

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Estudio comparativo de la variabilidad genética y  
filogenética del zungaro tigrinus -  
*Brachyplatystoma tigrinum* (Britski, 1981) y  
especies relacionadas de la familia Pimelodidae en  
la Amazonía Peruana**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

**BIÓLOGO**

PRESENTADO POR EL BACHILLER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**JORGE MORI MARIN**

**IQUITOS – PERÚ**

**2010**

# JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR

.....  
Dr. LUIS CAMPOS BACA

*Presidente*

.....  
Blgo. PEDRO ADRIANZEN JULCA M.Sc.

*Miembro*

.....  
Blgo. ÁNGEL RUIZ FRÍAS M.Sc.

*Miembro*

## **ASESORES**

.....  
Dra. CARMEN ROSA GARCÍA DÁVILA

.....  
Dr. FERNANDO ALCÁNTARA BOCANEGRA

.....  
Dr. JEAN-FRANÇOIS RENNO

***“...De hecho, no fracasé al intentar cerca de 10000 veces, simplemente encontré 10000 maneras que no funcionan...”***

Thomas A. Edinson

## ***DEDICATORIA***

Al ser que me dio la oportunidad de caminar en este sendero llamado vida, que siempre está conmigo como fuente de fortaleza para salir adelante, a ti papá **DIOS**, gracias.

A las personas que tanto amo, aquellas que celebran mis logros y me fortalecen en mis fracasos. Aquellos sin quienes, no hubiera podido llegar hasta donde estoy. Quienes no dudo estarán ahí diciendo ¡Adelante!, en lo que me falta caminar. A mis padres **JORGE** y **ROSA ISABEL**, y mis hermanos **LEVI** y **GREACE**.

## ***AGRADECIMIENTO***

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP y al proyecto Innovación y Competitividad para el Agro Peruano - INCAGRO. Por la subvención y la oportunidad ofrecida para la realización de esta investigación.

A la Dra. Carmen Rosa García Dávila; Jefe del Laboratorio de Biología y Genética Molecular del IIAP, asesora de esta investigación, que me dio la oportunidad de conocer este nuevo sendero de la ciencia denominada genética. Gracias a su amistad, experiencia, orientación y dedicación brindada, se logró cumplir con el objetivo establecido, enfatizando siempre en la competencia para el futuro exitoso de sus asesorados.

Al Dr. Jean-François Renno por la orientación concedida, apoyo que fue un factor muy importante en la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. Fernando Alcántara Bocanegra, co-asesor y coordinador del presente proyecto de tesis, por la disponibilidad de su tiempo y facilitar el desarrollo de esta investigación.

A mi gran amigo, el doctorando Fernando Marcelo Carvajal Vallejos, por su amistad, su tiempo, paciencia y orientación en la ejecución del presente trabajo, y por enseñarme muchas cosas en el campo de la ciencia y la vida.

A los doctores Giuliano Huergo y Jacqueline Batista del Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia - INPA, por el gran apoyo e información para la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. Claudio Oliveira de la Universidade Estadual Paulista – UNESP y los doctores de Columbia University: Eric A. Schon, Estela Area y Sonia Hernández. A todos ellos muchas gracias por su apoyo desinteresado en la elaboración de mi tesis.

Al Dr. Víctor Erasmo Sotero Solís, por su amistad, confianza hacia mi persona y por aliviar las tensiones con sus bromas.

A los Biólogos Diana Castro y Werner Chota, por su amistad y enseñanza brindada para poder desarrollar el presente trabajo.

A Priscilla Casado y Julio Landaeta, de la Dirección Regional de Producción, PRODUCE - Loreto, por el apoyo en la obtención de datos de desembarque pesquero.

A una persona en la que siempre encuentro una palabra de aliento o un consejo, que me demostró que la perseverancia es el primer paso para lograr mucho en esta vida, ella, mi mejor amiga, compañera en el sentimiento que une a dos personas, con todo mi amor para ti KARIN VANESSA.

A mis compañeros del IIAP y del Laboratorio de Biología y Genética Molecular: Javier, Adriana, Kevin, Evelyn, José, Karin, Antonio, Freccia, Germán, Antonia, Claudia y en especial a Frank, Gian Carlo, Ángel Martín y Mike por las enseñanzas. Todos ellos constituyen una gran familia, donde compartimos siempre grandes momentos que nos dieron ánimo de continuar siempre adelante.

A mis amigos de la Universidad (UNAP - Biología) a quienes no menciono individualmente por el temor de olvidarme de alguno de ellos. Quiero agradecerles por su sincera amistad en esos cinco años de estudio, donde compartimos exámenes, salidas al campo, las palomilladas propias de nuestra juventud, que pienso han quedado marcados en cada uno de nosotros, como parte de los mejores recuerdos de nuestra vida.

A todos que directa e indirectamente contribuyeron en la realización de esta investigación.

JORGE MORI MARIN

## ÍNDICE

	<b>Pag.</b>
I. Introducción.....	<b>01</b>
II. Objetivos.....	<b>03</b>
2.1. Objetivo General.....	<b>03</b>
2.2. Objetivos Específicos.....	<b>03</b>
III. Revisión Bibliográfica.....	<b>04</b>

3.1. Sistemática y biología de los bagres.....	4
3.1.1. Taxonomía.....	4
3.1.2. Sistemática.....	4
3.1.3. Distribución.....	5
3.1.4. Alimentación.....	5
3.1.5. Hábitat.....	6
3.1.6. Importancia económica.....	6
3.2. Marcadores moleculares.....	9
3.3. El genoma mitocondrial.....	9
3.3.1. Origen y función de la mitocondria.....	9
3.3.2. Estructura y propiedades del genoma mitocondrial.....	10

3.3.3. Organización del genoma mitocondrial.....	10
3.3.4. Región control (D-loop) del genoma mitocondrial.....	11
IV. Materiales y métodos.....	13
4.1. Área de trabajo.....	13
4.2. Obtención del material biológico.....	13
4.3. Extracción y verificación del ADN total.....	13
4.3.1. Extracción del ADN usando el método CTAB.....	13
4.3.2. Cuantificación.....	14
4.3.3. Verificación de la extracción del ADN.....	14
4.4. Región control mitocondrial.....	15
4.4.1. Amplificación de la región control del ADNmt vía PCR.....	15
4.4.2. Verificación de los productos de amplificación.....	16
4.5. Secuenciamiento nucleotídico de la región control del ADNmt.....	16
4.5.1. Reacción de secuenciamiento nucleotídico.....	16
4.5.2. Purificación de productos de la reacción de secuenciamiento...	17
4.5.3. Corrida de las en el analizador genético.....	17
4.5.4. Edición y alineamiento para la formación de secuencias consenso.....	17
4.5.5. Obtención de la matriz general con las secuencias consenso de las especies en estudio.....	17
4.6. Análisis de la variabilidad genética de <i>B. tigrinum</i> , <i>B. rousseauxii</i> , <i>B. vaillantii</i> , <i>B. filamentosum</i> y <i>P. punctifer</i> .....	18
4.6.1. Análisis del polimorfismo de ADN.....	18
4.6.2. Análisis de proporción de haplotipos.....	18
4.6.3. Análisis de divergencia genética intra e interespecífica.....	18
4.7. Análisis de filogenético.....	19
V. Resultados.....	20
5.1. Extracción de ADN.....	20
5.2. Amplificación de la región control (D-loop) del ADNmt.....	21
5.3. Secuencias nucleotídicas consenso.....	22

5.4. Variabilidad genética de <i>B. tigrinum</i> , <i>B. rousseauxii</i> , <i>B. vaillantii</i> , <i>B. filamentosum</i> y <i>P. punctifer</i> .....	22
5.4.1. Polimorfismo de ADN.....	22
5.4.2. Proporción de haplotipos .....	24
5.4.3. Divergencia genética intra e interespecífica .....	28
5.5. Relación filogenética .....	28
VI. Discusión .....	30
6.1. Variabilidad genética.....	30
6.1.1. Polimorfismo de ADN.....	30
6.1.2. Proporción de haplotipos .....	34
6.1.3. Divergencia genética intra e interespecífica .....	35
6.2. Relación filogenética .....	36
VII. Conclusiones .....	38
VIII. Recomendaciones .....	39
IX. Referencias bibliográficas .....	40
X. Anexo.....	47

## LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 01. Principales especies de bagres amazónicos explotados comercialmente	Xx
Tabla 02. Valores de sitios informativos para parsimonia, sitios variables y sitios reservados encontrados para la región control del ADN mitocondrial de los especímenes <i>B. tigrinum</i> , <i>B. rousseauxii</i> , <i>B. vaillantii</i> , <i>B. filamentosum</i> y <i>P. punctifer</i> analizados.	Xx
Tabla 03. Porcentaje de la composición nucleotídica para la región control del ADN mitocondrial de <i>B. tigrinum</i> , <i>B. rousseauxii</i> , <i>B. vaillantii</i> , <i>B. filamentosum</i> y <i>P. punctifer</i> .	Xx
Tabla 04. Parámetros genéticos para la región control del ADN mitocondrial de <i>B. tigrinum</i> , <i>B. vaillantii</i> , <i>B. rousseauxii</i> , <i>B. filamentosum</i> y <i>P. punctifer</i> .	Xx
Tabla 05. Proporción de haplotipos de acuerdo al número de individuos en <i>B. tigrinum</i> , <i>B. rousseauxii</i> , <i>B. vaillantii</i> y <i>P. punctifer</i>	Xx
Tabla06. Divergencia genética par a par intra e interespecífica estimado con el modelo de evolución TN93 + $\Gamma$ .	xx

## LISTA DE FIGURAS

		Pag.
Figura 01.	Tasas de Captura de <i>B. tigrinum</i> en la Amazonía peruana. Fuente: Dirección Regional de Producción – PRODUCE, Iquitos.	8
Figura 02.	Fig. 02. ADN mitocondrial de peces, con la localización de la región control	Xx
Figura 03.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, mostrando el ADN extraído de: <i>B. tigrinum</i> (A), <i>B. rousseauxii</i> (B), <i>B. vaillantii</i> (C), <i>B. filamentosum</i> (D), <i>P. punctifer</i> (E).	Xx
Figura 04.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando las bandas amplificadas de la región control del ADNmt de: <i>B. tigrinum</i> (A), <i>B. rousseauxii</i> (B), <i>B. vaillantii</i> (C), <i>B. filamentosum</i> (D), <i>P. punctifer</i> (E).	Xx
Figura 05.	Histograma representativo del porcentaje de bases nucleotídicas: Adenina (verde), Citosina (azúl), Guanina (negro) y Timina (rojo); observada en <i>B. tigrinum</i> (BT), <i>B. vaillantii</i> (BV), <i>B. rousseauxii</i> (BR), <i>B. filamentosum</i> (BF) y <i>P. punctifer</i> (PP).	Xx
Figura 06.	Histograma representativo de la variabilidad genética observada en las especies <i>B. tigrinum</i> (BT - rojo), <i>B. vaillantii</i> (BV - verde), <i>B. rousseauxii</i> (BR - azul), <i>B. filamentosum</i> (BF - violeta) y <i>P. punctifer</i> (PP - negro). Mostrando las frecuencias relativas de los parámetros: H, número de haplotipos ETA, número total de mutaciones; K, media de la variabilidad nucleotídica par a par y S, número de sitios polimórficos.	Xx

## I.- INTRODUCCIÓN

La región amazónica abarca un área de 6 112 000 km<sup>2</sup> e incluye países como Ecuador, Colombia, Venezuela, Brasil, Perú, Bolivia y las Guyanas, que comprende cerca de un tercio de toda América del Sur (Barthem & Goulding, 1997). Alberga las mayores cuencas hidrográficas del mundo, y posee la mayor diversidad en especies de peces de agua dulce (Quintero, 2003). La Amazonía peruana es parte de este gran complejo, ocupando una extensión territorial de aproximadamente dos tercios (747 282 km<sup>2</sup>) de la superficie del Perú.

En este vasto territorio los recursos hídricos son de gran importancia, porque no sólo proporcionan alimento (consumo que oscila entre 54 a 100 kg/persona/año), sino también renta para los pobladores amazónicos, con una pesca anual de aproximadamente 80000 toneladas (Sánchez, 2000; Agudelo *et al.*, 2000; Moncada & Ríos, 2002). Iquitos es el principal puerto de desembarque pesquero, cuyos productos provienen en un 75% de la pesca artesanal, compuesto por peces escamados y bagres o peces de “cuero” (Sánchez, 2000). En los últimos años se viene observando una disminución en los desembarques de especies escamadas como la gamitana (*Colossoma macropomum*) y paco (*Piaractus brachypomum*) (Agudelo *et al.*, 2000); así como de los grandes bagres pertenecientes a la familia Pimelodidae: dorado (*Brachyplatystoma rousseauxii*), saltón (*Brachyplatystoma filamentosum*), manitoa (*Brachyplatystoma vaillantii*), doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*) y tigre zúngaro (*Pseudoplatystoma tigrinum*) (Sánchez, 2000; Galvis *et al.*, 2006). Investigaciones recientes muestran signos de sobreexplotación de algunas especies de bagres, las cuales vienen siendo capturadas inclusive con tallas inferiores a la longitud de la primera maduración (Montreuil, 2000), lo que podría causar una disminución drástica de estas especies en muchos hábitats naturales.

Los grandes bagres poseen un elevado valor económico para la Amazonía peruana, tanto por la calidad de su carne como por su valor ornamental. Es conocido que el Perú exporta el 30% de peces ornamentales de América del Sur (Prang, 2007), y el zúngaro tigrinus (*Brachyplatystoma tigrinum*) se encuentra dentro de las 10 especies de peces ornamentales con mayor demanda de exportación. Esta especie es comercializada como ornamental durante su etapa

juvenil, siendo exportada desde la ciudad de Iquitos a aproximadamente 14.57 dólares por ejemplar (Moreau & Coomes, 2007; Ortiz1 & Iannacone, 2008). Los bagres como *P. punctifer*, *B. rousseauxii*, *B. vaillantii* y *B. filamentosum* poseen también un valor económico elevado a nivel regional e internacional; no como peces ornamentales, sino como peces de consumo, debido a la calidad de su carne.

A pesar que *B. tigrinum* se encuentra entre las 12 especies de peces de cuero con prohibición de extraer o exportar en poblaciones naturales (según el reglamento de Ordenamiento Pesquero del Ministerio de la Producción, 2009), la presión de pesca sigue en aumento sobre esta especie. La problemática en la conservación de esta especie se agudiza debido a que es comercializada a edades tempranas, es decir son extraídos del medio natural antes de la edad de primera madurez sexual, sin que hayan logrado contribuir a la perpetuación de su especie a través de la reproducción. Esto ejerce efectos negativos sobre los tamaños poblacionales y por ende una fuerte erosión genética. Este cuadro nos muestra la urgente necesidad de formulación de planes de manejo para *B. tigrinum*.

Pero hasta el momento poco se conoce sobre esta especie, siendo necesario generar conocimientos sobre su biología, ecología, rasgos de vida y variabilidad genética; de tal manera que se la pueda explotar de forma sostenida en los ambientes naturales sin ponerla en riesgo. El presente estudio tuvo por objetivo generar conocimientos sobre la variabilidad genética de *B. tigrinum* en comparación con otras especies de grandes bagres de la Amazonía peruana, así como establecer las relaciones filogenéticas entre ellas.

## II. OBJETIVOS:

### 2.1 Objetivo General

- Establecer la diversidad genética y las relaciones filogenéticas de *Brachyplatystoma tigrinum* y cuatro especies de la familia Pimelodidae en la Amazonía peruana.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la variabilidad haplotípica y nucleotídica de *Brachyplatystoma tigrinum*, y compararla con la de cuatro especies de la familia Pimelodidae en la Amazonía peruana.
- Establecer las relaciones filogenética entre *Brachyplatystoma tigrinum*, *B. rousseauxii*, *B. filamentosum*, *B. vaillantii* y *Pseudoplatystoma punctifer*.

### III. REVISION BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Sistemática y biología de los bagres

##### 3.1.1 Taxonomía

El orden Siluriformes es el segundo grupo de peces más importante en cuanto a número de especies en el Neotrópico. Se caracterizan por tener la piel desnuda (no presentan escamas) o cubierta de placas óseas y poseer hasta cuatro pares de barbicelos tanto maxilares como mentonianos (Galvis *et al.*, 2006), las aletas dorsal y pectoral suelen estar bien desarrollados y tener aspecto aserrado (Salinas & Agudelo, 2000). Este orden está constituido por 34 familias, 11 de las cuales se encuentran en la cuenca amazónica, siendo las familias Pimelodidae, Loricaridae y Bagridae las de mayor importancia económica (Nelson, 1994). La familia Pimelodidae presenta más de 300 especies, algunas de ellas conocidas como zúngaros o grandes bagres que tienen un elevado valor comercial en la Amazonía continental (Sanchez, 2000; Galvis *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006).

##### 3.1.2 Sistemática

Se clasifican de acuerdo a Nelson (1994) y las respectivas denominaciones de las especies citadas por Salinas & Agudelo (2000); Lundberg & Akama (2005) y Galvis *et al.* (2006)

Reino	:	Animalia
Phyllum	:	Chordata
Subphyllum	:	Vertebrata
Superclase	:	Gnathostomata
Clase	:	Actinopterygii
Subclase	:	Neopterygii
División	:	Teleostei
Subdivisión	:	Euteleostei
Superorden	:	Ostariophysi
Orden	:	Siluriformes
Familia	:	Pimelodidae
Géneros	:	<i>Brachyplatystoma</i> , <i>Pseudoplatystoma</i>

Especies : *Brachyplatystoma tigrinum* (Britski, 1981)  
*Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelneau, 1855)  
*Brachyplatystoma filamentosum* (Lichtenstein, 1819)  
*Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes, 1840)  
*Pseudoplatystoma punctifer* (Linnaeus, 1840)

### 3.1.3 Distribución

A nivel mundial la familia Pimelodidae tiene una distribución muy amplia, esta presente en todos los continentes (Galvis *et al.*, 2006). En la cuenca amazónica, especies como *B. rousseauxii* y *B. vaillantii* ocupan durante su ciclo de vida, grandes extensiones de los ríos amazónicos y las zonas de estuario, reconociéndoles tres áreas de ocupación bien diferenciadas: crianza, alimentación y desove (Barthem & Fabre, 2005). Esta región abarca los territorios de Perú, Bolivia, Colombia y Brasil (Barthem & Goulding, 1997).

La presencia en el Perú de los bagres en estudio es muy variada, observándolos en los ríos Amazonas, Ucayali, Marañón, Putumayo y Madre de Dios, estos ríos son considerados de gran importancia por considerarse zonas de desove por la presencia de larvas (Rojas *et al.*, 2007). En Colombia, estos bagres también fueron observados en los ríos Caqueta, Putumayo y Amazonas; mientras que en Brasil, en el sistema del río Madeira – Beni – Mamoré y el estuario amazónico (Sanchez, 2000; Montreuil, 2000).

### 3.1.4 Alimentación

Los peces de la familia Pimelodidae son piscívoros, encontrándose en el nivel más alto de la cadena trófica. Se alimentan de una gran variedad de presas que son seleccionadas ya sea por la abundancia, tamaño, morfología o por ser fáciles de capturar. El grupo más importante de presas son aquellas de formas fusiformes, donde se destacan Characiformes, Gymnotiformes, Perciformes e incluso otros pequeños Siluriformes (Barthem & Goulding, 1997; Gallo, 2000). Los bagres del género *Brachyplatystoma* presentan cierta preferencia alimenticia por presas como: *Hypophthalmus sp.*, *Prochilodus sp.*, *Loricariidae sp.*, *Astyanax sp.*, *Mylossoma sp.*, *Cichlidae sp.* Mientras que los del género *Pseudoplatystoma* tienen preferencia por las familias: Prochilodontidae, Curimatidae, Anostomidae, Characidae y otros pequeños Pimelodidae (Agudelo *et al.*, 2000).

### 3.1.5 Hábitat

La mayoría de los Pimelodidae prefieren los ríos a las lagunas, muy pocas especies sobrepasan la zona de pie de monte; por lo general son peces de fondo y hábitos nocturnos. Estos bagres debido a sus hábitos migratorios habitan los canales principales de los grandes ríos de aguas blancas que poseen aguas corrientes e incluso algunos tributarios de aguas oscuras y claras. Ocasionalmente entran a las várzeas durante la noche para alimentarse y retornan a las aguas profundas del canal del río antes del amanecer (Galvis *et al.*, 2006; Barthem & Goulding, 1997). Un indicador para el inicio de la migración de especies del género *Brachyplatystoma* y otros bagres, es el ingreso de aguas saladas en el estuario amazónico en Brasil, esta migración también está atribuida al fenómeno de reproducción de estas especies o al acompañamiento de cardúmenes de peces de escama para su alimentación (Agudelo *et al.*, 2000; Barthem & Fabre, 2005).

### 3.1.6 Importancia Económica

En los países que comparten la cuenca amazónica, la pesca además de ser la principal fuente de proteína animal, es uno de las principales fuentes de generación de recursos económicos, debido al creciente flujo comercial a nivel regional y las exportaciones a nivel nacional e internacional. De manera que la pesca de los bagres desempeña un papel importante como medio de subsistencia, alimentación y empleo para la población local, contribuyendo al desarrollo económico del país (Montreuil, 2000).

El consumo anual de pescado en el año 1998 en América del Sur bordeó las 250000 toneladas, siendo los países con mayor consumo Brasil y Perú. Los principales puertos de desembarque de los grandes bagres se encuentran en las ciudades de Belem do Pará y Manaus en Brasil, Leticia en Colombia e Iquitos en Perú. En la cuenca amazónica sólo 14 especies de bagres migratorios cuentan con mayor interés económico por la calidad de su carne (Tabla 01), en Brasil los bagres de mayor relevancia son la manitoa (*B. vaillantii*) y dorado (*B. rousseauxii*); en Colombia doncella y tigre zúngaro (*P. punctifer* y *P. tigrinum* respectivamente) y el saltón (*B. filamentosum*); en Perú el dorado (*B. rousseauxii*), tigre zúngaro (*P. tigrinum*) y la doncella (*P. punctifer*) (Montreuil, 2000; Quintero, 2003). A diferencia

de estas especies, el zungaro tigrinus (*B. tigrinum*) es especialmente importante como pez ornamental a edades tempranas.

Tabla 01. Principales especies de bagres amazónicos explotados comercialmente

Nombre Científico	Nombre Vernacular		
	Perú	Colombia	Brasil
<i>Brachyplatystoma vaillantii</i> (VALENCIENNES, 1840)	manitoa	pirabutón	piramutaba
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> (CASTELNEAU, 1855)	dorado	dorado, plateado	dourada
<i>Brachyplatystoma filamentosum</i> (LICHTENSTEIN, 1819)	saltón	lechero, valentón	piraíba
<i>Brachyplatystoma juruense</i> (BOULENGER, 1898)	zúngaro alianza	apuy, manta negra	camiseta, zebra
<i>Brachyplatystoma tigrinum</i> (BRITSKI, 1891)	tigrinus	zebra, camiseta	dourada zebra
<i>Brachyplatystoma platynemum</i> (BOULENGER, 1898)	mota flemosa	baboso	babão, xeréu
<i>Pseudoplatystoma punctifer</i> (CASTELNEAU, 1855)	doncella	pintadillo	surubim
<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i> (VALENCIENNES, 1840)	tigre zúngaro	pintadillo	caparari
<i>Zungaro zungaro</i> (HUMBOLDT, 1821)	cunchimama	pejenegro	jaú
<i>Phractocephalus hemiliopterus</i> (BLÖCH Y SCHEIDER, 1801)	peje torre	guacamayo	pirarara
<i>Platynemichthys notatus</i> (JARDINE, 1841)	mota labio	capaz, capitan	coroata, cara
<i>Sorubimichthys planiceps</i> (SPIX Y AGASSIZ, 1829)	achacubo	pejeleño, paletón	pirauaca
<i>Leiarius marmoratus</i> (GILL, 1870)	achara	barbudo	jundiá
<i>Pimelodina flavipinnis</i> (STEINDACHNER, 1877)	mota	mandí	mandi-moela

Fuente: Montreuil, 2000; Galvis *et al.* 2006 ; Santos *et al.* 2006

En el Perú son 10 las especies de peces ornamentales con mayor importancia para la exportación, dentro de las cuales se encuentra *B. tigrinum*. En el año 2001 esta especie generó un ingreso de US\$ 67907 (Moreau & Coomes; 2007). Actualmente es explotada exclusivamente como ornamental, presentando una creciente demanda en los mercados europeos y asiáticos, donde puede alcanzar precios elevados por ejemplar, en Europa entre 300 a 600 euros y en Asia entre £500 a £600 (Ralph, 2006; Moreau & Coomes; 2007). Esta demanda es cubierta totalmente de su captura en el medio natural (Montreuil, 1991; citado en Gómez *et al.*, 2005), la cual se ve reflejada en datos de exportación ornamental de los últimos nueve años (Fig. 01), donde se observa que solamente entre los años 2002 al 2005 se cumplió con la regulación normada en el reglamento de ordenamiento pesquero del año 2001; observándose actualmente un aumento gradual en las capturas (datos de exportación del ministerio de la Producción).

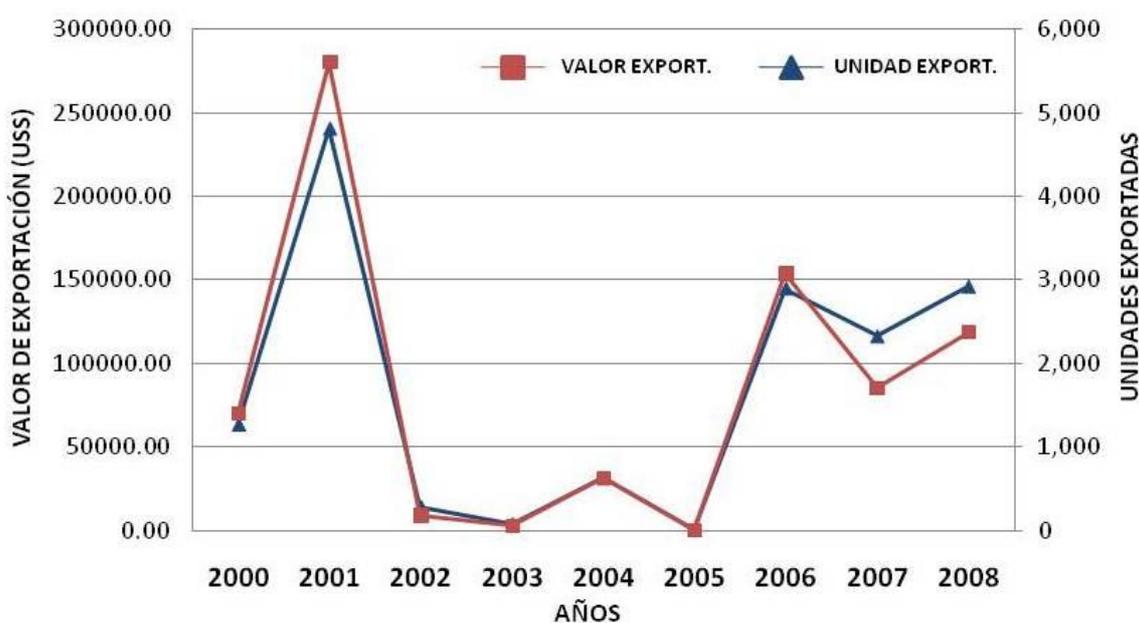


Fig. 01. Tasas de Captura de *B. tigrinum* en la Amazonía peruana. Fuente: Dirección Regional de Producción – PRODUCE, Iquitos.

## **3.2 Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se relacionan con un rasgo genético, pero que posee variaciones o polimorfismos suficientes para agrupar a ciertos organismos, y funcionan como un señalador de diferentes regiones del genoma (Picca *et al.*, 2004). Estas biomoléculas pueden ser proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia). Los marcadores de ADN son secuencias que actúan como marcaje, siendo teóricamente posible observar y explotar la variación genética de las especies a través del ADN mitocondrial (ADNmt), ADN ribosomal (ADNr), minisatélites o número variables de repeticiones en tandem (VNTR), RFLP, RAPD, AFLP y los microsatélites (Avisé, 2004; Liu & Cordes, 2004).

## **3.3 El genoma mitocondrial**

### **3.3.1 Origen y función de la mitocondria**

La mitocondria es un organelo citoplasmático que surgió probablemente hace 2 billones de años, a partir de una bacteria aeróbica de vida libre o  $\alpha$ -proteobacteria. Esta bacteria se habría tornado parte de un huésped archaeal o eucariota primitiva por un proceso endosimbiótico. La transición de la bacteria autónoma al huésped prosperó, pues cada uno, habría brindado servicios bioquímicos al otro, que fue fundamental en la evolución de las células eucariotas. Así la mitocondria es un organelo semiautónomo con capacidad de auto replicación en el citoplasma de las células eucariotas (Meyer, 1993; Gray *et al.*, 1999; Osteryoung & Nunnari, 2003; Dyall *et al.*, 2004; Futuyma, 2005; Passarge, 2007; Falkenberg *et al.*, 2007).

La mitocondria juega un rol central en el metabolismo, la apoptosis, las enfermedades y el envejecimiento celular. Ellos están en el sitio de la fosforilación oxidativa, esencial para la producción de adenosina trifosfato (ATP). El ATP es almacenado para formar energía celular, utilizada en el accionar de la mayoría de los procesos necesarios para el crecimiento y desarrollo de la célula, y otras funciones bioquímicas (Boore, 1999; Osteryoung & Nunnari, 2003; Barlow-Stewart, 2007).

### 3.3.2. Estructura y propiedades del genoma mitocondrial

Dentro de cada célula eucariota, existen muchas mitocondrias, y dentro de los compartimientos mitocondriales hay un genoma separado de la cromatina nuclear, este es el ADN mitocondrial (ADNmt) que existen en total de 100 – 1000 copias de este genoma en cada célula (Boore, 1999; Ingman & Gyllensten, 2001). El ADNmt es circular y de doble cadena, carece de intrones y se compone de  $16500 \pm 500$  pares de bases (pb) en los vertebrados. Es 200000 veces más pequeña que el ADN nuclear. Tiene una hebra leve (L) y pesada (H), estos nombres reflejan las diferencias marcadas en sus contenido de G + T en vertebrados (Passarge, 2007; Meyer, 1993). El ADNmt posee características importantes: puede mutar de 10 – 20 veces más que el ADN nuclear probablemente por un fallo de lectura de prueba del ADNmt polimerasa y por carecer de un sistema efectivo de reparación (Schlick, *et al.* 2006), es de herencia exclusivamente materna y posee poliplasmia. Estas características hacen del genoma mitocondrial una herramienta útil como marcador para diversos estudios evolutivos, poblacionales y filogenéticos (Awise, *et al.* 1987; Lee *et al.*, 1995; Ingman & Gyllensten, 2001).

### 3.3.3 Organización del genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial de animales (Fig. 02) contiene 13 genes que codifican para proteínas, dos genes que codifican para ARN ribosomal (ARNr - un pequeño 12S y largo 16S), 22 genes codificadores de ARN transferencia (ARNt) y una región mayor no codificante denominada región control o D-Loop, que contiene el sitio de inicio para la replicación del ADNmt y transcripción del ARN (Meyer, 1993; Schon & DiMauro, 2007). Estos genes mitocondriales codifican subunidades de enzimas involucradas en la cadena transportadora de electrones (Barlow-Stewart, 2007). Son siete subunidades de NADH deshidrogenasa (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), el citocromo *b*, tres subunidades de citocromo *c* oxidasa (CO I, II, III) y dos subunidades de ATP sintetasa (ATPasa 6 y 8). Con pocas excepciones, todos los genes en el genoma mitocondrial de vertebrados son codificados por la hebra 'H'. De los 37 genes estructurales en el genoma mitocondrial, sólo ND6 y ocho ARNt son codificados por la hebra 'L'. El número de bases de codificación en la hebra L en vertebrados es menos del 10% del número total de bases de codificación en el genoma mitocondrial (Meyer, 1993).



responsable por la variación de tamaño observada en el genoma mitocondrial de los vertebrados (Densmore *et al*, 1985; Harrison *et al*, 1985), pues en algunos organismos la región control posee inserciones de pares de bases que pueden llegar a centenas de nucleótidos (Meyer, 1993).

El ADN mitocondrial y la región control se han utilizado para diversos trabajos de investigación. En humanos se ha inferido acerca de la evolución (Cann *et al*, 1984; Ingman & Gyllensten, 2001). También se estudiaron ballenas (Alter & Palumbi, 2009) y aves (Randi *et al.*, 2001).

En peces; Bernatchez *et al* (1989), Grant & Bowen (1998), Higuchi & Kato (2002) y Fauvelot *et al.* (2003), estudiaron la diversidad genética de peces marinos. Shedlock *et al* (1992) y Tessier *et al* (1995) estudiaron al salmón. En peces amazónicos, Hubert *et al.* (2007) estudio especies del género *Serrasalmus*. Renno *et al.* (2006) especies del género *Cichla* y Hrbek & Farias, (2008) a la especie *Arapaima gigas* secuenciando el genoma mitocondrial completo.

Dentro del orden Siluriformes, Shimabukuro *et al.* (2004) estudio la relación filogenética en la familia Callichthyidae. Jondeung *et al.* (2007) la especie *Pangasianodon gigas*. Coronel *et al.* (2004), Formiga (2004), Batista *et al.* (2006) y Huergo (2009), estudiaron especies de la familia Pimelodidae.

En Perú se realizaron trabajos de la variabilidad genética interpoblacional de *B. rousseauxii*, en las ciudades de Iquitos y Pucallpa, mediante el análisis de secuencias nucleotídicas de la región control del ADNmt (García *et al*, 2004). Del mismo modo se estimó la variabilidad genética de *B. rousseauxii*, en siete localidades de la amazonía continental, tales como Belém, Manaus, Tabatinga, Rio Iça (Brasil), Iquitos, Rio Ucayali y Rio Madre de Dios (Perú) (Batista *et al*, 2005).

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Área de trabajo**

La presente investigación se ejecutó en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular – LBGM, del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP); ubicado en la Estación Biológica de Quistococha, Carretera Iquitos - Nauta km 4.5, distrito de San Juan Bautista, Iquitos – Loreto – Perú.

### **4.2. Obtención del Material Biológico**

Fueron colectadas muestras de tejido muscular de la región dorso-lateral del cuerpo o aleta pectoral de *Brachyplatystoma tigrinum*, *B. vaillantii*, *B. rousseauxii*, *B. filamentosum* y *Pseudoplatystoma punctifer*, en el mercado de Belén de la ciudad de Iquitos. Las muestras fueron conservadas en frascos pequeños de plástico (15ml) conteniendo alcohol al 96%, cada frasco fue rotulado con el código de la muestra y almacenados hasta el momento de la extracción del ADN.

### **4.3. Extracción y verificación del ADN total**

#### **4.3.1 Extracción del ADN usando el método CTAB**

La extracción de ADN a partir de tejido muscular conservado en alcohol de 96%, fue realizado mediante el método de extracción CTAB (Doyle & Doyle, 1987) descrito a continuación:

#### **Protocolo de CTAB de Doyle & Doyle (1987)**

1. En un microtubo de 2ml, conteniendo 1ml del tampón CTAB (CTAB 5%, NaCl 5M, EDTA 0.5M pH 8, Tris Base 1M) triturar 100mg de tejido muscular. Adicionar 10µl de Proteinasa K (10mg/µl) y macerar a 60 °C en baño María x 24 horas.
2. Separar el material genómico con 1ml de cloroformo, a continuación centrifugar a 8000rpm x 5 minutos.
3. Tomar 500µl del sobrenadante y precipitar el ADN con Isopropanol absoluto frío a -20°C x 2h. Centrifugar a 13 000rpm x 15 minutos, desechar el Isopropanol por inversión de los microtubos.

4. Lavar el ADN total (pellet) con etanol al 70%, centrifugar a 13000rpm x 15 minutos, desechar el etanol por inversión de los microtubos.
5. El pellet fue secado por aproximadamente 5 horas a temperatura ambiente y finalmente resuspendido en 30µl de agua ultrapura.

#### **4.3.2. Cuantificación**

La pureza y concentración del ADN, se determinó por espectrofotometría (260nm y 280nm). Se trabajó con un factor de dilución (FD) de 100ng/µl (495µl de agua desionizada autoclavada y 5µl del material genómico resuspendido). La evaluación de la calidad de la extracción (ratio), se realizó en un rango aceptable entre: 1.7 – 2.2 ( $A_{260}/A_{280}$ ). Finalmente se determinó la concentración de ADN con la fórmula [ $A_{260} \times \text{FD} \times 50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ].

#### **4.3.3. Verificación de la extracción de ADN por electroforesis**

La calidad de la extracción fue verificada mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio (10mg/ml), tampón de corrida TBE 1X, a 100V por 20 minutos. El ADN fue visualizado en un transluminador de UV y fotodocumentado utilizando un sistema de imagen GEL LOGIE 100, KODAK.

#### **4.4. Amplificación de la región control del ADNmt vía PCR**

Fue amplificada la región control del ADNmt mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los *primers*: DL20F: 5'–TTA GCA AGG CGT CTT GGG CT–3', DL20R: 5'–ACC CCT AGC TCC CAA AGC TA–3' (Renno *et al.* 2006). La reacción fue realizada en un volumen total de 30µl, conteniendo 100ng/µl de ADN molde (2.5µl), 5x de Buffer (6µl), 25mM de MgCl<sub>2</sub> (1.8µl), 2mM de dNTPs (3µl), 10µM de cada primer (1.2µl) y 5U/µl de Taq ADN polimerasa (0.24µl). Las condiciones de temperatura fueron: 01 ciclo de denaturalización inicial a 92°C x 3min, seguidos de 30 ciclos con denaturación de 92°C x 1min; temperatura de anelamiento con optimizada para cada especie/1min (*B. rousseauxii*, *B. vaillantii* y *P. punctifer* 57.8°C, *B. filamentosum* 55.0°C y *B. tigrinum* 54.1°C) y extensión 72°C/1:30 min; finalmente una extensión final a 72°C/3min.

#### **4.2.1. Electroforesis de productos de amplificación**

Se realizó en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio (10mg/ml) a razón de 1µl/50ml, los cuales fueron sometidos a un campo eléctrico horizontal de 100V por 30min, sumergidos en tampón TBE 1X (50 mM Tris, 1 mM EDTA y 48.5 mM de ácido bórico). El tamaño de los productos de amplificación fue determinado mediante el uso del marcador de peso molecular Ladder de 100pb. Los resultados fueron fotodocumentados, utilizando un sistema de imagen GEL LOGIE 100, KODAK.

#### **4.5. Secuenciamiento nucleotídico de la región control del ADNmt**

##### **4.5.1. Reacción de secuenciamiento nucleotídico**

El secuenciamiento nucleotídico de la región control del ADNmt, se realizó con la ayuda del Analizador 3130 Genetic Analyzer – Applied Biosystems, mediante el software Sequencing Analysis v5.3.1, mediante el método enzimático de incorporación de dideoxynucleótidos utilizando un Kit comercial de secuenciamiento *ABI PRISM BigDye Terminators v3.1 Cycle Sequencing*. Cada muestra de ADN amplificado fue secuenciada en dos etapas, uno con el *primer forward* (F) y el otro con el *primer reverse* (R). Por la complementación de las dos secuencias fue posible obtener casi toda la secuencia completa de la región control de las muestras en estudio. La reacción de secuenciamiento se realizó con las siguientes condiciones: 6.5µl de agua Milli-Q, 8µl de solución de secuenciamiento *BigDye Terminators v3.1*, 0.5µl de *primer F* o *R* (5pmol) y 5µl de ADN amplificado (5-20ng/µl) para un volumen final de 20µl en cada microtubo. Se llevó a un termociclador donde se aplicó el siguiente perfil de temperatura: denaturación inicial a 96 °C/1min, 30 ciclos con una denaturación de 96°C/15seg, anelamiento de 50°C/15seg y extensión 60°C/4min, la extensión final a 10°C, fue importante configurar el termociclador a una rampa de 1°/seg.

##### **4.5.2. Purificación de productos de la reacción de secuenciamiento**

Los productos obtenidos en la reacción de secuenciamiento, fueron transferidos a microtubos de 0.5ml para realizar la purificación. Se agregó 80µl de isopropanol al 65%, luego los microtubos fueron vortecados vigorosamente y se les realizó un spink back, se cubrió los microtubos con papel aluminio y se dejó a

temperatura ambiente por 20min, pasado este intervalo de tiempo, se centrifugó a 14000rpm por 25min, donde el sobrenadante fue descartado. El pellet fue lavado con 200µl de etanol al 60%, se vorteció y centrifugado a 14000rpm por 5min. El etanol fue removido con la ayuda de una micropipeta, luego se dejó secar en baño seco a 37°C por 30min y finalmente se resuspendió en 10µl de Formamida. Antes que las muestras sean corridas en el analizador genético, fueron denaturadas en un termociclador a 95°C/2min y 4°C/2min.

#### **4.5.3. Corrida de las muestras en el analizador genético**

Luego de la purificación, los productos de la reacción de secuenciamiento fueron finalmente corridos en el Analizador Genético 3130 Genetic Analyzer – Applied Biosystems, siguiendo la metodología del fabricante. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software Sequencing Analysis v5.3.1.

#### **4.5.4. Edición y alineamiento para la formación de secuencias consenso**

Para la obtención de las secuencias consenso de cada muestra o ADN amplificado, las secuencias brutas de la reacción de secuenciamiento (Forward y Reverse) fueron alineadas y editadas con ayuda del programa BioEdit v.7.0.9. (Hall, 1999), que permitió comparar a través de la visualización de la versión *fasta* y *chromatogram* de las secuencias, la veracidad de las bases nucleotídicas.

#### **4.5.5. Obtención de la matriz general con las secuencias consenso de las especies en estudio**

Para la especie *B. tigrinum* se consideró 41 secuencias consenso y 30 para cada una de las demás especies en estudio, obteniéndose un total de 161 secuencias consenso en la matriz. Se utilizó el programa de alineamiento múltiple ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) que está dentro del programa BioEdit v.7.0.9. (Hall, 1999). Inicialmente las secuencias fueron alineadas separadas para cada especie, luego fueron agrupadas en una matriz general. Esta matriz base fue optimizada mediante la inserción de espacios o “gaps”, con la finalidad de mantener la homología entre algunas de las bases nucleotídicas de los especímenes estudiados. Los extremos de las secuencias consenso con un número muy elevado de bases fueron eliminadas para igualarlas con aquellas más cortas. Para *B. rousseauxii* se obtuvo en promedio 850pb (anexo 01), para

*B. vaillantii* 875pb (anexo 02), *B. filamentosum* 850pb (anexo 03), *P. punctifer* 852pb (anexo 04) y *B. tigrinum* 931pb (anexo 05).

#### **4.6. Análisis de la variabilidad genética de *B. tigrinum*, *B. rousseauxii*, *B. vaillantii*, *B. filamentosum* y *P. punctifer***

##### **4.6.1 Análisis del polimorfismo de ADN**

Se realizó a partir de una matriz general conteniendo las secuencias consenso de todas las especie y con ayuda del programa DNASP v.5.00 (Rozas & Rozas, 1999). Se obtuvieron parámetros genéticos para la región control del ADN mitocondrial (D-Loop) de cada especie: El número de Haplotipos (H), número de haplotipos únicos (Hu), la diversidad haplotípica (Hd), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), número total de mutaciones (*ETA*), media de las diferencias nucleotídicas entre pares de individuos (*K*), número total de sitios, número de sitios polimórficos (S) (Nei, 1987a), número de transiciones (Ts), número de transversiones (Tv), el número de *indels* y la composición nucleotídica.

##### **4.6.2 Análisis de proporción de haplotipos**

Se realizó con ayuda del programa R (Paradis *et al.*, 2004; Paradis, 2006) para crear una red entre los haplotipos de las especies *B. tigrinum*, *B. rousseuxii*, *B. vaillantii*, *B. filamentosum* y *P. punctifer*. Así, poder observar la proporción del número de individuos por haplotipo. Esto fue bajo el criterio de máxima parsimonia (Fitch, 1971; Nei, 1996), que consiste en escoger la hipótesis más simple dentro de todas las hipótesis posibles, o sea, la propuesta que presente el menor número de pasos, ya que cada paso representa una mutación de estado de carácter y, en el caso de secuencias de ADN, una mutación en uno de los sitios de las secuencias alineadas.

##### **4.6.3 Análisis de la divergencia genética intra e interespecífica**

El modelo de evolución nucleotídica para la región control del ADNmt, fue seleccionado de entre 28 modelos alternativos de acuerdo con los valores del Criterio de Información Akaike (AIC) (Akaike, 1973) basados en el Análisis de Filogenia y Evolución (APE), usando el programa R (Paradis *et al.*, 2004; Paradis, 2006). En este caso resultó el modelo de evolución TN93 +  $\Gamma$  (Tamura & Nei, 1993). Este modelo es considerado uno de los más realistas y se basa en una

frecuencia desigual entre las bases nucleotídicas, con las sustituciones presentando dos clases de transiciones y una clase de transversión (Simon *et al.*, 2006). Este modelo fue utilizado para estimar la media de las divergencias genéticas par a par dentro y entre las especies, con uso del programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), teniendo en cuenta que *P. punctifer* es nuestra comparativa.

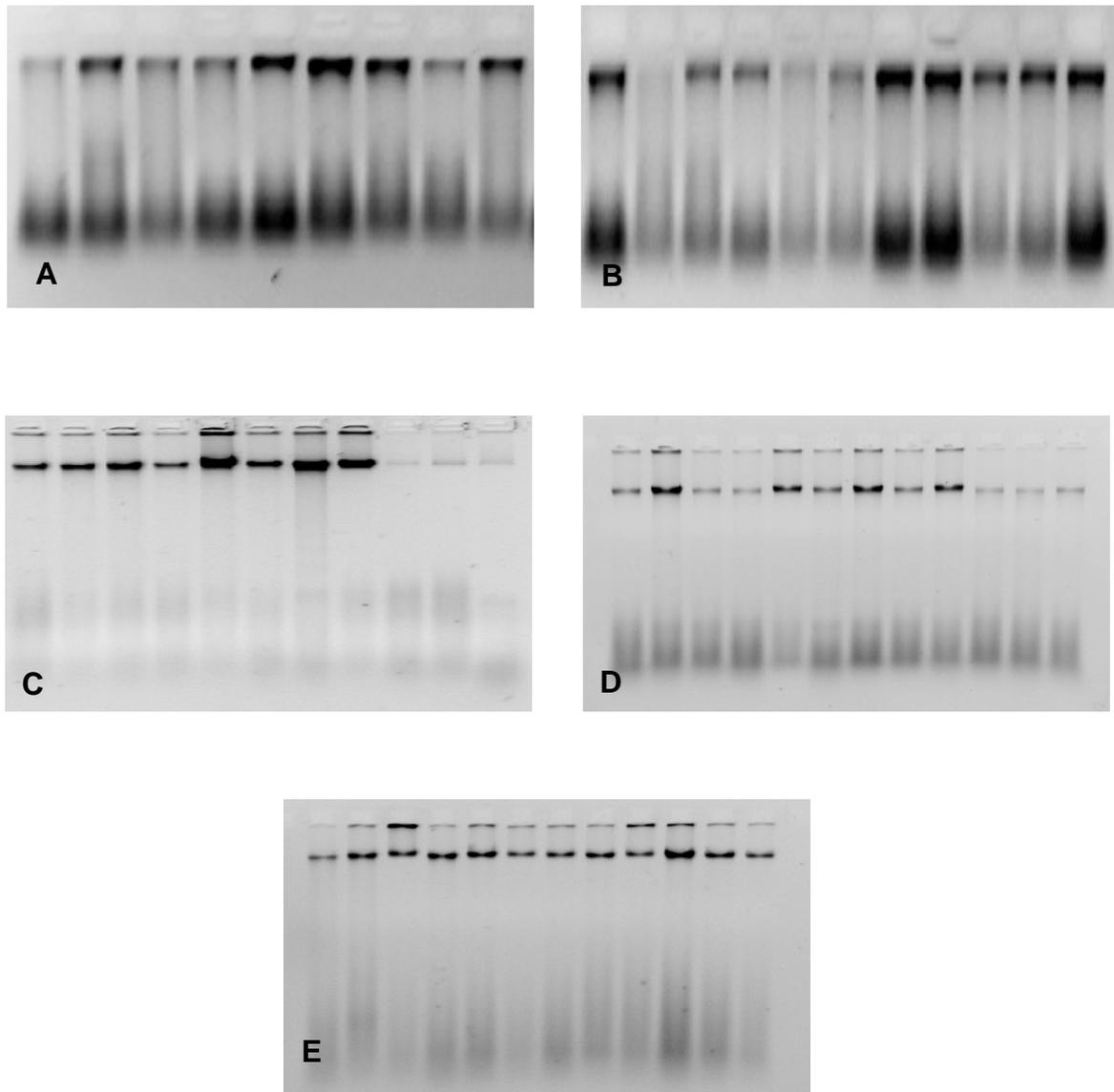
#### **4.7. Análisis filogenético**

Para la relación filogenética entre las especies de *Brachyplatystoma*, considerando a *P. punctifer* como grupo externo, se construyó un árbol filogenético (filograma). Primero se obtuvo el mejor modelo de evolución, que fue TN93 +  $\Gamma$  (Tamura & Nei, 1993). Luego se construyó el árbol filogenético utilizando el programa PhyML versión 3.2 (<http://atge.lirmm.fr/phyml>) (Guindon & Gascuel, 2003). Este análisis fue realizado bajo el criterio de Máxima Verosimilitud - MV (Felsenstein, 1981), cuyo principio es evaluar la probabilidad de un determinado modelo de cambio evolutivo para secuencias nucleotídicas y explicar el origen de los datos observados, y así permitir seleccionar a partir de una matriz, la topología que sea más verosímil. El nivel de confianza fue testado mediante el método no paramétrico *bootstrap* (Felsenstein, 1985), con 1000 réplicas; este análisis permite el remuestreo de caracteres de la matriz con reposición de datos, generando así nuevas matrices. Para mayor resolución en los nodos mayores del árbol, se adicionó como grupo externo a las cinco especies en estudio, cuatro secuencias más de la región D-Loop de especies del orden Siluriformes: tres secuencias de la especie *Phractocephalus hemiliopterus* (Familia Pimelodidae) y uno de la especie *Rhamdia sp.* (Familia Heptapteridae).

## V. RESULTADOS

### 5.1 Extracción de ADN

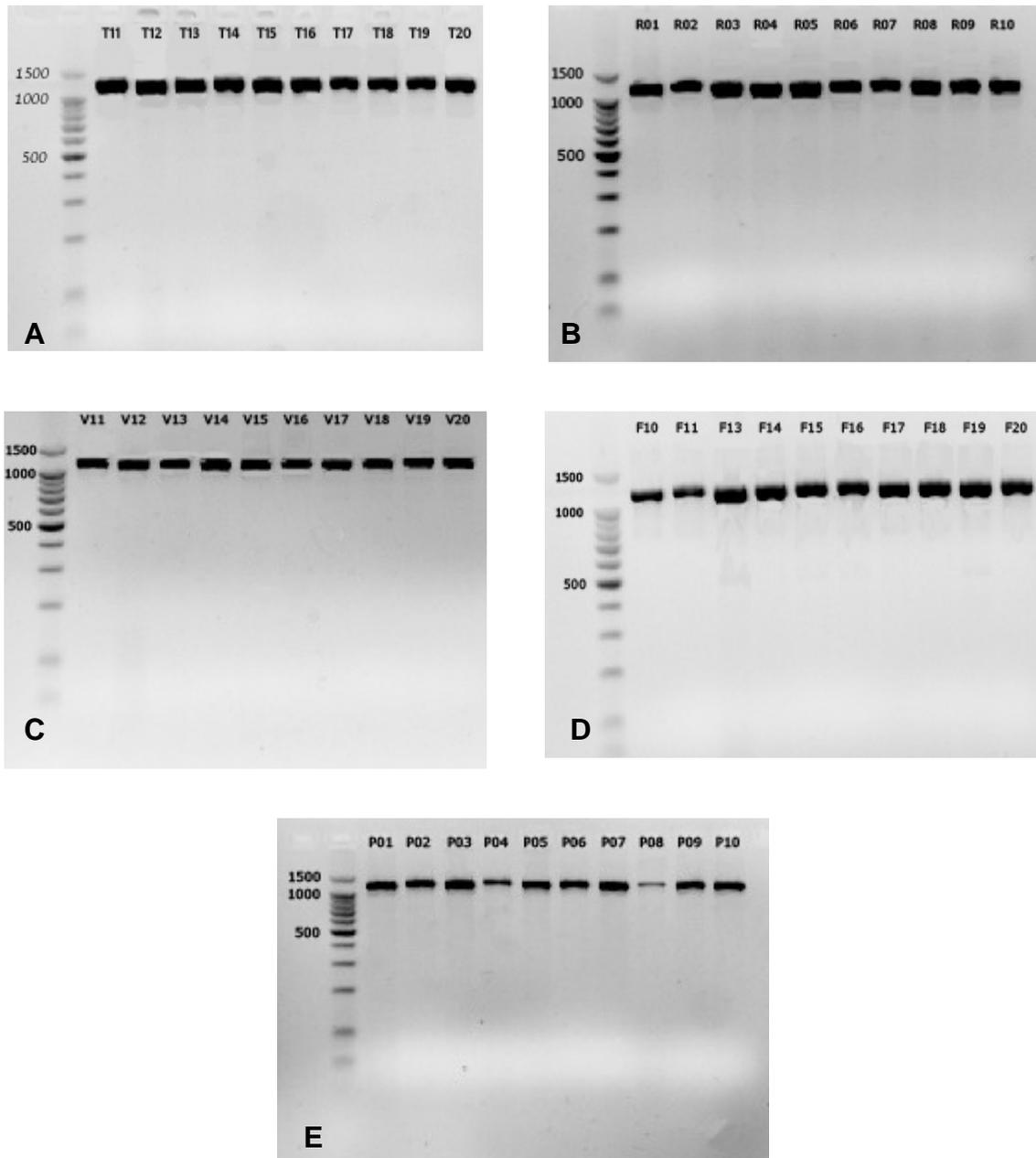
Fue extraído satisfactoriamente el ADN genómico de un total de 161 especímenes, 41 de *B. tigrinum*, 30 *B. rousseauxii*, 30 *B. vaillantii*, 30 *B. filamentosum* y 30 *P. punctifer* (Fig. 03 A, B, C, D, E).



**Fig. 03.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, mostrando el ADN extraído de: *B. tigrinum* (A), *B. rousseauxii* (B), *B. vaillantii* (C), *B. filamentosum* (D), *P. punctifer* (E).

## 5.2 Amplificación de la región control (D-loop) del ADNmt

La figura 04 muestra algunas de las bandas obtenidas en la amplificación vía PCR de la región control del ADNmt de los especímenes pertenecientes a las cinco especies en estudio, (Figs.04 A, B, C, D, E).



**Fig. 04.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando las bandas amplificadas de la región control del ADNmt de: *B. tigrinum* (A), *B. rousseauxii* (B), *B. vaillantii* (C), *B. filamentosum* (D), *P. punctifer* (E).

### 5.3 Análisis de la matriz de secuencias

Cuando alineadas las secuencias de cada especie por separado, todas ellas presentan cantidades similares de sitios informativos para parsimonia, sitios variables y sitios reservados. A excepción de *B. tigrinum* quien a pesar de contar con el mayor número de secuencias presenta valores menores. Cuando todas las secuencias fueron alineadas en una única matriz, mostraron 297 sitios informativos para parsimonia, 315 fueron sitios variables y 645 sitios conservados (tab. 03).

Tabla 02. Valores de sitios informativos para parsimonia, sitios variables y sitios reservados encontrados para la región control del ADN mitocondrial de los especímenes *B. tigrinum*, *B. rousseauxii*, *B. vaillantii*, *B. filamentosum* y *P. punctifer* analizados.

<b>Especies</b>	<b>BT</b>	<b>BR</b>	<b>BV</b>	<b>BF</b>	<b>PP</b>	<b>Todas</b>
<b>N°</b>	41	30	30	30	30	<b>161</b>
<b>Sitios informativos parsimonia</b>	09	30	46	22	18	<b>297</b>
<b>Sitios variables</b>	10	42	73	33	28	<b>315</b>
<b>Sitios conservados</b>	<b>921</b>	<b>809</b>	<b>810</b>	<b>817</b>	<b>825</b>	<b>645</b>

Abreviaciones: BT= *B. tigrinum*, BR= *B. rousseauxii*, BV= *B. vaillantii*, BF= *B. filamentosum* y PP= *P. punctifer*.

### 5.4 Variabilidad genética de *B. tigrinum*, *B. rousseauxii*, *B. vaillantii*, *B. filamentosum* y *P. punctifer*

#### 5.4.1 Composición nucleotídica

La tabla 04 y la figura 13 muestran que el porcentaje de bases nucleotídicas en las cinco especies en estudio fueron similares, siendo que los valores de Adenina (A) y Timina (T) fueron mayores que las de Citosina (C) y Guanina (G). *B. tigrinum* y *B. filamentosum* presentaron mayores porcentajes de Adenina, en tanto que *B. vaillantii*, *B. rousseauxii* y *P. punctifer* presentaron mayores valores de Timina.

Tabla 03. Porcentaje de la composición nucleotídica para la región control del ADN mitocondrial de *B. tigrinum*, *B. rousseauxii*, *B. vaillantii*, *B. filamentosum* y *P. punctifer*.

Composición nucleotídica	<i>B. tigrinum</i>	<i>B. rousseauxii</i>	<i>B. vaillantii</i>	<i>B. filamentosum</i>	<i>P. punctifer</i>
<b>Adenina (A)</b>	33.92%	31.92%	31.93%	33.06%	31.05%
<b>Timina (T)</b>	32.33%	32.74%	32.44%	31.00%	33.16%
<b>Citosina (C)</b>	19.89%	21.49%	22.25%	22.44%	22.41%
<b>Guanina (G)</b>	13.85%	13.85%	13.38%	13.50%	13.38%

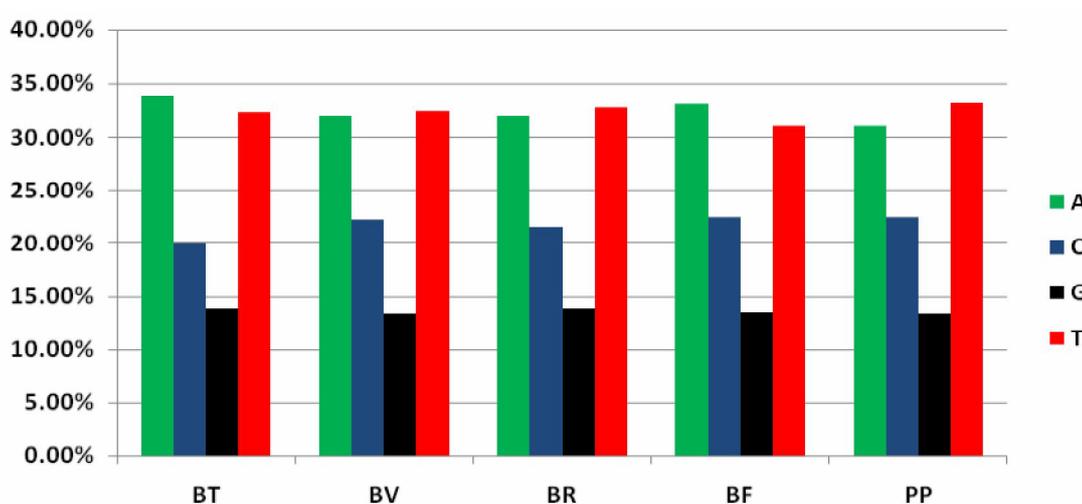


Fig. 05. Histograma representativo del porcentaje de bases nucleotídicas: Adenina (verde), Citosina (azul), Guanina (negro) y Timina (rojo); observada en *B. tigrinum* (BT), *B. vaillantii* (BV), *B. rousseauxii* (BR), *B. filamentosum* (BF) y *P. punctifer* (PP).

#### 5.4.2 Polimorfismo de ADN

Los resultados obtenidos en el análisis de polimorfismo de la región control del ADNmt para las cinco especies en estudio (tab. 05 y fig. 14) muestran que *B. tigrinum* presento los menores parámetros genéticos ( $H = 8$ ,  $Hd = 0.527$ ,  $\pi = 0.00175$ ,  $Eta = 10$ ) con respecto a las otras especies de bagres en estudio. En tanto que *B. vaillantii* fue la especie que presento valores mayores de polimorfismo en esta región ( $H = 27$ ,  $Hd = 0.991$ ,  $\pi = 0.01646$ ,  $Eta = 74$ ).

Tabla 04. Parámetros genéticos para la región control del ADN mitocondrial de *B. tigrinum*, *B. vaillantii*, *B. rousseauxii*, *B. filamentosum* y *P. punctifer*.

Parámetros Genéticos	<i>B. tigrinum</i>	<i>B. vaillantii</i>	<i>B. rousseauxii</i>	<i>B. filamentosum</i>	<i>P. punctifer</i>
N° de secuencias (N)	41	30	30	30	30
N° de haplotipos (H)	8	27	26	20	20
N° de haplotipos únicos (Hu)	4	25	24	14	17
Diversidad haplotípica (Hd)	0.527 ± 0.091	0.991 ± 0.012	0.986 ± 0.014	0.966 ± 0.018	0.945 ± 0.028
Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )	0.00175 ± 0.00036	0.01646 ± 0.00140	0.00764 ± 0.00058	0.01057 ± 0.00054	0.00586 ± 0.00072
N° total de sitios	931	875	850	850	852
N° de sitios polimórficos (S)	10	73	33	42	27
N° total de mutaciones (Eta)	10	74	33	42	27
Media de las diferencias nucleotídicas entre pares de individuos (K)	1.632	14.400	6.497	8.982	4.989
Transiciones (Ts)	7	70	33	39	25
Transversiones (Tv)	3	4	0	3	2
<i>Indels</i>	0	9	0	2	2

**Abreviaciones:** **N** = número de secuencias (individuos por cada especie); **H** = número de haplotipos; **Hu** = número de haplotipos únicos; **Hd** = diversidad haplotípica;  $\pi$  = diversidad nucleotídica; **Eta** = número total de mutaciones; **K** = media de las diferencias nucleotídicas entre pares de individuos; **S** = número de sitios polimórficos; **Ts** = número de transiciones; **Tv** = número de transversiones; **Indels** = inserciones y deleciones.

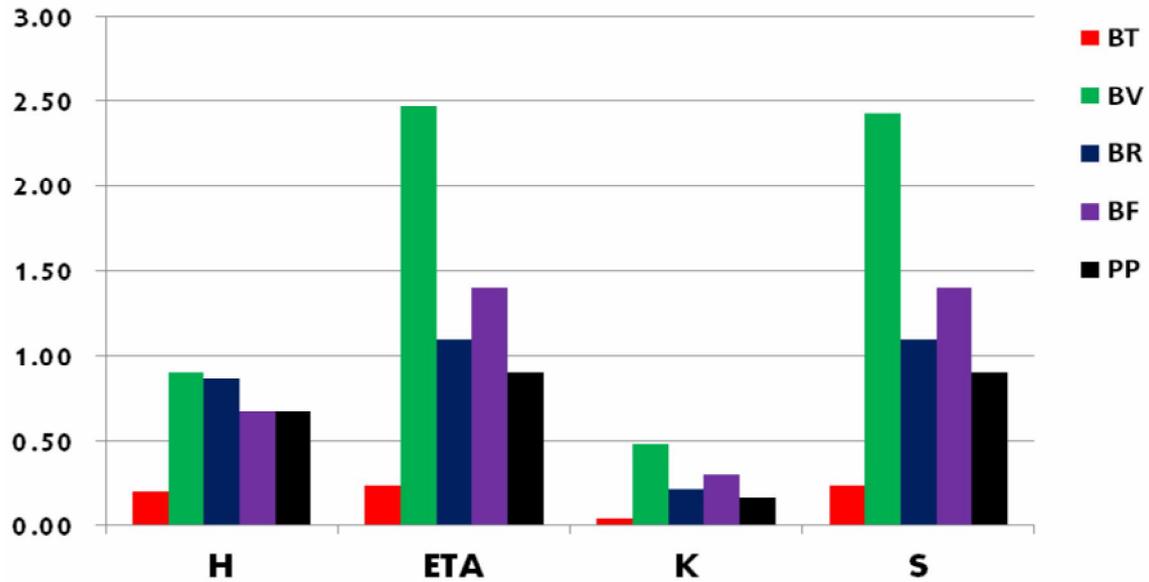


Fig. 06. Histograma representativo de la variabilidad genética observada en las especies *B. tigrinum* (BT - rojo), *B. vaillantii* (BV - verde), *B. rousseauxii* (BR - azul), *B. filamentosum* (BF - violeta) y *P. punctifer* (PP - negro). Mostrando las frecuencias relativas de los parámetros: H, número de haplotipos ETA, número total de mutaciones; K, media de la variabilidad nucleotídica par a par y S, número de sitios polimórficos.

#### 5.4.3 Proporción de haplotipos

Fueron encontrados 101 haplotipos entre los 161 individuos analizados de las cinco especies en estudio, ningún haplotipo fue compartido entre ellas. *B. tigrinum* presentó solo ocho haplotipos en los 41 especímenes analizados, de los cuales el haplotipo I (BtHap01) fue el que presentó el mayor número de individuos (28). *B. vaillantii*, presentó el mayor número de haplotipos (27) con el mayor número de haplotipos únicos (25) entre los 30 especímenes analizados. La red de haplotipos muestra con mayor claridad el número de haplotipos y sus proporciones en las diferentes especies (fig. 15)

Tabla 05. Proporción de haplotipos de acuerdo al número de individuos en *B. tigrinum*, *B. rousseauxii*, *B. vaillantii* y *P. punctifer*

Especie	Haplotipos	H	Especímenes
<i>B. tigrinum</i>	BtHap01 (I)	28	Bt65 Bt03 Bt05 Bt06 Bt07 Bt09 Bt10 Bt12 Bt13 Bt14 Bt16 Bt18 Bt19 Bt21 Bt23 Bt24 Bt25 Bt33 Bt36 Bt55 Bt56 Bt57 Bt59 Bt60 Bt61 Bt62 Bt63 Bt64
	BtHap02 (II)	4	Bt01 Bt08 Bt17 Bt28
	BtHap03 (III)	3	Bt11 Bt29 Bt34
	BtHap04 (IV)	1	Bt15
	BtHap05 (V)	2	Bt20 Bt22
	BtHap06 (VI)	1	Bt26
	BtHap07 (VII)	1	Bt35
	BtHap08 (VIII)	1	Bt58
<i>B. rousseauxii</i>	BrHap01 (I)	1	Br78
	BrHap02 (II)	1	Br22
	BrHap03 (III)	3	Br50 Br75 Do31H
	BrHap04 (IV)	1	Br34
	BrHap05 (V)	1	Br51
	BrHap06 (VI)	1	Br24
	BrHap07 (VII)	1	Br35
	BrHap08 (VIII)	1	Br39
	BrHap09 (IX)	1	Br44
	BrHap10 (X)	1	Br43
	BrHap11 (XI)	1	Br49
	BrHap12 (XII)	1	Br71
	BrHap13 (XIII)	3	Br52 Do27L Do28L
	BrHap14 (XIV)	1	Br64
	BrHap15 (XV)	1	Do32L
	BrHap16 (XVI)	1	Do41L
	BrHap17 (XVII)	1	Do20L
	BrHap18 (XVIII)	1	2966L
	BrHap19 (XIX)	1	Do23L
	BrHap20 (XX)	1	2970L
	BrHap21 (XXI)	1	Do29L
	BrHap22 (XXII)	1	Do30L
	BrHap23 (XXIII)	1	Do33L
	BrHap24 (XXIV)	1	Do36L
	BrHap25 (XXV)	1	Do38L
	BrHap26 (XXVI)	1	Do40L
<i>B. vaillantii</i>	BvHap01 (I)	2	Bv01 Bv20
	BvHap02 (II)	1	Bv02
	BvHap03 (III)	1	Bv03
	BvHap04 (IV)	1	Bv04
	BvHap05 (V)	1	Bv05
	BvHap06 (VI)	1	Bv06
	BvHap07 (VII)	1	Bv07
	BvHap08 (VIII)	1	Bv10
	BvHap09 (IX)	1	Bv08
	BvHap10 (X)	1	Bv09
	BvHap11 (XI)	1	Bv19
	BvHap12 (XII)	1	Bv30
	BvHap13 (XIII)	1	Bv17
	BvHap14 (XIV)	1	Bv23
	BvHap15 (XV)	1	Bv25
	BvHap16 (XVI)	1	Bv27
	BvHap17 (XVII)	1	Bv12
	BvHap18 (XVIII)	1	Bv14
	BvHap19 (XIX)	1	Bv29
	BvHap20 (XX)	1	Bv11

Tabla 05. (Continuación)

<b>Especie</b>	<b>Haplotipos</b>	<b>H</b>	<b>Especímenes</b>
<b><i>B. vaillantii</i></b>	BvHap21 (XXI)	1	Bv13
	BvHap22 (XXII)	3	Bv15 Bv18 Bv26
	BvHap23 (XXIII)	1	Bv16
	BvHap24 (XXIV)	1	Bv21
	BvHap25 (XXV)	1	Bv22
	BvHap26 (XXVI)	1	Bv24
	BvHap27 (XXVII)	1	Bv28
<b><i>B. filamentosum</i></b>	BfHap01 (I)	1	Bf11
	BfHap02 (II)	3	Bf13 Bf35 Bf39
	BfHap03 (III)	1	Bf14
	BfHap04 (IV)	1	Bf15
	BfHap05 (V)	1	Bf16
	BfHap06 (VI)	1	Bf19
	BfHap07 (VII)	4	Bf21 Bf22 Bf23 Bf24
	BfHap08 (VIII)	1	Bf27
	BfHap09 (IX)	1	Bf40
	BfHap10 (X)	1	Bf29
	BfHap11 (XI)	3	Bf17 Bf18 Bf20
	BfHap12 (XII)	1	Bf25
	BfHap13 (XIII)	2	Bf33 Bf34
	BfHap14 (XIV)	1	Bf32
	BfHap15 (XV)	1	Bf37
	BfHap16 (XVI)	1	Bf10
	BfHap17 (XVII)	2	Bf26 Bf30
	BfHap18 (XVIII)	1	Bf28
	BfHap19 (XIX)	1	Bf31
	BfHap20 (XX)	2	Bf36 Bf38
<b><i>P. punctifer</i></b>	PpHap01 (I)	6	Pp20 Pp21 Pp17 Pp26 Pp28 Pp29
	PpHap02 (II)	1	Pp07
	PpHap03 (III)	1	Pp08
	PpHap04 (IV)	1	Pp05
	PpHap05 (V)	1	Pp02
	PpHap06 (VI)	3	Pp10 Pp09 Pp03
	PpHap07 (VII)	1	Pp18
	PpHap08 (VIII)	1	Pp04
	PpHap09 (IX)	1	Pp23
	PpHap10 (X)	1	Pp15
	PpHap11 (XI)	1	Pp24
	PpHap12 (XII)	1	Pp25
	PpHap13 (XIII)	1	Pp27
	PpHap14 (XIV)	1	Pp31
	PpHap15 (XV)	1	Pp30
	PpHap16 (XVI)	4	Pp13 Pp01 Pp11 Pp12
	PpHap17 (XVII)	1	Pp16
	PpHap18 (XVIII)	1	Pp06
	PpHap19 (XIX)	1	Pp22
	PpHap20 (XX)	1	Pp19

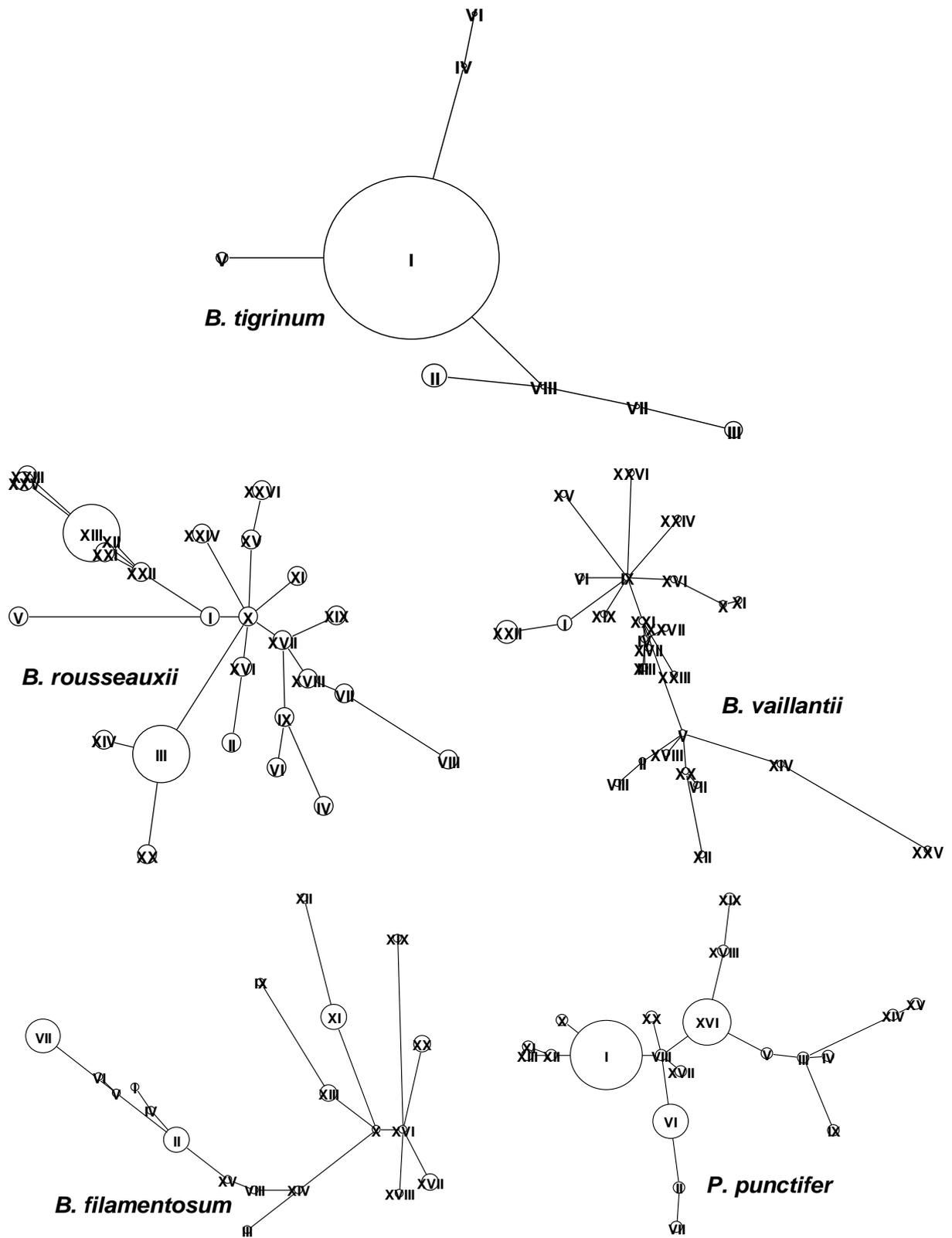


Fig. 07. Red de haplotipos donde el tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos por cada haplotipo, construido para *B. tigrinum* (A), *B. rousseauxii* (B), *B. vaillantii* (C), *B. filamentosum* (D) y *P. punctifer* (E).

#### 5.4.4 Divergencia genética intra e interespecíficas

Los valores de la divergencia genética (estimado con el modelo de evolución TN93 +  $\Gamma$ ) fueron calculados dentro y entre las cinco especies (Tabla 05). Los valores de divergencia genética dentro de las especies varió entre 0.0013 ( $\pm$  0.0005) en *Brachyplatystoma tigrinum* y 0.0142 ( $\pm$  0.0022) en *B. vaillantii*. La divergencia genética entre las especies vario de 0.0794 ( $\pm$  0.0101) entre *B. rousseauxii* y *B. filamentosum*, hasta 0.2154 ( $\pm$  0.0194) entre *B. tigrinum* y *P. punctifer* (tab. 06).

Tabla 06. Divergencia genética par a par intra e interespecífica estimado con el modelo de evolución TN93 +  $\Gamma$ .

	BT	BR	BV	BF	PP
BT	<b>0.0013 <math>\pm</math> 0.0005</b>				
BR	0.1949 $\pm$ 0.0168	<b>0.0075 <math>\pm</math> 0.0017</b>			
BV	0.1749 $\pm$ 0.0160	0.1207 $\pm$ 0.0124	<b>0.0142 <math>\pm</math> 0.0022</b>		
BF	0.1956 $\pm$ 0.0175	0.0794 $\pm$ 0.0101	0.1257 $\pm$ 0.0122	<b>0.0106 <math>\pm</math> 0.0020</b>	
PP	0.2154 $\pm$ 0.0194	0.1312 $\pm$ 0.0128	0.1680 $\pm$ 0.0154	0.1412 $\pm$ 0.0141	<b>0.0053 <math>\pm</math> 0.0014</b>

Abreviaciones: BT= *B. tigrinum*, BR= *B. rousseauxii*, BV= *B. vaillantii*, BF= *B. filamentosum* y PP= *P. punctifer*. Los valores en negrita representan la divergencia genética dentro de cada especie, Los valores en la región inferior representan la divergencia genética entre las especies y su desviación estándar.

#### 5.5 Relación filogenética

El árbol filogenético (Fig. 08) se construyó bajo el criterio de máxima verosimilitud (MV), a partir del modelo de evolución nucleotídica TN93 +  $\Gamma$  (Tamura & Nei, 1993), con los siguientes parámetros: Parámetro gamma = 0.218; Log-likelihood = -4413.16683 y frecuencias de las bases nucleotídicas A = 0.32512, C = 0.21540, G = 0.13614, T = 0.32335. En la topología del árbol filogenético muestra la formación de dos grupos dentro de las especies del género *Brachyplatystoma*. El primero conformado por *B. rousseauxii* está y *B. filamentosum* (bootstrap de 94) que estan muy cercanamente relacionados. El segundo, por *B. tigrinum* y *B. vaillantii* (bootstrap de 87). En tanto que *P. punctifer* se presenta como grupo cercano a este genero.



## VI. DISCUSIÓN

### 6.1 Variabilidad genética

#### 6.1.1 Composición nucleotídica

La especie *B. tigrinum* es uno de los bagres de mayor importancia económica como pez ornamental, que genera grandes beneficios para el ámbito local debido al interés nacional e internacional (Moreau & Coomes; 2007). Lo que estaría llevando a realizar la pesca en grandes cantidades de esta especie, y debido a que esta venta es en tamaños menores, la especie no estaría contribuyendo a la perpetuación por medio de la reproducción. Por eso, se generó los primeros resultados sobre la situación actual en el medio natural desde el punto de vista genético para esta especie. La obtención de información genética generada por los marcadores moleculares, complementa e fortalece las investigaciones con respecto a los stocks pesqueros, ya que los marcadores moleculares son utilizados para responder cuestiones ecológicas, inferir en la historia evolutiva y caracterizar genéticamente estos stocks, información importante en la genética de la conservación.

La composición nucleotídica de la región control del ADNmt para *B. tigrinum*, *B. vaillantii*, *B. filamentosum*, *B. rousseauxii* y *P. punctifer* fue con mayor cantidad para los pares de bases adenina y timina (A=33.92% T=32.33%; A=31.93% T=32.44%; A=31.92% T=32.74%; A=33.06% T=31.00%; A=31.05% T=33.16%, respectivamente) y menor cantidad para citosina y guanina (Fig. 13). Estos valores mayores de A/T (adenina/timina), parece ser una tendencia observada en peces. Resultados similares fueron obtenidos por Huergo (2009) y Rodríguez (2009) al estudiar especies del género *Brachyplatystoma* en la Amazonia brasilera, este resultado también fue obtenido para otras órdenes de peces como Characiformes, Perciformes y Acipenseriformes (Brown *et al*, 1993; Faber & Stepien, 1997; Renno *et al*, 2006; Schneider, 2007; Chiang *et al*, 2008). Esta tendencia concuerda con Meyer (1993), donde explica que la región control es altamente variable y es común encontrar zonas con elevada frecuencia de A/T, porque estas son menos estables que las zonas con C/G (citosina/guanina), además los animales pecilotérmicos presentan menor cantidad de guanina y citosina comparando con animales endotérmicos.

### 6.1.2 Polimorfismo de ADN

La variabilidad genética es un componente fundamental para la sobrevivencia y adaptación, la pérdida de esta variabilidad reduce el potencial evolutivo y el suceso reproductivo de una especie (Frankham *et al*, 2008). Como *B. tigrinum* es un pez capturado en tamaños menores a la talla de primera maduración, es de extrema importancia el conocimiento de su variabilidad genética y la conservación de su stock. Conforme a lo mostrado en la figura 14, donde se presenta un histograma comparativo de la variabilidad genética con las frecuencias relativas de los parámetros genéticos de las cinco especies en estudio. Se puede notar, que *B. tigrinum* presenta menor variabilidad genética comparada con las otras cuatro especies de pimelodidos que presentan alta variabilidad genética. Esto se puede inferir en función de presentar las menores estimaciones para los siguientes parámetros (Tabla 03): número de haplotipos ( $H= 8$ ), número de sitios polimórficos ( $S= 10$ ), número de mutaciones ( $ETA= 10$ ), la media de las diferencias nucleotídicas par a par ( $K= 1.632$ ), transiciones ( $Ts= 7$ ), diversidad haplotípica ( $Hd= 0.527 \pm 0.091$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi= 0.00175 \pm 0.00036$ ), demostrando que *B. tigrinum*, posee menor número de sustituciones en la región control del ADNmt. Esta tasa de sustitución nucleotídica en secuencias del ADN, está en función a la tasa de mutación y su probabilidad de fijación. Además la tasa de mutación en la región control del ADNmt entre especies, está relacionado a eventos de transición (McMillan & Palumbi, 1997), daños oxidativos de la cadena respiratoria y la falta de un mecanismo de reparación durante la replicación (Gray, 1989).

Hasta el momento no existen datos sobre estudios genéticos realizados en *B. tigrinum*, por ello los datos del presente trabajo son de gran importancia. Los parámetros genéticos aquí obtenidos, teniendo en cuenta los valores de diversidad haplotípica ( $Hd$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), también fueron verificados en trabajos realizados en otras especies de *Brachyplatystoma*. Huergo (2009) estudiando la diversidad genética de dos especies de grandes bagres, mediante secuencias de la región control del ADNmt, demostró que *B. filamentosum* y *B. capapretum* poseen altos valores de diversidad haplotípica ( $Hd= 0.9871$  y  $0.9509$ , respectivamente), pero el valor de diversidad nucleotídica

para *B. filamentosum* (0.0118) fue mayor que para *B. capapretum* (0.0041), esta diferencia sugiere que la intensa pesca practicada sobre *B. capapretum* pudo haber disminuido la diversidad nucleotídica, siendo necesario la adopción de urgentes medidas de manejo pesquero. En otro estudio, utilizando la región control del ADNmt para estimar la variabilidad genética de *B. vaillantii*, en cuatro localidades de la Amazonia brasilera, se obtuvo alta diversidad haplotípica ( $Hd$ ) (mayor del 99%) y baja diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), donde sugiere que esta especie pasó por un crecimiento poblacional reciente, por lo cual tienden a acumular nuevas mutaciones (Rodríguez, 2009). Para *B. rousseauxii*, Batista & Alves-Gomes (2006) estudiaron su filogeografía en tres localidades de la cuenca amazónica brasilera, obtuvieron altos valores de diversidad genética para Belem ( $Hd= 1.000$  y  $\pi= 0.0095$ ) y bajos para Tabatinga ( $Hd= 0.886$  y  $\pi= 0.0064$ ), siendo una posible explicación la tasa de captura muy elevada en Tabatinga lo que provoca una disminución de la diversidad genética. Coronel *et al.* (2004) comparó poblaciones de dos especies de bagres en la Amazonía boliviana con la técnica de RFLP para el ADNmt, encontrando que la población de *B. flavicans* en el río Ichilo presenta menor variabilidad genética ( $Hd= 0.551$  y  $\pi= 0.034$ ) que la población del río Beni ( $Hd= 0.667$  y  $\pi= 0.092$ ), este mismo padrón lo obtuvo para *P. fasciatum* en los mismos ríos (Ichilo,  $Hd= 0.054$  y  $\pi= 0.001$ ; Beni,  $Hd= 0.562$  y  $\pi= 0.023$ ), sugiere que las poblaciones de ambas especies en el río Ichilo, pudieron haber sufrido un efecto de cuello de botella debido a la intensa actividad pesquera. Estos resultados y los parámetros obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con la alta diversidad haplotípica para *B. filamentosum*, *B. vaillantii*, *B. rousseauxii* y *P. punctifer*, mientras que los valores de diversidad nucleotídica obtenidas en los trabajos ya mencionados son bajos, no concordando para *B. vaillantii*, *B. rousseauxii* y *P. punctifer*, sólo con el alto valor para *B. filamentosum* (Huergo, 2009). Los altos valores de diversidad haplotípica y nucleotídica, obtenidas para las especies de bagres a excepción de *B. tigrinum*, sugiere que por lo menos los individuos muestreados reflejan que sus poblaciones están estables con un gran tamaño poblacional.

Esto se puede contrastar al considerar la variabilidad genética de otras especies de peces de agua dulce, tales como *Colossoma macropomum* (Santos *et al.*, 2007), *Carnegiella strigata* (Schneider, 2007), *Cichla monoculus* (Renno *et al.*, 2006) y *Astyanax altiparanae* (Prioli *et al.*, 2002), que obtuvieron altos valores

de diversidad haplotípica y nucleotídica utilizando el ADNmt, sugiriendo para estas especies que poseen un gran tamaño efectivo poblacional, ampliamente distribuidas y estables, con un alto índice de flujo de genes, que serán capaces de responder a los cambios en el ambiente. Esta interpretación también es considerada al comparar con especies de peces marinos como *Siganus spinus* y *S. guttatus* (Iwamoto *et al.*, 2009), *Lutjanus peru* (Rocha & Sandoval, 2003) y especies del género *Sebastes* (Higuchi & Kato, 2002), incluso en el salmon (Weiss *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2000) que presentaron valores altos de diversidad haplotípica y nucleotídica.

En el caso de especies que presentaron alta o moderada diversidad haplotípica, pero baja diversidad nucleotídica como *Pseudoplatystoma corruscans* y *P. reticulatum* (Bignotto *et al.*, 2009), *Acipenser transmontanus* (Brown *et al.*, 1993) y peces marinos como *Scomber scombrus* y *Scomber japonicus* (Zardoya *et al.*, 2004), o que ambos valores de diversidad fueron bajos, como fue reportado para peces marinos: *Larimichthys crocea* (Cui *et al.*, 2009), *Cynoscion acoupa* (Rodrigues *et al.*, 2008), *Fistularia commersonii* (Golani *et al.*, 2007), *Cyprinus carpio* (Kohlmann *et al.*, 2003), especies de arrecifes de coral (Fauvelot *et al.*, 2003) y *Morone saxatilis* (Waldman *et al.*, 1998). Se sugirió para estas especies que poseen bajo tamaño poblacional y están o atravesaron un efecto de cuello de botella. Este podría ser el caso en *B. tigrinum*, que presento baja variabilidad genética.

De acuerdo a la interpretación propuesta por Grant & Bowen (1998), para la relación entre los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica del ADN mitocondrial en teleósteos marinos, propone cuatro categorías que permite clasificar así a *B. vaillantii*, *B. rousseauxii*, *B. filamentosum* y *P. punctifer* por poseer una alta diversidad haplotípica y nucleotídica, como especies que poseen un gran tamaño poblacional estable con una larga historia evolutiva, concordando con lo sugerido para otras especies peces de agua dulce y marinas. Mientras que la interpretación sugerida para el caso de *B. tigrinum*, por poseer un moderado y/o bajo valor de diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, es una especie que sufre o ha pasado por un reciente efecto de cuello de botella, seguido por un crecimiento poblacional rápido.

Este efecto de cuello de botella, es notorio en especies de baja diversidad genética, como en el caso de *B. tigrinum* y puede llevar a la pérdida de la variabilidad genética (Bernatchez, *et al.*, 1989) y pone en peligro la adaptabilidad de la especie frente a los cambios y adversidades del medio ambiente. La pérdida o baja diversidad genética en especies del medio natural puede ser por muchos factores, algunos de ellos como la endogamia, la degradación del hábitat y la sobrepesca puede ser un factor que a largo plazo contribuya a esta pérdida. Así fue sugerido por Coronel, *et al.* (2003) y Batista & Alves-Gomez (2006), y de manera concluyente por Gomez-Uchida & Banks (2006). También podríamos hablar de un efecto fundador (Renno *et al.*, 2006) de *B. tigrinum* en nuestra Amazonia. Ya sea el efecto de cuello de botella o el efecto fundador por el que atravesase esta especie, ambos efectos llevan a una deriva génica.

### 6.1.3 Proporción de haplotipos

La cantidad de haplotipos que pueda presentar una especie, también refleja la variabilidad genética de esta. El número de haplotipos obtenido para cada especie en el presente estudio, concuerda con los datos de variabilidad genética. Esto se observa en *B. vaillantii*, *B. rousseauxii*, *B. filamentosum* y *P. punctifer* que presentan alta variabilidad genética y cuyos valores del número de haplotipos (H) son muy próximos al número de especímenes analizados (Tabla 03 y 04), esto se contrasta en la red de haplotipos para cada especie (Figs. 16, 17, 18 y 19), donde no se observa haplotipos dominantes o que presenten gran cantidad de especímenes analizados. En esta red de haplotipos, se comprueba que estas especies presentan una amplia diversificación y distribución poblacional, ya que un haplotipo da origen a otra red de haplotipos. Concordando con especies de alto valor de variabilidad genética, como al analizar 20 individuos de *Sebastes thompsoni* y 18 de *S. inermis*, se obtuvieron 20 y 15 haplotipos, respectivamente (Higuchi & Kato, 2002). O *C. macropomum*, que se analizaron 48 individuos, obteniéndose 47 haplotipos (Santos *et al.*, 2007).

La baja variabilidad genética en relación al número de haplotipos, se puede notar al analizar un gran número de individuos y obtener bajos valores de haplotipos. Así, en *B. tigrinum* (Tablas 03 y 04), cuya proporción de haplotipos (Fig. 15) muestra que un haplotipo dominante [BtHap01 (I)] contiene el mayor número de individuos, lo que indica que esta especie presenta un efecto de cuello

de botella (Golani *et al.*, 2007). Esta relación de baja variabilidad genética y obtención de un menor número de haplotipos, también se observó en *Fistularia commersonii*, al muestrear en el mar Mediterraneo 52 individuos, obteniéndose sólo dos haplotipos (Golani *et al.*, 2007). En el caso de *Cynoscion acoupa*, se analizaron 297 individuos y se obtuvo 83 haplotipos (Rodrigues *et al.*, 2008).

#### 6.1.4 Divergencia genética intra e interespecíficas

Se utilizó el modelo de evolución nucleotídica TN93 +  $\Gamma$  (Tamura & Nei, 1993). La aplicación de este modelo resultó con la media ( $\pm$  SD) estimada de las divergencias genéticas par a par entre la región control del ADNmt de las especies en estudio. Las divergencias par a par dentro de cada especie fueron (Tabla 05) mayores para *B. vaillantii*, *B. rousseauxii*, *B. filamentosum* y *P. punctifer*, demostrándose la alta variabilidad genética que existe en ellas. Mientras que *B. tigrinum* presenta baja divergencia par a par ( $0.0013 \pm 0.0005$ ), contrastando con su baja variabilidad genética.

La divergencia genética par a par entre las especies, muestra el grado de diferenciación que existe entre ellas. Se observa que *P. punctifer* presenta mayor divergencia genética frente a *B. filamentosum*, *B. rousseauxii*, *B. vaillantii* y *B. tigrinum* [0.1412 (ó 14.12%), 0.1312 (13.12%), 0.1680 (16.80%) y 0.2154 (21.54%), respectivamente], esto es correcto por pertenecer a otro género dentro de la misma familia taxonómica. Es notorio ver la estrecha relación que existe entre *B. filamentosum* y *B. rousseauxii* (divergencia genética de 7.97%), considerándolas grupos hermanos, dentro de las especies de *Brachyplatystoma* aquí analizadas. Pero al observar *B. tigrinum*, se puede notar que presenta divergencias genéticas mayores que *P. punctifer*, incluso la divergencia genética entre ellas es mucho mayor (21.54%) que con las otras especies de *Brachyplatystoma*. Sin embargo *B. tigrinum* está más relacionado con *B. vaillantii* (divergencia genética= 17.49%) (Fig. 14).

Torrico *et al.* (2009) Utilizó el mismo marcador molecular y el modelo de evolución nucleotídica, para estimar el valor de divergencia genética en seis especies del género *Pseudoplatystoma*, estos valores fueron menores a los encontrados en el presente trabajo, donde la mayor divergencia genética fue entre *P. tigrinum* y *P. magdaleniatum* [ $0.083 \pm 0.006$  (ó 8.3%)] y la menor entre *P.*

*reticulatum* y *P. punctifer* [ $0.014 \pm 0.001$  (ó 1.4%)]. En especies que presentan baja variabilidad genética, sufren un cuello de botella o un reciente crecimiento poblacional como sugerido para *B. tigrinum*, según Nei (1987b), pueden presentar temporalmente una aceleración y aumento de la divergencia genética. Esto se puede notar al observar la divergencia genética entre las especies que presentan un valor mayor al 15%, ya que al estar por encima de este valor, el análisis filogenético puede ser impreciso y la resolución filogenética es reducida por la homoplasia (Faber & Stepien, 1997; Moritz *et al.*, 1987).

## 6.2 Relación filogenética

La relación filogenética entre las cuatro especies del género *Brachyplatystoma*, utilizando como grupo externo a *P. punctifer* y la adición de dos especies más (*Phractocephalus hemiliopterus* y *Rhamdia* sp.) para enraizar y dar mayor resolución al árbol filogenético, se puede observar en el filograma (Fig. 15) que considera la longitud de las ramas. Esta relación filogenética concuerda con los datos obtenidos de divergencia genética entre especies. El filograma muestra que las cuatro especies del género *Brachyplatystoma* son monofiléticas. Concordando con Lundberg & Akama (2005), que propone la inclusión de la especie *Merodontotus tigrinum* (género monotípico) al género *Brachyplatystoma*. Se observa la formación de dos grupos, el primero conformado por *B. tigrinum* y *B. vaillantii* (soportado por un *bootstrap* de 94) y el segundo por *B. rousseauxii* y *B. filamentosum* (soportado por un *bootstrap* de 87). No hubo haplotipo alguno que fuera compartido entre las especies, cada especie fue monofilética.

El grupo formado por *B. rousseauxii* y *B. filamentosum*, a la que denominamos como especies hermanas por el valor obtenido de divergencia genética ( $0.0794 \pm 0.0101$ ), es totalmente concordante con Lundberg & Akama (2005), que sitúa a estas dos especies estrechamente relacionadas como parte del subgénero *Malacobagrus*, teniendo en cuenta que son datos taxonómicos basados en estudios morfológicos. La relación filogenética del grupo conformado por *B. vaillantii* y *B. tigrinum*, también concuerda con Lundberg & Akama (2005) por la proximidad que estas presentan, pero al considerar la longitud de la rama de *B. tigrinum*, lo cual refleja una mayor divergencia genética, incluso a la del grupo externo, se puede sugerir que esta especie no presenta mutaciones constantes en el tiempo. Al estudiar la relación filogenética en otros Siluriformes,

como el caso de los Callichthyidae (Shimabukuro *et al.*, 2004) mediante el criterio de Máxima Verosimilitud, se obtuvo altos valores de *bootstrap* que confirman la estrecha relación de todas las especies que conforman esta familia monofilética, con bajos valores de divergencia genética entre ellas, similar caso se observó en la familia Pangasiidae (Jondeung *et al.*, 2007). En cambio Renno *et al.* (2006), al estudiar *Cichla ocellaris* y poblaciones del alto Madera y el Ucayali de *C. monoculus*, obtuvo mayor divergencia genética entre las poblaciones de *C. monoculus* del alto Madera y Ucayali, que entre *C. monoculus* del Ucayali y *C. ocellaris*, siendo contrastado en el árbol filogenético, incluso la divergencia entre el grupo externo *C. temensis* y *C. monoculus* del alto madera fue menor que con los del Ucayali, considerando que *C. monoculus* del alto madera pueda ser una nueva especie. Al estudiar la relación filogenética de cinco especies marinas del género *Sebastes*, también se observa la formación de grupos y el máximo valor de divergencia fue del 18.79% entre *S. owstoni* y *S. joyneri*, siendo este valor menor a lo obtenido para *B. tigrinum* que supera el 19% en relación a las otras especies en estudio.

En las especies *B. rousseauxii* y *B. vaillantii*, no se observa estructuración genética por los bajos valores de *bootstrap*, es decir no se observa la formación de grupos entre los haplotipos analizados. Esto concuerda con Batista (2001) y Formiga (2004), que analizaron poblaciones de estas especies sin obtener estructuración genética, esto se puede deber a que estas especies realizan grandes migraciones conocidas a lo largo de las cuencas en la Amazonía sudamericana. Mientras que *B. filamentosum* presenta una estructuración genética, tal como lo obtenido por Huergo (2009), que relacionó esta estructuración genética con el tipo de agua (clara, oscura y blanca) que habita esta especie, además que el padrón migratorio de esta especie es desconocido. Con respecto a *B. tigrinum*, se ve el poco número de haplotipos, además no presenta estructuración genética y las longitudes de sus ramas son muy cortas, lo cual está relacionado a la baja diversidad nucleotídica entre individuos, concordando con la baja variabilidad genética, además de no existir estudio alguno sobre su padrón migratorio.

## VII. CONCLUSIONES

Mediante los resultados obtenidos de la variabilidad genética y relación filogenética de *B. tigrinum* con cuatro especies de grandes, podemos concluir:

- La región control o D-loop del ADN mitocondrial, es una herramienta útil para inferir en estudios de variabilidad genética y/o establecer una relación filogenética entre especies, como lo obtenido en especies de la familia Pimelodidae.
- La composición nucleotídica de la región control del ADNmt para *B. tigrinum*, *B. vaillantii*, *B. filamentosum*, *B. rousseauxii* y *P. punctifer* fue con mayor cantidad para las pares de bases adenina y timina, y menor cantidad para citosina y guanina. Similar a lo observado en otras especies de peces.
- *B. tigrinum* presentó menor variabilidad genética. Siendo posible que esta especie sufre o ha pasado por un reciente efecto de cuello de botella, seguido por un crecimiento poblacional rápido o presente un efecto fundador. Esta baja variabilidad genética puede llevar a una deriva génica.
- *B. vaillantii*, *B. rousseauxii*, *B. filamentosum* y *P. punctifer* poseen alta diversidad haplotípica y nucleotídica, por lo que se sugiere que poseen un gran tamaño poblacional estable con una larga historia evolutiva.
- El análisis de divergencia genética reveló que *B. tigrinum* posee un alto valor de este parámetro con respecto a las otras especies de *Brachyplatystoma*, incluso mayor que el del grupo externo.
- *B. tigrinum*, forma un grupo monofilético con las otras especies de *Brachyplatystoma*, que confirma su inclusión en este género.
- Mediante el análisis filogenético *B. rousseauxii* y *B. filamentosum* son especies hermanas y *B. tigrinum* está más relacionado a *B. vaillantii*.
- *B. rousseauxii* y *B. vaillantii* no presentan estructuración genética, posiblemente a las grandes migraciones que estos realizan, mientras que *B. filamentosum* presenta estructuración genética quizás, por el tipo de agua o hábitat a la que esta especie este adaptada.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios poblacionales de *Brachyplatystoma tigrinum*, mediante el empleo de otras herramientas genéticas, como los microsatélites o genes mitocondriales.
- Los resultados de los parámetros genéticos obtenidos en el presente trabajo, pueden ser usados como un punto inicial por los decisores de política en lo que concierne a mayor control de la actividad extractivista y planes de manejo para *B. tigrinum*.
- Realizar monitoreos genéticos, ya que actividades como la pesca puede ser un factor que a largo plazo contribuya a la pérdida de la variabilidad genética en especies de gran demanda económica como *B. tigrinum*.
- Realizar un estudio filogenético con todas las especies de la familia Pimelodidae y con grupos próximos a estos, para definir la correcta relación de *B. tigrinum* con respecto a otras especies de *Brachyplatystoma*, mediante el empleo de otros marcadores como los genes mitocondriales.
- Realizar estudios de reproducción en ambientes controlados de *B. tigrinum*, como una medida que amortigüe la presión de pesca de esta especie del medio natural, y destinarlo para el repoblamiento natural y su venta como ornamental.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agudelo, E. Salinas, Y.; Sánchez, C.; Muñoz, D.; Alonso, J.; Arteaga, M.; Rodríguez, O.; Anzola, N.; Acosta, L.; Núñez, M.; Valdés, H. 2000. Bagres de la Amazonia Colombiana: Un Recurso sin Fronteras. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – SINCHI. Santafé de Bogotá, Colombia. 254pp.
2. Akaike, H., 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov, B. N., Csaki, F. (Eds). Proceedings of the Second International Symposium on Information Theory, Akadémia Kiado. *Budapest*. pp. 267 – 281
3. Alter, S. E. & Palumbi, S. R. 2009. Comparing evolutionary patterns and variability in the mitochondrial control region and cytochrome *b* in three species of baleen whales. *J. Molecular Evolution* 68: 97–111
4. Applied Biosystems 2003. Sequencing Analysis v5.3.1.
5. Aquadro, C. F.; Greenberg, B. D. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103: 287-312
6. Avise, J. C. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Second Edition. 541pp.
7. Barthem, R. B. & Fabre, N. N.; 2005. O Manejo da Pesca dos Grandes Bagres Migradores Piramutaba e Dourada no Eixo Solimões- Amazonas – PROVÁRZEA, Manaus – Brasil, 114pp.
8. Barthem, R. & Goulding, M. 1997. Os Bagres Balizadotes: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazonicos. Sociedade Civil Mamirauá/TCA/GEP/PNUD. Brasília. 140 pp.
9. Batista, J.S. 2001. Estimativa da variabilidade genética intra-específica da dourada – *Brachyplatystoma flavicans* Castelnau 1855 (Pimelodidae – Siluriformes) no Sistema Estuario – Amazonas – Solimões, Dissertação de mestrado, INPA – Manaus, Brasil. XVIII + 97pp.
10. Batista, J.S.; García, C.R.; Maranhão-Siqueira, T.; Castro, D.; Chota, W.; Formiga-Aquino, K.; Alves-Gomes, J.A.; 2005. Genética populacional da dourada – *Brachyplatystoma rousseauxii* (Pimelodidae – Siluriformes) na Amazônia Brasileira e Peruana. Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica. Iquitos – Perú. pp. 123 – 128.
11. Batista, J.S. & Alves-Gomes, J.A. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes – Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genet. Mol. Res.* 5 (4): 723-740
12. Batista, J. S.; Gomes, J. A.; e Farias, I. P. 2006. Caracterização genética da dourada – *Brachyplatystoma rousseauxii* - (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia utilizando marcadores moleculares mitocondriais; Encontro de Pós-Graduação do Amazonas / Mostra de Pós-Graduação da Fapeam: Resumos da. I Mostra de Pós-Graduação da FAPEAM, 1, ISBN: Português, Meio digital.
13. Bernatchez, L.; Dodson, J. J. and Boivin, S. 1989. Population bottlenecks: influence on mitochondrial DNA diversity and its effect in coregonine stock discrimination. *J. Fish Biol.* 35: 233–244

14. Bernatchez, L.; Guyomard, R. and Bonhomme, F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmon trutta* populations. *Molecular Ecology* 1: 161–173
15. Bielawski, J. P. & Gold; J. R. 2002. Mutation Patterns of Mitochondrial H- and L-Strand DNA in Closely Related Cyprinid Fishes. *Genetics Vol. 161: 1589–1597*
16. Bignotto, T. S.; Prioli, A. J.; Prioli, S. M. A. P.; Maniglia, T. C.; Boni, T. A.; Lucio, L. C.; Gomes, V. N.; Prioli, R. A.; Oliveira, A. V.; Júlio-Junior, H. F. and Prioli, L. M. 2009. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. *Braz. J. Biol.* 69: 681 – 689
17. Brown, H. K. 2008. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. *Journal of Fish Biology* (2008) 72, 355–374
18. Brown, J. R.; Beckenbach, A. T. and Smith, M. J. 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Mol. Biol. Evol.* 10(2): 326 – 341
19. Cann, R. L.; Brown, W. M. and Wilson, A. C. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 106: 479–499
20. Chiang, H; Hsu, C. C; Wu, G. C. C; Chang, S. K; Yang, H. Y. 2008. Population structure of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean inferred from mitochondrial DNA. *Fisheries Research* 90: 305–312
21. Coronel, J. S.; Maes, G. E.; Claus, S.; Van Damme, P. A. and Volckaert, A. M. 2004. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *Journal of Fish Biology* 65: 859–868
22. Cui, Z.; Liu, Y.; Li, C. P.; You, F. and Chu, K. H. 2009. The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): Unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. *Gene* 432: 33 – 43
23. Doyle, J. J.; Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19:11-15
24. Dyll, S. D.; Brown, M. T.; Johnson, P. J. 2004. Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. *Science Vol. 304: 253-257*
25. Faber, J. E. & Stepien, C. A. 1997. The utility of mitochondrial DNA control region sequence for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae. In: Kocher, T. D.; Stepien, C. A. (Eds). *Molecular Systematics of Fishes*, San Diego, CA: Academic Press, pp. 129 – 143
26. Fauvelot, C.; Bernardi, G. and Planes, S. 2003. Reductions in the mitochondrial DNA diversity of coral reef fish provide evidence of population bottlenecks resulting from Holocene sea-level change. *Evolution*, 57(7): pp, 1571-1583
27. Felsenstein, J. F. 1981. Evolutionary tree from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368 – 376
28. Felsenstein, J. F. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783 – 791

29. Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Sys. Zool.* 20: 406 – 416
30. Frankham, R.; Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética. 280pp.
31. Formiga, K. 2004. Variabilidade genética da piramutaba *Brachyplatystoma vaillantii* (Siluriformes: Pimelodidae) no Sistema Estuário-Amazonas-Solimões. INPA/UFAM – Manaus, Brasil. XVIII + 76pp.
32. Galvis, G.; Mojica, J. I.; Duque, S.; Castellanos, C.; Sánchez, P.; Arce, M.; Gutiérrez, A.; Jiménez, L.; Santos M.; Vejarano, S.; Arbeláez, F.; Prieto, E.; Leiva, M. 2006. Peces del medio Amazonas, Región de Leticia – Conservación Internacional, Colombia. 546 pp.
33. García, C.; Castro, D.; Chota, W.; Alves, J.; Batista, J.; Morão, T. 2004. Variabilidad genética interpoblacional de *Brachyplatystoma flavicans* “dorado” en la Amazonía peruana - Proyecto de Cooperación Técnica IIAP/Brasil.
34. Golani, D.; Azzurro, E.; Corsini-Foka, M.; Falautano, M.; Andaloro, F. and Bernardi, G. 2007. Genetic bottlenecks and successful biological invasions: the case of a recent Lessepsian migrant. *Biol. Lett.* 3: 541 – 545
35. Gomez-Uchida, D. & Banks, M. A. 2006. Estimation of effective population size for the long-lived darkblotched rockfish *Sebastes crameri*. *J. Hered* 97: 603 – 606
36. Gran, W. S. & Bowen, B. W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The American Genetic Association* 89: 415–426
37. Gray, M. W.; Burger, G.; Lang B. F. 1999. Mitochondrial Evolution. *Science* 283: 1476-1481
38. Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52(5):696–704
39. Hall, T. A. 1999. BIOEDIT a user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Department of Microbiology North Carolina State University. *Nucl. Acids. Symp – Ser.* 41: 95 – 98
40. Higuchi, M. & Kato, K. 2002. Sequence variability in the mitochondrial DNA control region of five *Sebastes* species. *Fisheries Science*, 68:643–650
41. Hubert, N.; Duponchelle, F.; Nuñez, J.; Garcia-Dávila, C. R.; Paugy, D. and Renno, J. F. 2007. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* 16: 2115–2136
42. Hubert, N.; Torrico, J. P.; Bonhomme, F. and Renno, J. F. 2007. Species polyphyly and mtDNA introgression among three *Serrasalmus* sister-species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 375 – 381
43. Huergo, G. P. C. M. 2009. Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*, Lichtenstein 1819) e da piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*, Lundberg e Akama 2005), na Amazônia Brasileira, inferidas através do DNA mitocondrial: Subsídios para Manejo e Conservação. Tese (doutorado) – INPA.

44. Hrbek, T. & Farias, I. 2008. The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). Sociedade Brasileira de Genética. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1 (suppl), 293-302
45. Iwamoto, K.; Takemura, A.; Yoshino, T. and Imai, H. 2009. Molecular ecological study of *Siganus spinus* and *S. guttatus* from Okinawan waters based on mitochondrial DNA control region sequences. *Journal of Oceanography* 65: 103 – 112
46. Jondeung, A.; Sangthong, P. and Zardoya, R. 2007. The complete mitochondrial DNA sequence of the Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*), and the phylogenetic relationships among Siluriformes. *Gene* 387: 49–57
47. Kohlmann, K.; Gross, R.; Murakaeva, A. and Kersten, P. 2003. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquat. Living Resour* 16: 421 – 431
48. Lee, W. J.; Conroy, J.; Howell, W. H.; Kocher, T. D. 1995. Structure and Evolution of Teleost Mitochondrial Control Regions. *J. Mol. Evol.* 41: 54 - 66
49. Liu, Z. J. & Cordes, J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238 (2004) 1 –37.
50. Lundberg, J. & Akama, A. 2005. *Brachyplatystoma capapretum*: a New Species of Goliath Catfish from the Amazon Basin, with a Reclassification of Allied Catfishes (Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia*, 2005 (3), pp. 492 – 516
51. Martínez, J. C. 2002. El uso del ADN mitocondrial para descubrir las migraciones precolombinas al Caribe: Resultados para Puerto Rico y expectativas para la República Dominicana. *Journal of Caribbean Amerindian History and Anthropology* ISSN 1562-5028.
52. Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. Hochachka and Mommsen (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 2.
53. Ministerio de la Producción, 2009. Reglamento de Ordenamiento Pesquero de la Amazonía Peruana – DS N° 115-2009-PRODUCE.
54. Moncada, T. & Ríos, J. 2002. Análisis Socioeconómico de la Pesquería de Grandes Bagres en Iquitos – Perú. Tesis de Pre - Grado. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana – Facultad de Ciencias Biológicas.
55. Montreuil, V. 2000. Situación regional del manejo de las pesquerías de los grandes bagres migratorios amazónicos, Informe técnico. Iquitos – Perú. 14 pp.
56. Moreau, M. & Coomes, O. 2007. Aquarium fish exploitation in western Amazonia: conservation issues in Peru. *Environmental Conservation* 34 (1): 12–22 © 2007
57. Moritz, C.; Dowling, T. E. and Brown, W. M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematic. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269 – 292
58. Nei, M. 1987a. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA. 512pp.
59. Nei, M. 1987b. Genetic Distance and Molecular Phylogeny. In: *Population Genetics & Fishery Management*. Eds. Ryman, N.; Utter, F. University of Washington Press, Seattle. 193 – 223
60. Nei, M. 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu. Rev. Genet.* 30: 371 – 403

61. Nelson, J. 1994. Fishes of the World. 3rd Edition. Printed of USA. 600pp.
62. Ortiz, N. & Iannacone, J. 2008. Estado Actual de los Peces Ornamentales Amazónicos del Perú que Presentan Mayor Demanda de Exportación. *Biologist (Lima)*. Vol. 6, Nº1, ene-jun 2008, 54-67
63. Paradis, E.; Claude, J. and Strimmer, K., 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289 – 290
64. Paradis, E., 2006. Analysis of phylogenetics and evolution with R. Springer, New York.
65. Parker, P. G.; Snow, A. A.; Schug, M. D.; Booton, G. C. and Fuerst, P. A. 1998. What Molecules Can Tell Us About Populations: Choosing And Using A Molecular Marker. *Ecology*, 79(2) pp. 361-382
66. Picca, A.; Helguera, M.; Salomón, N.; Carrera, A. 2004. Marcadores Moleculares. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. pp. 61 – 68
67. Posada, D.; Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9):817-818
68. Prang, G. 2007. An industry analysis of the freshwater ornamental fishery with particular reference to the supply of Brazilian freshwater ornamentals to the uk market. *UAKARI*, vol. 3 (1): 7 – 51
69. Prioli, S. M. A. P.; Prioli, A. J.; Júlio, H. F.; Pavanelli, C. S.; Oliveira, A. V.; Carrer, H.; Carraro, D. M. and Prioli, L. M. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25, 4: 421 – 430
70. Quintero, L. G. 2003. Especies ícticas amazónicas promisorias para la acuicultura nacional. Informe técnico, FMVZ – UN, Colombia.
71. Ralph, C. 2006. Página Web: [http://www.scotcat.com/factsheets/brachyplatystoma\\_tigrinum.htm](http://www.scotcat.com/factsheets/brachyplatystoma_tigrinum.htm) (Accesado el 04-03-2010)
72. Randi, E.; Lucchini, V.; Hennache, A.; Kimball, R. T.; Braun, E. L. and Ligon, J. D. 2001. Evolution of the mitochondrial DNA control region and cytochrome *b* genes and the inference of Phylogenetic relationships in the Avian genus *Lophura* (Galliformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 19. Nº 2. pp. 187-201
73. Renno, J-F; Hubert, N.; Torrico, J. P.; Duponchelle, F.; Nuñez, J.; Garcia, C.; Willis, S. C.; Desmarais, E. 2006. Phylogeography of Cichla (Cichlidae) in the upper Madera basin (Bolivian Amazon). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 503–510
74. Rocha, A. y Sandoval, J. R. 2003. Diversidad mitocondrial y estructura genética en poblaciones alopátricas del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. *Ciencias Marinas* 29 (2): 197 – 209
75. Rodrigues, R.; Schneider, H.; Santos, S.; Vallinoto, M.; Sain-Paul, U. and Sampaio, I. 2008. Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, Sciaenidae) from the Northern coast of Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 31(2): 487 – 492
76. Rodriguez, F. C. 2009. Estimativa da variabilidade da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop de quatro localidades da Amazônia diferenças entre calha e tributários. Dissertação (mestrado) – INPA/UFAM.

77. Rojas, M.; Olivera, R.; Quispe, R. y Ortega, H. 2007. Estudio preliminar de ictioplancton de la Amazonia peruana con énfasis en la familia Pimelodidae. *Rev. Perú Biol.* 13(3): 263 – 265
78. Rozas, J.; Rozas, R. 1999. DNASP versión 5.00: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics.* 15, p. 174 – 175
79. Salinas, Y. & Agudelo, E. 2000. Peces de Importancia Económica en la Cuenca Amazónica Colombiana. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – SINCHI. Santafé de Bogotá, Colombia. 142 pp.
80. Sanchez, H. R. 2000. Catálogos de Peces Comerciales de la Familias Prochilodontidae, Curimatidae y Pimelodidae. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – Programa de Ecosistemas Acuáticos.
81. Santos, G.; Ferreira, E.; Zuanon, J. 2006. Peixes Comerciais de Manaus. IBAMA/AM, PROVÁRZEA, 144 pp.
82. Santos, M. C. F.; Ruffino, M. L. and Farias, I. P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main canal of the Amazon River. *Journal of Fish Biology* 71: 33 – 44
83. Scheffler, I. E. 2008. Mitochondria, Second Edition, Universidad de California – San Diego. John Wiley & Sons. INC publication. 462pp
84. Schneider, C. H. 2007. Análise da variabilidade genética do peixe ornamental *Carnegiella strigata* (Characiformes, Gasteropelecidae) de três rios de agua preta da Amazônia Central. Dissertação (mestrado) – INPA/UFAM.
85. Schon, E. A. & DiMauro, S. 2007. Mitochondrial mutations: genotype to phenotype. *Mitochondrial biology: new perspectives. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 287) p: 214–233*
86. Shedlock, A. M.; Parker, J. D.; Crispin, D. A.; Pietsch, T. W. and Burmer, G. C. 1992. Evolution of the salmonid mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution, Vol. 1. N° 3, 179–192*
87. Shimabukuro-Dias, C. K.; Oliveira, C.; Reis, R. E. and Foresti, F. 2004. Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 152–163
88. Simon, C.; Buckley, T. R.; Frati, F.; Stewart, J. B. and Beckenbach, A. T. 2006. Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 545 – 579
89. Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA versión 4.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596 – 1599
90. Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 512 – 526
91. Tessier, N.; Bernatchez, L.; Presa, P. and Angers, B. 1995. Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 47: 156-163

92. Thompson, J. D.; Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673 - 4680
93. Torrico, J. P.; Hubert, N.; Desmarais, E.; Duponchelle, F.; Nuñez-Rodriguez, J.; Montoya-Burgos, J.; Garcia-Davila, C. R.; Carvajal-Vallejos, F. M.; Grajales, A. A.; Bonhomme, F. and Renno, J. F. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 588 – 594
94. Waldman, J. R. 1998. Multiple population bottlenecks and DNA diversity in populations of wild striped bass, *Morone saxatilis*. *Fishery Bulletin* 96: 614 – 620
95. Weiss, S.; Antunes, A.; Schlotterer and Alexandrino, P. 2000. Mitochondrial haplotype diversity among Portuguese brown trout *Salmon trutta* L. populations: relevance to the post-Pleistocene recolonization of northern Europe. *Molecular Ecology* 9: 691 – 698
96. Weiss, S.; Schlotterer, C.; Waidbacher, H. and Jungwirth, M. 2001. Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmon trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish – by man or nature? *Molecular Ecology* 10: 1241 – 1246
97. Zardoya, R.; Castilho, R.; Grande, C.; Favre-Krey, L.; Caetano, S.; Marcato, S.; Krey, G. and Patarnellos, T. 2004. Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 13: 1785 – 1798

# **ANEXOS**