilodus* con el fin de confirmar si son secuencias conservadas en todas las especies de este genero.

Usar los datos encontrados en esta investigación para el planteamiento de proyectos de conservación y mejoramiento genético de estas poblaciones de peces.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGOSTINHO, A. A.; VAZZOLER, A. E. A. M; GOMES, L. C. y OKADA, E. K. Estratificación espacial y comportamiento de *Prochilodus scrofa* en distintas fases del ciclo de vida, en la planicie de inundación del alto río Paraná y embalse de Itaipu. Paraná, Brasil: D' Hydrobiol. Trop. Vol. 26, 1993. p. 79–90.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO Jr., H. F. y PETRERE Jr., M. Itaipu reservoir (Brasil): Impacts of impoundments on the fish and fisheries. In: COWXI, G. Rehabilitation os freshwaters fisheries. Fishing news book. Bodmin, UK, 1994. p. 173–184.
- AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. 2^a ed. Sunderland: Sinauer Associates. Inc. 2004. 648 p.
- BARDOKCI, F.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of the RAPD techniques in tilapia fish; species and subspecies identification. Heredity, Vol. 27, 1994, p. 117-123.
- BAYLEY, P. B. Studies on the migratory characin, *Prochilodus platensis* Holmberg, 1889 (Pisces: Characoidei) in the R. Pylcomayo, South America. Brasil, J. Fish Biol. Vol. 5, 1973, p. 25–40.
- BERNATCHES, L.; DEMPSON, J. D.; MARTIN, S. Microsatellite gene diversity analyses in anadromous arctic char, *salvelinus alpinusi*, from Labrador, Canada. Canadian journal Fish and Aquatic science. Vol. 55, 1998, p. 1264-1272.
- BONETTO, A. A. Fish of the Paraná System. In DAVIES, B. R. and WALKER, K. F. (Ed). The Ecology of River Systems, Holanda: Dordrecht. 1986. p. 573-578.
- BONETTO, A. A., VERÓN, M. C. y ROLDÁN, D. Nuevos aportes al conocimiento de las migraciones de peces en el Río Paraná. Brasil. Ecosur, Vol. 8, 1981, p. 29–40
- BOWEN, S. H. Detritivory in neotropical fish communities. Environmental Biology of fish, Brasil. Vol. 9, No. 2, 1983, p. 137–144.
- BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo – sistemática. In: Poluição e piscicultura. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, São Paulo, Brasil. 1972. p. 79–108.

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.

CALCAGNOTTO, D. Caracterização de bancos genéticos selvagens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através da análise do DNA mitocondrial. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, USP, São Paulo/SP, Brasil. 1998. 90 p.

CARDELINO, Ricardo y ROVIRA, Jaime. Mejoramiento genético animal. Montevideo, Uruguay; Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur. 253 p.

CARVALHO COSTA, Luis Fernando. Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) na bacia do rio São Francisco, região de três márias (MG). Tese de mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 2006. 71 p.

CASTRO, R. M. C. and VARI, R. P. Family Prochilodontidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRAIS, Jr, C. J. (Ed). *Check List of the Freshwaters of South and Central America*. Porto Alegre, Brasil. EDIPUCRS. 2003. p. 65-70.

CASTRO, R. M. C. Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes). Tesis de Doctorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 1990. 292 p.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: Consensus and controversy. *Comp. Biochem. Phys.* Vol. 126, 2000 (Part B), p. 455-476.

CHARLESWORT, B.; SNTGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. Vol. 371. 1994. p. 215-220.

COLBOURNE, J. K.; NEFF, B. D.; WRIGHT, J. M.; GROSS, M. R. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment on mating success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Vol. 53, 1996, p. 342 – 349.

COMINCINI, S., LEONE, P., REDAELLI, L., DE GIVLI, L., ZANG, Y., FERRETI, L. Characterization of bovine microsatellites by silver staining. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, Vol. 112, 1995, p. 415-420.

CORDOVIOLA DE YUAN, E. Fish populations of lentic environments of the Paraná river, Brasil. *Hydrobiologia*. Vol. 123, 1992. p. 159-173.

DAWSON, R.J.G., H.L. GIBBS, K.A. HOBSON & S.M. Yezerinac, Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*. Vol. 79, 1997, p. 506–514.

DEWOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compares with that of other animals. *Journal Fish Biology*. Vol. 56, 2000, p. 461-473.

DINESH, K. R.; CHAN, W. K.; LIN, T. M.; PHANG, V. P. E. RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. *Asian Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, Vol. 3, Nº. 2, 1995, p. 112-118.

EPPLEN, J. F.; EPPLEN-HAUPT, A. Aspects of tandemly organized, repetitive sequence in chromosomal DNA. In: *Some aspects of chromosome structure and functions*. R.C. SOBTI; OBE, G.; ATHWAL, R.S. eds. Narosa Publishing House, New Delhi, Vol. 1, 2002, p. 1-10.

ESTOUP, A., PRESA, P., KRIENG, F., VAIMAN, D., GUYOMARD, R. (CT)_n and (GT)_n microsatellite: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, Vol. 71, 1993, pp. 488 – 796.

FITZSIMMONS, N. N.; MORITZ, C.; MOORE, S. S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 12, No. 3, 1995, p. 432- 440.

FORESTI, F.; TOLEDO – FILHO, S. A. y ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Manejo de recursos genéticos em populações naturais de peixes. In: *Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil* (Agostinho, A. A. & Benedito-Cecílio, E., eds.) Editora da Universidade Estadual de Maringá, Brasil, 1992. p 58 – 67.

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

GALHARDO, E. y TOLEDO-FILHO, S. A. Estudo genético bioquímico de populações natural e cultivada de *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). *Cienc. Cult. Brasil*, Vol. 40 (Suppl. 7) 1988. 778 p.

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

GODOY, M. P. *Aquicultura: aquicultura, actividade multidisciplinar; escadas e outras facilidades para passagens de peixes, estações de piscicultura*. Eletrosul, Florianópolis, SC. Brasil. 1985. 90 p.

- GODOY, M. P. *Peixes do Brasil. Subordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi Guassu*. Vol. IV. Piracicaba, SP. Brasil. Ed. Franciscana. 1975. p. 631-846.
- GODOY, M. P. Dez años de observações sobre periodicidade migratória de peixes do Rio Mogi Guaçu. São Paulo, Brasil Rev. Bras. Biol. Vol. 27, 1967, p.1–12
- GODOY, M. P. Age, growth, sexual maturity, behaviour, migration, tagging and transplanted of the Curimbatá (*Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881) of the Mogi Guassu River, São Paulo State, Brasil. An. Acad. Bras. Cienc., 1959. Vol. 31, p. 447–77
- GODOY, M. P. Locais de desova de peixes em um trecho do Mogi Guassu, São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Biol. Vol. 14, 1954, p. 375–96
- GODOY, M. P. Sobre a sistemática do Curimbatá (“*Prochilodus*” Agass.) do rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas e de outros afluentes do trecho superior do rio Paraná. Brasil. Brasil de Biol., Vol. 7 No. 4. 1947, p. 445 – 449.
- GODOY, M. P. A piracema de 1944/1945 no Rio Mogi Guassu, Cachoeira das Emas. Bol. Minist. Agric., Rio de Janeiro, Brasil. Vol. 34, 1946, p.103–9
- GOFF, D. J. et al. Identification of Polymorphic simple sequence repeat in the genome of the zebrafish. Genomics. Vol. 14, 1992, p. 200 – 202.
- GOLDSTEIN, D. B. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics. Vol. 139, 1995, p. 463 – 471.
- GOUDET J. FSTAT a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3. Disponible en internet, URL. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- 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. 728-730.
- HANSEN, M. M.; MENSBERG, K-L. D. RASMUSSENG, G.; SIMANSEN, V. Genetic variation within and among danish brown trout (*Salmo trutta* L.) hatchery strains assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. Aquaculture. Vol. 153, 1997a, p. 15-29.
- HATANAKA, T., HENRIQUE-SILVA, F y GALETTI Jr, P. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River Genetica. Vol. 126, 2005. p. 1–7

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F & GALETTI Jr, P. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in Neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenet Genome Res* Vol. 98, 2002, p. 308 – 310.

HATANAKA, T. Estudos de marcadores cromossômicos e moleculares no peixe *Prochilodus marggravii* (Prochilodontidae), uma espécie de interesse econômico no rio São Francisco. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, Brasil. 2001.

JARNE, P.; LUGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*. Vol. 11, 1996, p. 427-429.

JORDAN, W. C.; VERSPOOR, E.; YOUNGSON, A. F. The effect of natural selection on stamatics of genetic divergence among populations of the atlantics Salmon. *Journal of Fish Biology*. Vol. 57, 1997, p. 546-560.

JUNK, W. J.; BAYLER, P. B.; SPARKS, R. E. The flood pulse concept in river-floodplain system. In: Dodge, D. P. (ed). *Proceedings of the International Large River Symposium*. Canadian Special Publication, Fisheries and Aquatic sciences 106, Ottawa, Ontario, Canada. 1989, p. 110-127.

JURKA, J.; PETHIVAGODA, C. Simple repetitive DNA sequences for primates: compilation and analysis. *Journal of Molecular Evolution*. Vol. 40. 1995, p. 120–126.

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. 2002.

KNAPIK, E. W.; GOODMAN, A., EKKER, M. A microsatellite, genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature genetics*. Vol. 18, 1998, p. 338-343.

LARGIADEU, C. R.; SCHOLL, A. Genetic introgression between native and introduced brown trout *Salmo trutta* L. populations in the Rhône River basin. *Molecular Ecology*, Vol. 5, 1996, p. 417-426.

LEE, W. J.; KOCHER, T. D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*. Vol. 49, 1996, p. 169 – 171.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-Strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* Vol .4, 1987. p. 203-221.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal and Human Genetic*. Vol. 44, 1989, p. 398 – 401.

LOWE-MCCONNELL, R. H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes neotropicais. São Paulo, Brasil: Editora da Universidade de São Paulo, 1999.

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

MAGALHÃES, A.C. Monografia Brasileira de Peixes Fluviais. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo, SP. Brasil. 1931.

MAGO-LECCIA, E. Consideraciones sobre la sistemática de la familia Prochilodontidae (Osteichthyes, Cypriniformes), con una sinopsis de las especies de Venezuela. En: Acta Biológica de Venezuela. Venezuela, Vol. 8, No. 1, 1972. p. 35 – 96.

MARQUES, Débora Karla Silvestre. Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros, Corumbá. Brasil. Embrapa Pantanal, 2002. 22 p.

MILLER. M. TFGA, A Windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetics data. Version 1.3. Dep. of Biological Sciences, Northern Arizona University, 2000.

MORAES FILHO, M.B. y SCHUBART, O. Contribuição ao estudo do Dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae). Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Divisão de Caça e Pesca, Rio de Janeiro, Brasil, 1955, 131 p.

NEI, M. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY. 1987.

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

NEI, M. Genetic distances between populations. Am. Nat. Vol. 106, 1972. p. 283-292.

NOMURA, H., Marcação e migração da piava *Leporinus copelandii* Steindachner, 1875 (Osteichthyes, Anostomidae) do Rio Mogi Guassu, São Paulo. Brasil. Rev. Ceres, Vol. 22, 1975, p. 332–40

OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M.; FORESTI, F. Chromosome Structure in fishes. In: Some aspects of chromosome structure and functions. R.C. SOBTI; OBE, G.; ATHWAL, R.S. eds. Narosa Publishing House, New Delhi, 2002, p. 103-108.

ORTÍ, G. & VARI, R. P. Characiformes pages. [on line]. In: D & W Maddison (eds), The Tree of Life Project: Proyecto para internet que contiene informacion sobre filogenia y biodiversidad 1996. Dirección electronica URL (<http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html>).

PINI ZENATTI, Priscila. Análise da variabilidade genética do peixe *prochilodus lineatus* através da técnica de microsatélites. Monografia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil, 2004, p. 31

POWEL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAM, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in plant science. Vol. 1, No. 7, 1996, p. 215 – 222.

RAYMOND, M. & ROUSET, F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact test and ecemenicism. Journal Heredity, Vol. 86, 1995, p. 248 – 249.

REILLY, A.; ELLIOT, N. G.; GREWE, P. M. CLABBY, C.; POWEL, R.; WARD, R, D. Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their ancestral Canadian population: Comparision of microsatellites DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation. Aquaculture. Vol. 173, 1999, p. 457 – 467.

REIS, R.E.; KULLANDER, S. O.; FERRAIS Jr., C. J. Check list of freshwater fishes of Sout América. Porto Alegre, Brasil, 2003. 279 p

RENESTO, E. y PERES, M. D. Estimativa da Variabilidade Genética de Peixes da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná Evidenciadas por Marcadores Moleculares. Universidade Estadual de Maringá. Maringá. Brasil. 2000. p. 5

REVALDAVES, E.; RENESTO, E. & MACHADO, M. F. P. S.. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Parana river. Brasil. Journal of Genetics, Vol. 20, 1997, p. 381-388.

ROBERTS, T. R. Osteology and relationships of the Prochilodontidae, a south American family of Characoid fishes. Bull. Mus Comp. zool. V. 145 (4), 1973. p. 213 – 235.

ROGNON, X.; GUYOMARD, R. Mitochondrial DNA differentiation among east and wes African nile tilapia populations. Journal of Fish Biology, Vol. 5, 1997, p. 204-207.

RUZZANTE, D. E. A comparison of several measures of genetic distance and population structure whit microsatellites data: blas and sampling variance. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 55. 1998. p. 1-14

- SAMBROOK, J. y RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. 2001
- SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetics studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei; Loricariidae). In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. & LUCENA, C.A. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Brasil, 1998. p. 375 – 400.
- SCHUBART, O. y ROSA JR., H. Anotações sobre a biologia do curimatá (*Prochilodus*) do rio Mogi. São Paulo, Brasil. 1945
- SCHUBART, O. A pesca na Cachoeira das Emas do Rio Mogi-Guaçu durante a piracema, de 1942 – 1943. Bol. Ind. Animal, São Paulo, São Paulo, Brasil Vol. 6, No. 4, 1943. p. 95 – 116.
- SCHULER, G. D.; BOGUSKI, M. S.; STEWORT, E. A. A gene map of the human genome. Science. Vol. 247, 1996, p. 540-546.
- SINGER, M. F. Highly repeated sequences in mammalian genomes. Int Rev. Cytol. V. 76, 1982, p. 67-112.
- SIVASUNDAR, A., BERMINGHAM, E., ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American Rivers. Molecular Ecology, Vol. 10, 2001, p. 407 – 417
- SLATKIN, M. A. Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies, Genetics Society of America. Vol. 139, 1995, p. 457-462.
- SLATKIN, M. Hitchhiking and associate overdominance at a microsatellite locus. Molecular Biology and Evolution. Vol. 12. 1995. p. 473-480.
- SLETTAN, A.; OLSAKER, I.; LIE, O. Segregation studies and linkage analyses of Atlantic salmon microsatellites using haploid genetics. Heredity, Vol. 78, 1997, p. 620-627.
- SODSUK, P. K.; MCANDREW, B. J. Molecular systematics of three tilapiine genera *Tilapia*, *sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. Journal of Fish Biology. Vol. 39, 1991, p. 301-303.
- SODSUK, P. K.; MCANDREW, B. J.; TURNER, G. I. Evolutionary relationship of the lake Malawi *Oreochromis* species: evidence from allozyme. Journal of Fish Biology. Vol. 47, 1995, p. 321-333.

- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. Biología Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Brasil., 2001. p. 192.
- STALLING, R. L.; FORD, A. F.; NELSON, D.; TORNEY, D. C.; HILDEBRAN, C. E.; MOYZIS, R. K. Evolution and distribution of (GTR)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*. Vol. 10, 1991, p. 897 – 915.
- STAR SOFT INC. STATISTICA (Data analysis software system) version 6.0. disponible en internet URL. <http://www.statistica.com>.
- STEPHAM, W.; CHO, S. Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics*. Vol. 136, 1994, p. 333-341.
- STONE, C. E.; TAGGART, T. B.; FERGUSON, A. Single locus minisatellite DNA variation in European populations of Atlantic salmon (*Salmo trutta* L.). *Hereditas* Vol. 126, 1997, p. 269 – 275.
- SYKES, B. As Sete Filhas de Eva. A ciência que revela nossa herança genética. Rio de Janeiro: Brasil. Record, 2003.
- TESSIER, N.; BERNATCHES, L.; WRIGHT, J. M. Populaton structure and impact of supportive breeding from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in land-lock-ed atlantic salmon *Salmo salar* L. *Molecular Ecology*. Vol. 6, 1997, p. 735-750.
- TOLEDO-FILHO, S. A., Distribuição espacial do curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, do rio Mogi-Guaçu. *Ciência e Cultura*. São Paulo, Brasil. Vol. 35, 1983, p. 1112 – 1114.
- TOLEDO-FILHO, S. A., GODOY, M. P. E SANTOS, E. P. Curva de migração do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae) na bacia do rio Mogi-Guaçu. São Paulo, Brasil. 1986.
- TOLEDO-FILHO, S. A., GODOY, M.P. E SANTOS, E.P. Delimitação Populacional do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae) do rio Mogi-Guaçu, Brasil. *Rev. Brasil. Biol.*, Vol. 47, No. 4. 1987, p. 501-506.
- VAZZOLER, A. E. A. M.; LIZAMA, M. A. P. Influências ambientais sobre a sazonalidade reprodutiva. 1997.pp. 267 – 280 In VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (ed). A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e sócioeconômicos. Maringá, Brasil: EDUEM, 1997. 460 p.
- WAGNER, R. P.; MAGUIRE, M. P.; STALLINGS, R.L. Chromosomes: a synthesis. Wiley-Liss, inc.; New York. 1993.

WASKO, A. P. y GALETTI JR., P. M. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Brasil, Genetics and Molecular Biology*, Vol. 23, 2000. p. 135-138.

WEINER, A. M.; DEININGER, P. L.; EFSTRATIADIS, A. Nonviral retroposons: Genes, Pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annu. Rev. Biochem.* V. 55, 1986, p. 631-661.

WEIR, B. S. Y COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structuring. *Evolution*, Vol. 38, 1984. p. 1358-1370.

WELCOMME, R. L. *Fisheries ecology of floodplain rivers*. New York: Longman. 1979. 317p.

WIKIPEDIA FOUNDATION. Curimatá. En WIKIPEDIA la enciclopedia libre. España. (Citada 15 de agosto de 2007). disponible en Internet, URL: [//es.wikipedia.org/wiki/curimatá](http://es.wikipedia.org/wiki/curimatá).

WIKIPEDIA FOUNDATION, Estructura genética. En WIKIPEDIA la enciclopedia libre. España. (Citada 15 de agosto de 2007). Disponible en Internet, URL: [//es.wikipedia.org/wiki/estructuragenética](http://es.wikipedia.org/wiki/estructuragenética).

WIKIPEDIA FOUNDATION, Genética de poblaciones. En WIKIPEDIA la enciclopedia libre. España. (Citada 4 de octubre de 2007). Disponible en Internet, URL: [//es.wikipedia.org/wiki/geneticadepoblaciones](http://es.wikipedia.org/wiki/geneticadepoblaciones).

WIKIPEDIA FOUNDATION, *Prochilodus lineatus* En WIKIPEDIA la enciclopedia libre. España. (Citada 15 de agosto de 2007). Disponible en Internet, URL: [//es.wikipedia.org/wiki/prochilodus_lineatus](http://es.wikipedia.org/wiki/prochilodus_lineatus).

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

ZANE, L.; BARGELLONI, L. PATARNELLO, T. Strategies for microsatellites isolation: a review. *Molecular Ecology*. Vol. 11, 2002, p. 1 – 16.

ZARDOYA, R.; VOLLMER, D. M.; CRADDOCK, C.; STREELMAN, J. T.; KARL, S.; MEYER, A. Evolutionary conservation of microsatellites flanking regions and their use in resolving phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proceeding of Royal society London B*. Vol. 236, 1996, p. 1589-1598.

ZARET, T. M. *Evolutionary ecology of neotropical freshwater fishers*. Dr. W. Jung Publishers, Brasil. 1982, p. 59 – 65.

ANEXOS

Anexo A. Matriz de datos para los análisis mediante el programa GENEPOP

prochilodus lineatus

BMCPc04

BMCPc07

BMCPc14

BMCPc17

PI

Plin

pop

f1,	150154	240240	182194	168172	170175	160162
f2,	130130	240300	176190	172176	180200	162162
f3,	130130	240240	190190	172172	170185	192192
f4,	150154	240246	182190	168172	170180	160162
f5,	130130	240300	190192	172176	170170	162162
f6,	150154	240240	182190	168172	170180	160160
f7,	150150	000000	180190	160188	180200	198198
f8,	140140	240240	182192	148160	190195	168168
f9,	140140	300300	182194	148160	195195	162162
f10,	150154	240240	182190	168172	170180	160160
f11,	150150	300300	188190	148148	170195	182182
f12,	152152	240240	182190	172200	170180	140140
f13,	130130	240240	180194	172172	170185	162176
f14,	140150	240240	190190	144196	190195	160188
f15,	154154	240240	180190	172200	170175	158162
f16,	154154	240240	184194	168172	170180	162162
f17,	132140	240246	180180	148148	175195	162162
f18,	150150	240300	000000	160172	170195	160160
f19,	150154	240300	180190	172172	170195	140140
f20,	140154	234234	180190	000000	195195	178178
f21,	140140	240240	184184	000000	195195	188188
f22,	152152	240246	184192	168172	200200	160180
f23,	152152	240246	182192	168172	170175	164182
f24,	150150	240246	182194	172192	170185	196196
f25,	140140	240300	190190	176176	160195	160160
f26,	140150	240300	190190	148196	170195	160188
f27,	150154	240240	182190	168172	170175	164182
f28,	148154	240246	190190	172192	170175	180180
f29,	140140	240300	190190	148196	170195	176176
f30,	130130	240300	180190	156160	180200	000000
f31,	150150	240300	182192	168196	190195	176176
f32,	140140	240300	182194	180188	200200	176178

pop

m48,	150150	234300	174196	156156	180185	000000
m53,	130130	234234	186186	176192	185190	000000
m56,	000000	234234	188188	144172	160180	230230
m57,	132132	300300	174188	172176	170200	000000
m58,	130130	234240	188196	168168	180185	000000
m59,	130130	000000	188188	160176	170180	230230
m60,	150150	234234	188188	152152	180195	176176
m61,	148148	000000	178178	164176	185195	000000
m62,	150150	234234	178190	152196	175195	160160
m63,	146146	234234	178200	152156	160175	160160
m64,	150150	300300	166174	164172	160175	160174
m65,	148154	300300	188188	172172	185195	160160
m66,	000000	228228	188188	168184	185195	152160
m67,	146150	234234	178188	156156	185220	160200
m68,	148148	240240	170180	168180	170190	160200
m69,	150150	234300	180180	152168	180200	160200
m70,	130130	234234	188188	000000	180205	152160
m71,	130130	300300	178178	140140	165180	188200
m72,	130130	240300	188190	176176	185195	160200
m73,	150150	240300	174188	172188	180195	180200
m82,	130160	000000	186186	164188	210210	172190
m83,	000000	000000	190190	164188	000000	172190
m87,	150150	228300	174180	164164	180210	000000
m88,	144154	000000	000000	164188	170170	188188
m91,	152152	228294	178188	172188	205215	000000
m96,	150150	228294	182190	172184	170170	000000
m97,	150150	228294	180188	172184	170170	000000
m99,	142156	234294	178188	144188	195205	000000
m299,	142142	294294	200202	180184	190190	210210
m346,	140140	000000	188188	168168	170170	178196
m347,	140140	228228	166174	164164	165190	000000
m348,	140140	228240	180190	156160	215215	172178

Anexo B. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus Pc04 de las dos poblaciones estudiadas.

Locus Pc04 Tamaño de alelos en pb	Poblaciones	
	Furnas	Mogi-Guaçu
130	0,156	0,224
132	0,016	0,034
140	0,250	0,103
142	0,000	0,052
144	0,000	0,017
146	0,000	0,052
148	0,016	0,086
150	0,281	0,328
152	0,094	0,034
154	0,188	0,034
156	0,000	0,017
160	0,000	0,017
Numero de alelos	7	12
# efectivo de alelos	4,751	5,391

Anexo C. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus Pc07 de las dos poblaciones estudiadas.

Locus Pc07 Tamaño de alelos en pb	Poblaciones	
	Furnas	Mogi-Guaçu
228	0,000	0,173
234	0,032	0,346
240	0,645	0,115
246	0,097	0,000
294	0,000	0,115
300	0,226	0,250
Numero de alelos	4	5
# efectivo de alelos	2.094	4.191

Anexo D. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus Pc14 de las dos poblaciones estudiadas.

Locus Pc14 Tamaño de alelos en pb	Poblaciones	
	Furnas	Mogi-Guaçu
166	0,000	0,032
170	0,000	0,016
174	0,000	0,097
176	0,016	0,000
178	0,000	0,145
180	0,129	0,097
182	0,194	0,016
184	0,065	0,000
186	0,000	0,065
188	0,016	0,355
190	0,403	0,097
192	0,081	0,000
194	0,097	0,000
196	0,000	0,032
200	0,000	0,032
202	0,000	0,016
Numero de alelos	8	12
# efectivo de alelos	4.516	5.516

Anexo E. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus Pc17 de las dos poblaciones estudiadas.

Locus Pc17 Tamaño de alelos en pb	Poblaciones	
	Furnas	Mogi-Guaçu
140	0,000	0,032
144	0,017	0,032
148	0,133	0,000
152	0,000	0,081
156	0,017	0,097
160	0,083	0,032
164	0,000	0,145
168	0,150	0,113
172	0,350	0,145
176	0,067	0,097
180	0,017	0,032
184	0,000	0,065
188	0,033	0,097
192	0,033	0,016
196	0,067	0,016
200	0,033	0,000
Numero de alelos	12	14
# efectivo de alelos	5.648	11.972

Anexo F. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus PI de las dos poblaciones estudiadas.

Locus PI	Poblaciones	
	Tamaño de alelos en pb	Furnas
160	0,016	0,048
165	0,000	0,032
170	0,313	0,177
175	0,094	0,048
180	0,125	0,161
185	0,047	0,129
190	0,047	0,081
195	0,250	0,129
200	0,109	0,032
205	0,000	0,048
210	0,000	0,048
215	0,000	0,048
220	0,000	0,016
Número de alelos	8	13
# efectivo de alelos	4.963	9.229

Anexo G. Tamaño de alelos y valores de frecuencias alélicas para el locus Plin de las dos poblaciones estudiadas.

Locus Plin Tamaño de alelos en pb	Poblaciones	
	Furnas	Mogi-Guaçu
140	0,065	0,000
152	0,000	0,048
158	0,016	0,000
160	0,210	0,310
162	0,226	0,000
164	0,032	0,000
168	0,032	0,000
172	0,000	0,071
174	0,000	0,024
176	0,097	0,048
178	0,048	0,048
180	0,048	0,024
182	0,065	0,000
188	0,065	0,071
190	0,000	0,048
192	0,032	0,000
196	0,032	0,024
198	0,032	0,000
200	0,000	0,143
210	0,000	0,048
230	0,000	0,095
Numero de alelos	14	13
# efectivo de alelos	8.817	8.500