

Genetic diversity of Bocachico  
(*Prochilodus reticulatus*) of the Cuenca Alta  
of Río Cauca (Colombia)

Diversidad Genética del Bocachico  
(*Prochilodus reticulatus*) de la Cuenca Alta  
del Río Cauca (Colombia)

JORGE NELSON LOPEZ MACIAS <sup>1</sup>,  
FELIPE GARCIA VALLEJO <sup>2</sup>,  
EFRAÍN RÚBIO RINCÓN <sup>3</sup>,  
ANDRÉS CASTILLO GIRALDO <sup>4</sup>  
& FLAVIO CERÓN <sup>5</sup>

La problemática ambiental del recurso hídrico en el valle geográfico del río Cauca, está asociada a la presencia de áreas degradadas, por el uso inadecuado del suelo, la contaminación hídrica por las descargas de basuras y aguas residuales industriales y domésticas provenientes de las poblaciones ribereñas. La explotación minera irracional y la extracción de arena grava y deteriora el hábitat de los peces, dificultando la alimentación de especies ícticas bentónicas y neotónicas, incrementando la turbidez, disminuyendo el oxígeno disuelto, afectando mecánicamente los procesos de respiración y visión de los peces e interfiriendo con los ciclos reproductivos. Igualmente, la pesca ilegal con dinamita y barbasco, los continuos procesos de deforestación generalizada, la ausencia de vegetación litoral, los insecticidas aplicados a los cultivos, en especial a los de caña de azúcar que llegan a las cuencas a través de los canales de

---

<sup>1</sup> Msc., Ph.D Profesor Titular, Facultad de Cienc. Pecuarias, Univ. de Nariño. [jorgelopezmacias@gmail.com]. <sup>2</sup> Ph.D. Profesor Titular, Fac. Cienc. Naturales, Univ. del Valle. [erubio@univalle.edu.com]. <sup>3</sup> Ph.D. Profesor Titular, Fac. Cienc. Salud, Univ. del Valle. [labiomol@gmail.com] y <sup>4,5</sup> Biólogos del Laboratorio de Biología Molecular, Fac. Cienc. Salud, Univ. del Valle. [labiomol@gmail.com]

riego y de lluvias, que han afectado la productividad de las pesquerías artesanales. Así mismo, la canalización de aguas para riego, ha reducido los caudales de varios ríos y quebradas del Valle del Cauca, especialmente durante el verano, afectando negativamente el hábitat de varias especies ícticas (UNIVERSIDAD DEL VALLE, 2001).

El Río Cauca recibe cargas contaminantes antes de ingresar al departamento del Valle del Cauca desde su nacimiento hasta el municipio de Timba (localizado en el límite interdepartamental Cauca — Valle del Cauca), de tal manera que el río recibió durante 1997, un promedio de 56 ton/día de materia orgánica en términos de Demanda Bioquímica de Oxígeno ( $DBO_5$ ). En el departamento del Valle del Cauca, la situación es más crítica puesto que en el mismo año, el río recibió una carga contaminante adicional de 279 ton/día de materia orgánica, 154.8 ton/día fueron vertidas por los municipios del Valle del Cauca ubicados en la cuenca hidrográfica del Río Cauca y el resto correspondió a contaminación industrial (CONPES, 1999). Los municipios que más contaminaron al río Cauca en el período mencionado fueron en su orden: Santiago de Cali con el 59.9% (92.8 ton/día), con 7.3% (11.3 ton/día) y Tulúa 4.7% (7.2 Ton/día). En los últimos años la contaminación aportada por los municipios se ha incrementado como consecuencia del crecimiento de la población y el inadecuado tratamiento de aguas residuales. La ciudad de Cali con una población estimada de 1.819.436 habitantes vierte al río Cauca aproximadamente 5.8 m<sup>3</sup>/seg de aguas servidas y alcantarillado pluvial (UNIVERSIDAD DEL VALLE, 2001).

La problemática es aún más crítica si se considera que el basurero a cielo abierto de Navarro, que fue el principal sitio de eliminación de residuos sólidos y orgánicos de la ciudad de Cali, hasta el 2008, se comunica indirectamente con el cauce del río Cauca, a través del canal CVC sur, contaminando las aguas del río por lixiviación y arrastre de diferentes materiales provenientes de este relleno sanitario.

El bocachico, es la especie reofílica de mayor importancia económica de los ríos de Colombia y representó durante el período 1977–1992, el 85% de la producción pesquera de agua dulce (VALDERRAMA *et al.*, 1993). Su ciclo de vida es de cuatro años, tiempo durante el cual, efectúa, dos grandes migraciones anuales, desde las ciénagas bajas, hasta los distintos tributarios localizados en las estribaciones de la cordillera de los Andes, donde emigra anualmente en los meses de Octubre a Noviembre con el fin de reproducirse, alcanzando la madurez sexual en el período de mayor nivel de las aguas. Los ejemplares retornan después al cauce principal de los ríos Cauca y Magdalena hasta llegar al lugar adecuado para desovar. ORTEGA *et al.* (1999) evaluaron la íctiofauna de la cuenca alta del río

Cauca y todos los tributarios existentes, en las márgenes derecha e izquierda, capturando el bocachico (*P. magdalenae*) en diferentes áreas del curso del río, reportando las mayores poblaciones en el tramo comprendido entre las estaciones Salvajina y Hormiguero y en el tributario Jamundí. Sin embargo, las especies ícticas más abundante en captura fueron en su orden el coroncoro (*Hypostomus plecostomus*), especie transplantada de Guyana y la tilapia (*Oreochromis niloticus*) especie introducida de África. Lo expuesto anteriormente plantea la delicada situación de vulnerabilidad del bocachico de la cuenca alta del río Cauca, especie distribuida en hábitats fragmentados debido a las barreras fisiográficas naturales y artificiales (represa de Salvajina) y a la gran contaminación de varios trayectos del río principalmente entre los municipios de Cali y Tulúa (LÓPEZ & RUBIO 2001).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, en la investigación realizada por LÓPEZ & RUBIO (2001), sobre los perfiles sanguíneos del bocachico de la cuenca alta del río Cauca y sus correlaciones fisicoquímicas y ambientales, durante un periodo de muestreo de cuatro años, detectó un alto porcentaje de patologías referentes a anemias microcíticas, policitemias, poiquilocitosis, anisocitosis, hipocromías, leucocitosis, eosinofilias, basofilias que indican el estado de vulnerabilidad de las poblaciones esta especie. Por esta razón, se decidió estudiar, mediante el marcador molecular AFLP, la estructura genética de las poblaciones de bocachico en tres estaciones de captura con el propósito de evaluar la variabilidad y tasas de migración, y de esta manera establecer el efecto de las barreras fisiográficas y contaminantes del río Cauca sobre el genoma de esta especie íctica.

### MARCO REFERENCIAL

Se entiende por polimorfismo, a la existencia de dos o más fenotipos del mismo carácter (determinado genéticamente) en una población, tales como variantes isozímicas, grupos sanguíneos, color, etc. Además de la selección natural existe una serie de agentes de tipo no selectivo que actúan sobre la variabilidad genética como la consanguinidad, la deriva genética y la migración que son agentes que afectan la estructura genética de las poblaciones de organismos acuáticos. La consanguinidad es una desviación de la panmixia, es decir, del apareamiento aleatorio. La consanguinidad, produce un incremento en la frecuencia de homocigotos a expensa de una reducción de la frecuencia de los heterocigotos. El efecto más característico de la consanguinidad se produce sobre los genes recesivos y en especial sobre los caracteres cuantitativos. Se denomina depresión por consanguinidad al efecto perjudicial de la consanguinidad sobre los

caracteres cuantitativos que consiste en una reducción de la media poblacional (FALCONER, 1989). Se ha descrito fenómenos de depresión por consanguinidad para diversos caracteres en la trucha arco iris (BRIDGES, 1973) y la carpa (MOAV *et al.*, 1975). Los caracteres que presentan depresión consanguínea con mayor frecuencia son la tasa de crecimiento y la viabilidad.

Las poblaciones pequeñas, experimentan cambios aleatorios en sus frecuencias génicas y fenómenos de reducción de su variabilidad genética y consanguinidad como consecuencia de la deriva genética. Lo anterior se presenta en la acuicultura, debido a que el cultivo de cualquier organismo hidrobiológico, coincide con el manejo de grupos reducidos de individuos, número limitado de reproductores, selección de un pequeño grupo de individuos, considerados superiores por algún criterio y la formación de un “stock” a partir de un número limitado de individuos, provenientes de la población natural (efecto fundador) y la disminución ocasional de disponibilidad de progenitores (efecto de cuello de botella) (CAICYT, 1987).

Existen dos niveles fundamentales de diversidad genética, la diversidad intrapoblacional e interpoblacional. La diversidad interpoblacional puede tomar distintas formas, desde la diferenciación genética gradual y continua entre distintas poblaciones, hasta diferencias más discontinuas que pueden dar lugar a variedades, razas geográficas o incluso especies diferentes. Las diferencias genéticas entre las poblaciones naturales, son de interés para la explotación comercial de un determinado organismo y pueden ser el punto de partida para el establecimiento de diferentes variedades y “stocks”. La mayor parte de los caracteres de interés comercial de los peces, crustáceos y moluscos como son el peso, el tamaño, la tasa de crecimiento, la resistencia a enfermedades, etc., suelen ser caracteres cuantitativos. Estos caracteres están determinados por sistemas genéticos constituidos, normalmente, por un elevado número de genes de pequeño efecto (poligenes). Además, se trata de caracteres sobre los que el ambiente suele ejercer un importante efecto. A diferencia de la variación continua los caracteres discontinuos o cualitativos suelen estar controlados por genes mayores que poseen un gran efecto sobre el carácter (PÉREZ, 1996).

#### POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

El análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism), técnica diseñada por Vos *et al.* (1995) combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y versatilidad de detección de polimorfismos mediante PCR. Desde su desarrollo y divulgación (ZEBEAU, 1993), esta técnica ha sido utilizada de forma

creciente para diferentes finalidades, tales como huellas digitales de ADN, mapeamiento genético localizado y construcción de mapas genéticos, principalmente en especies con bajo polimorfismo de ADN. El protocolo de AFLP consta esencialmente de cuatro etapas. En la primera, el ADN genómico total del individuo es cortado con dos enzimas de restricción. En la segunda, se incorporan adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos genómicos generados por la digestión enzimática. En la tercera, una fracción de los fragmentos generados es amplificada selectivamente mediante PCR, utilizando oligonucleótidos “primers” específicamente diseñados para reconocer las secuencias en los adaptadores. En la cuarta etapa, la subpoblación de fragmentos amplificados es separada en geles de alta resolución.

El polimorfismo entre fragmentos AFLP, resulta de las mutaciones puntuales, inversiones, deleciones e inserciones que llevan a la pérdida o ganancia de un sitio de restricción reconocido por las enzimas utilizadas o la alteración de una secuencia detectada por los nucleótidos arbitrarios en los extremos 3' de los oligonucleótidos cebadores que direccionan la PCR a partir de los adaptadores. (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). La ventaja más importante de esta tecnología con relación a otras existentes, es el gran número de fragmentos que se producen y revelan en un único gel. La tecnología de AFLP es, por lo tanto, muy eficiente para el muestreo amplio y simultáneo de un genoma. Una vez que es posible obtener decenas de marcadores polimórficos en un único gel, es también posible imaginar la construcción de un mapa genético con aproximadamente 200 a 300 marcadores obtenidos, solamente a partir de 5 a 7 geles de electroforesis de alta resolución. Otra ventaja de la tecnología AFLP, es la capacidad de detectar la diversidad genética, puesto que explora simultáneamente el polimorfismo de presencia y ausencia de sitios de restricción logrando, una flexibilidad significativa, en la obtención de marcadores polimórficos. De la misma manera que la técnica RAPD, el método AFLP no requiere información previa de la secuencia de ADN.

Alternativamente, pueden utilizarse otras enzimas de restricción en diferentes combinaciones produciendo así una población de fragmentos amplificado enteramente diferente. Varias decenas de enzimas de restricción están disponibles y son adecuadas para este tipo de trabajo. Por lo tanto, combinando el número de oligonucleótidos cebadores que pueden ser evaluados, se obtienen fácilmente varias centenas de miles de combinaciones. Para cada una de ellas, se detectan varias decenas de bandas de las cuales algunas serán polimórficas. El método AFLP comparado con la técnica RAPD presenta como ventaja adicional mayor repetibilidad, debido a que utiliza oligonucleótidos cebadores más largos

en la etapa de la PCR, lo que aumenta significativamente la especificidad de la amplificación (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, *op. cit.*).

Los análisis de AFLP se han aplicado en varias especies de peces como Tilapia (*Oreochromis spp*) por AGRESTI *et al.* (2000); en trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*) YOUNG *et al.* (1998) y en catfish (*Ictalurus spp*) por LIU *et al.* (1998). Los mencionados estudios coinciden en que dos factores principales afectan el número total de bandas de AFLP generadas por individuo como es la enzima endonucleasa específica usada y el número de bases adicionadas a los cebadores en el paso de amplificación selectiva. Por esta razón, considerando a los peces como organismos de genomas complejos se recomienda una amplificación selectiva de dos fases y se utiliza para la digestión de restricción las enzimas Eco RI y MseI (Vos *et al.*, 1995).

Diferentes estudios sobre diversidad genética de los peces se han basado fundamentalmente, en la metodología de isoenzimas en especial en los polimorfismos que presentan las hemoglobinas, siendo este mucho mayor que en otros grupos de vertebrados. De tal manera que ciertas hemoglobinas específicas aisladas de hemolisados, posiblemente afectarían la sobrevivencia durante alguna fase de la vida de los peces amazónicos, pero una conexión directa entre una hemoglobina específica y una bien definida presión de selección aun no se ha demostrado (FYHN *et al.*, 1979); No obstante, estudios de peces en la cuenca amazónica cuestionan, la significancia de la temperatura como un factor importante, responsable de la heterogeneidad de la hemoglobina, reportando mayor número de hemoglobinas, en peces provenientes de ambientes termolábiles, en comparación con peces de ambientes termoestables (FYHN *et al.*, 1979). PÉREZ *et al.* (1985) demostraron que el número promedio de hemoglobinas y la incidencia de polimorfismo es similar en peces tropicales y extratropicales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDIO

El análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism), técnica diseñada por Vos *et al.* (1995) combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y versatilidad de detección de polimorfismos mediante PCR. Desde su desarrollo y divulgación (ZEBEAU, 1993), esta técnica ha sido utilizada de forma creciente para diferentes finalidades, tales como huellas digitales de ADN, mapeamiento genético localizado y construcción de mapas genéticos, principalmente en especies con bajo polimorfismo de ADN. El protocolo

de AFLP consta esencialmente de cuatro etapas. En la primera, el ADN genómico total del individuo es cortado con dos enzimas de restricción. En la segunda, se incorporan adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos genómicos generados por la digestión enzimática. En la tercera, una fracción de los fragmentos generados es amplificada selectivamente mediante PCR, utilizando oligonucleótidos “primers” específicamente diseñados para reconocer las secuencias en los adaptadores. En la cuarta etapa, la subpoblación de fragmentos amplificados es separada en geles de alta resolución.

Se establecieron tres sitios equidistantes de muestreos semanales durante un período de nueve meses, que comprendieron varios regímenes de lluvia y verano. Las estaciones de muestreo se localizaron en los sectores de La Balsa, Riofrío y El Puerto de la Virginia, en el cauce de la cuenca alta del río Cauca en el Departamento del Valle del Cauca, según las distintas barreras fisiográficas y contaminantes existentes.

#### OBTENCIÓN DEL TEJIDO BRANQUIAL

Se utilizaron como muestras un centímetro de filamento branquial derecho e izquierdo de cada uno de los peces evaluados, obtenidas de manera aséptica, empleando tapabocas, pinzas y tijeras estériles. El tejido se transfirió a un vial con 3 ml de dimetilsulfóxido DMSO al 10%. El vial se rotuló debidamente, indicando la especie, el sexo, el sitio de muestreo y fecha. Igualmente, se registraron los datos morfológicos y merísticos de cada uno de los ejemplares estudiados, analizando cuidadosamente el estado de salud de los mismos específicamente piel, branquias, hígado, riñón y gónadas. Posteriormente, cada muestra fue lavada profusamente con 1 ml de agua milicox (agua sin iones) efectuando inmersión, mezclado y eliminando el agua sobrante.

#### EXTRACCIÓN DEL ADN

Se procesaron exitosamente 122 muestras de ADN, mediante el método de AUSBEL *et al.* (1987), obtenidas de branquias de ejemplares de bocachico (*P. magdalenae*) de diferentes tallas, pesos, sexos, estados gonadales, capturados con varios artes de pesca, durante regímenes climáticos secos y lluviosos. Para este efecto, el tejido branquial se pulverizó en un tubo eppendorf con nitrógeno líquido, utilizando un punzón macerador; se adicionaron 445  $\mu$ l de buffer RSB 1x, el cual está compuesto por (10 mM Tris pH 7.4; 10 mM cloruro de sodio; 25 mM EDTA) y 50  $\mu$ l de SDS al 10%. Se agregaron 5  $\mu$ l de proteinasa K para una concentración de 10  $\mu$ g/ml y se incubó durante dos horas a una temperatura de 37-56 °C. Posteriormente, se adicionaron 5  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml) y se continuó incubando por otras 2 horas. Luego se agregaron 45  $\mu$ l de cloruro

de sodio 5 M. Se extrajo con iguales volúmenes de SS fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezclaron por inversión. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos para lograr la separación en fases y se transfirió a un nuevo tubo la fase acuosa y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm. Luego, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se repitió el procedimiento anterior tres veces. Se trasladó la fase acuosa a un nuevo tubo y se adicionaron 2.5 volúmenes de alcohol absoluto para precipitar el ADN. Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos; se extrajo la fase alcohólica por inversión y se dejó secar el “pellet”. Posteriormente, se disolvió el ADN con 445  $\mu$ l de 0.1SSC (citrato de sodio) y se dejó durante la noche a 4°C. Se adicionó 1  $\mu$ l de RNAsa libre de DNAsa (previa inactivación térmica de DNAsas a 94°C durante 15 minutos). La solución se incubó por 30 minutos a 37°C. se adicionaron 45  $\mu$ l de cloruro de sodio (NaCl 5 molar). Se le agregó SS-phenol, cloroformo (volumen / volumen). Se mezcló durante 5 minutos, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos. Se separaron las fases y a la fase acuosa se le incorporó 2.5 vol. de etanol. La solución se colocó a -20°C, durante 1 hora. Luego, se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el alcohol por inversión, se dejó secar el “pellet” y se disolvió el DNA en TE 0.1 mM durante la noche a 4 °C y finalmente se almacenó las muestra a - 20°C.

#### CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Se diluyeron los DNA genómicos extraídos previamente por el método de AUSBEL *et al.* (1987) hasta obtener una concentración de 100 ng/ $\mu$ l de acuerdo con cuantificaciones electroforética empleando DNA estándar de concentración conocida.

Tabla 1. Reactivos y cantidades de digestión de ADN.

COMPONENTE		CONTROL
MUESTRA Buffer de reacción 5 x	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
DNA control Arabidopsis (100 ng/ml)	2.5 $\mu$ l	-
Muestra de DNA (250ng en máximo 18 $\mu$ l)	-	18 $\mu$ l
EcoRI/Msl (1.25 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Agua grado AFLP	15.5 $\mu$ l	hasta 25 $\mu$ l
Volumen total	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l

### DIGESTIÓN DE ADN

El control se comparó con la muestra empleando los reactivos y cantidades indicadas en la tabla 1. Se mezclaron suavemente los reactivos mediante una microcentrífuga marca Eppendorf modelo 5415C. Posteriormente, se incubó la mezcla durante 2 horas a 37°C y luego a 70 °C por 15 minutos con el fin de inactivar las endonucleasas de restricción. Luego, se colocó el tubo en hielo durante 15 minutos y se sometió a centrifugación breve; después se almacenó la muestra a - 20°C durante la noche. Se retiró la mitad del contenido de cada muestra para ser confirmada por electroforesis en agarosa en un equipo de minielectroforesis marca Bio – Rad modelo mini subcell GT con una fuente de poder de 250 voltios. De tal manera que se tomaron 12 µl de cada muestra digerida y se mezclaron con 2 µl de buffer de carga. Luego se colocaron en tubos Eppendorf y se calentaron todas las muestras a 90°C por 3 minutos. Después se colocaron en hielo por cinco minutos y se sembraron en una cantidad de 5 µl con buffer TAE 1X; la electroforesis se realizó a 75 voltios durante 60 minutos. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/µl, después se decoloró en agua por 10 minutos, se tomó la fotografía respectiva y se registraron los resultados.

### LIGACIÓN DE ADAPTADORES

Al último paso de la reacción de restricción, se le adicionaron 12 µl de solución de ligación de adaptadores y 0.5 µl de T4 DNA ligasa. Se mezclaron suavemente a temperatura ambiente y se centrifugaron brevemente para colectar el contenido de la reacción, el cual se incubó a 20 °C ± 2 °C durante dos horas. Luego se realizó una dilución 1:10 de la mezcla de ligación se tomaron 10 µl de reacción y se adicionaron 90 µl de buffer TE en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Luego, se almacenaron las mezclas de reacción de digestión de ligación diluida y no diluida a -20 °C.

### REACCIÓN DE PREAMPLIFICACIÓN

Se adicionaron a un tubo de PCR de pared delgada de 0.5 ml los siguientes reactivos: 2.5 µl de ADN plantilla diluido; 20 µl de mezcla de primer de pre-amplificación; 2.5 µl de buffer 10x PCR para AFLP; 0.5 µl de taq ADN polimerasa (1 U/µl) para un volumen final de 25.5 µl. Se mezclaron bien y se centrifugaron brevemente para colectar la reacción. Luego, se realizaron 20 ciclos en un termociclador Perkin Elmer serie P17101 de la siguiente manera: 94 °C x 30 seg; 56 °C x 60 seg; 72 °C x 60 seg. Las muestras se dejaron a 4 °C, después del paso de extensión final (7' a 72 °C). Posteriormente, se realizó una dilución 1:50. Para esto se tomaron 3 µl de la reacción de pre-amplificación y se adicionaron 47

Tabla 2. Combinaciones de cebadores +3 Eco RI y Mse I para las reacciones de amplificación selectiva en el procedimiento de AFLP.

	M-CAA	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT	M-CAC
E-AAC	X	X	X	X	X	X	X	X
E-AAG	X	X	X	X	X	X	X	X
E-ACA	X	X	X	X	X	X	•	X
E-ACC	X	X	X	X	X	X	X	X
E-ACG	X	X	X	X	X	X	X	X
E-ACT	X	•	X	X	X	X	X	X
E-AGC	0	X	0	X	X	X	X	0
E-AGG	X	X	X	X	X	X	X	X

X : Combinación no ensayada

0 : Combinación ensayada

• : Combinaciones con las que se obtuvo patrones uniformes

µl de buffer TE en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se almacenaron las soluciones diluidas y concentradas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Finalmente, se efectuó una electroforesis según el protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989). Para esto, se preparó un gel de agarosa al 1% con una concentración de bromuro de etidio de  $0.5\ \mu\text{g/ml}$ ;  $1\ \mu\text{l}$  volumen buffer carga; un voltaje de 75 voltios y se utilizó  $5\ \mu\text{l}$  de muestra para un tiempo de corrida de 45 minutos. Adicionalmente se registró la fotografía con una cámara Polaroid modelo Fotodyne, utilizando rollo Polaroid tipo Polapan #667.

#### AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Se efectuó una dilución 1/50 de la muestra, luego se tomó  $3\ \mu\text{l}$  de muestra y  $147\ \mu\text{l}$  de buffer TE y se almacenaron soluciones diluidas y concentradas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se escogieron 3 pares de primers selectivos + 3, siguiendo las recomendaciones de la casa fabricante que establecen que el número de marcadores o bandas depende de la complejidad y el tamaño del genoma. Por esta razón, se seleccionaron los oligonucleótidos “primers”, indicados en la tabla 2.

La selección de cebadores más polimórficos se realizó según el número total de bandas amplificadas y el criterio de LYNCH & MILLIGAN (1994), con el cual el análisis se restringe a las bandas cuya frecuencia observada sea menor que  $1 - (3/N)$  y mayor que  $(3/N)$  ( $N$ = número de individuos

analizados); donde las frecuencias de bandas menores o mayores a estos limites no son significativamente polimórficas.

#### DILUCIÓN DEL PRIMER EcoRI

Teniendo en cuenta que no se hizo la marcación con T4 polinucleótido kinasa, se efectuó la dilución del primer EcoRI 8/5 de la siguiente forma. Se tomaron 18  $\mu$ l del primer EcoRI seleccionado y se adicionaron 32  $\mu$ l de buffer TE, para un volumen final de 50  $\mu$ l. Se almacenó a  $-20$  °C. Posteriormente, se efectuó la preparación de las mezclas 1 y 2.

#### PREPARACIÓN DE LA MEZCLA 1

Para cada par de primers seleccionados, se adicionaron 2.5  $\mu$ l Primer EcoR I diluido; 22.5  $\mu$ l Primer Mse I (contiene dNTPs) para un volumen total de 25  $\mu$ l.

#### PREPARACIÓN DE LA MEZCLA 2

Para esta mezcla se adicionaron a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml los siguientes componentes: 39.5  $\mu$ l de agua grado AFLP; 10  $\mu$ l de Buffer 10X PCR para AFLP; 0.5  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa (5 U/ $\mu$ l) para un volumen total de 50  $\mu$ l.

#### REACCIÓN DE PCR PARA AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Se adicionaron a un tubo de PCR de pared delgada de 0.2 ml, los siguientes reactivos: 5  $\mu$ l de ADN plantilla (dilución 1:50 RX de pre-amplificación); 5  $\mu$ l de mezcla 1(primers dNTPs); 10  $\mu$ l de Mezcla 2 (Taq polimerasa/buffer) para un volumen total de 20  $\mu$ l. Se mezclaron bien y se centrifugaron brevemente en una microcentrífuga marca Eppendorf modelo 5415 C para coleccionar la reacción. Posteriormente, se

Tabla 3. Programa de amplificación selectiva de AFLP.

Archivo	°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo	#ciclo	Conexión	Tipo
1	94	60	65	60	72	90	1	2	Step
2	94	60	64	60	72	90	1	3	Step
3	94	60	63	60	72	90	1	4	Step
4	94	60	62	60	72	90	1	5	Step
5	94	60	61	60	72	90	1	6	Step
6	94	60	60	60	72	90	1	7	Step
7	94	60	59	60	72	90	1	8	Step
8	94	60	58	60	72	90	1	9	Step
9	94	60	57	60	72	90	1	10	Step
10	94	60	56	60	72	90	1	11	Step
11	94	30	56	30	72	60	23		Step

realizaron los ciclos correspondientes en un termociclador Perkin Elmer serie P17101 según lo establecido en la tabla 3.

#### PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

Se utilizó una cámara de electroforesis marca BRL de 42 cm por 39 cm, modelo S2 con una fuente de poder, marca BRL modelo 4000. Para la construcción de los geles de poliacrilamida desnaturalizante, primero se lavaron los vidrios con detergente neutro, y se limpiaron con etanol al 95%. Posteriormente, al vidrio grande se le aplicó solución de adhesión (3ml de bind – silane a 1 ml de ácido acético al 0.5% en etanol al 95%). A su vez, al vidrio pequeño se le aplicaron 600 ml de Repelsilane. Una vez ensamblado el sistema, se inyectaron los siguientes reactivos para formar un gel: 100 ml de acrilamida y bisacrilamida al 6% (proporción 19:1), 1 ml de persulfato de amonio al 10% y 20 ml de TEMED. El gel se dejó polimerizar como mínimo por una hora. Luego, se hizo una precorrida a 100 wats hasta que la temperatura de los vidrios alcanzó los 50°C. Las muestras para la electroforesis se desnaturalizaron por calor (3 minutos a 94°C) antes de ser colocadas en el gel. Se sirvieron por pozo, 2.5 ml de muestra: y 2.5 ml de buffer de secuencia (xilencianol 0.05%, azul de bromofenol 0.05%, formamida al 95% y EDTA 10 mM). La electroforesis se efectuó durante 2 horas, aproximadamente, a 55 Wats y 50 °C de temperatura constante. Una vez que terminó la electroforesis, se desmontó el ensamblaje del gel y se separaron los vidrios y sobre el vidrio grande quedó el gel de poliacrilamida para su posterior tinción con plata. Luego, el gel se colocó en ácido acético durante 20 minutos y se lavó en agua destilada tres veces. Se impregnó con nitrato de plata, en una proporción de 1 g/l con el propósito de visualizar las bandas por tinción de plata. Se reveló el gel con carbonato de sodio  $\text{Na}_2\text{O}_3$  durante 15 minutos, se secó al medio ambiente y se procedió a hacer la lectura de las bandas, mediante una lámpara de luz opaca. Finalmente, se levantaron las matrices correspondientes, se tomaron las fotografías y efectuaron los análisis estadísticos respectivos.

#### LECTURA DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida se observaron en un transiluminador de luz blanca. Para realizar el conteo de bandas se siguieron las recomendaciones, formuladas por LYNCH & MILLIGAN (1994), construyendo una matriz de presencia (1) y ausencia (0). Con la ayuda de una regla T se examinó cada uno de los individuos para establecer si presentaban, una banda determinada con buena intensidad y visualización. Se estableció que los alelos de diferente loci no presentan comigración a la misma posición y cada locus se trató como un sistema de dos alelos.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DE AGRUPACIÓN

Los datos de patrones de bandas AFLP's de cada individuo fueron codificados (presencia/ausencia) en una matriz básica de datos binarios a partir de la cual se hicieron varios análisis

### PROPÓSITOS TAXONÓMICOS

Se derivó una matriz de distancia (1-M) generada por el programa RAPDPLOT-FORTRAN elaborado por Black (1995) que estima la fracción de emparejamientos ( $M$ ) mediante la fórmula:

$$M = N_{AB} / N_T \quad (1)$$

De donde  $N_{AB}$  es el número total de emparejamientos entre los individuos A y B (tanto para bandas ausentes ó presentes) y  $N_T$  el número total de loci (fragmentos) en el estudio.

Se asume que los fragmentos que comigran se originan de idénticos alelos y la ausencia de un alelo se debe a una mutación ancestral, es decir los alelos son idénticos en su estado. Se obtiene una clara separación de individuos estrechamente relacionados bajo este método, por lo cual se recomienda su uso para estudios intra-específicos. Así, obtenida la matriz de distancia, se procedió a realizar un análisis de agrupamiento por medio del programa NEIGHBOR-PHYLIP 3.6 (alpha2), generando un dendograma bajo el método UPGMA que agrupa las parejas por promedios no ponderados. Además con el fin de mejorar la interpretación de los agrupamientos formados se realizó un Bootstrap de 100 combinaciones posibles, utilizando el programa RAPDBOOT-FORTRAN. Los árboles finales fueron diagramados y observados mediante el programa TREEVIEM.

### COMPARACIÓN DE SUBPOBLACIONES

Se utilizó el programa RAPDDIST-FORTRAN que computa las distancias genéticas entre poblaciones de un conjunto de datos estándar AFLP's bajo el método de Distancia genética estándar de Nei (1972)

$$D_{xy} = - \ln (I_{xy}) \quad (2)$$

$$I_{xy} = \frac{J_{xy}}{\sqrt{(J_x J_y)}}$$

De donde  $I = 5_{xy} / \sqrt{5_x 5_y}$  en donde  $5_x$ ,  $5_y$  y  $5_{xy}$  son las medias estimadas de las poblaciones X y Y en todos los loci. Los valores fueron corregidos por el factor de LYNCH & MILLIGAN (1994).

Con base en esta matriz se hizo un Bootstrap de 100 combinaciones posibles y como en el caso anterior un análisis de agrupamiento de las subpoblaciones de cada una de las poblaciones en estudio por medio de la técnica NEIGHBOR-PHYLIP 3.6 (alpha2) bajo el método UPGMA. A

partir de esto se obtuvo un árbol único por medio de la técnica consenso estricto y la regla de la mayoría. Los árboles finales fueron diagramados y observados en el programa TREEVIEM.

#### DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN

Para analizar la tasa de migración entre las tres poblaciones de cada una de las tres especies del estudio se calcularán los estadísticos  $F_{ST}$  de WRIGHT (1978), Theta de WEIR Y COCKERHAM (1984) y LYNCH Y MILLIGAN (1994). La tasa de migración por generación ( $Nm$ ) entre poblaciones fue estimada de  $F_{ST}$  a partir de la formula:

$$Nm = (1-F_{ST})/4 F_{ST} \quad (3)$$

Asumiendo un modelo de islas de migración entre poblaciones.

Los cálculos fueron realizados utilizando el programa RAPDFST-FORTRAN elaborado por BLACK (1995). El valor de  $Nm$  es el producto de un tamaño de población ( $N$ ) potencialmente grande y una frecuencia potencialmente pequeña, y  $m$  la tasa de migración.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES

El análisis de polimorfismo molecular de AFLP, con base en 92 loci para un tamaño muestral de 122, mostró cinco subpoblaciones (Fig. 1). Se determinó una separación poblacional estadísticamente significativa entre tres subpoblaciones de La Balsa, una en la estación de La Virginia y una en la estación de Riofrío.

El agrupamiento AFLP obtenido a partir del análisis de Bootstrap, utilizando una matriz (1-s), estableció una separación significativa del 100% entre una subpoblación de la estación de La Balsa 1 con el resto de agrupamientos, del grupo de la estación de Riofrío con relación al resto de grupos y también de grupo de la estación de La Virginia 5 con el resto de grupos (Fig. 2).

Al computar las distancias de Nei (Tabla 4), se registró, en la estación de muestreo de La Balsa, la menor distancia entre las subpoblaciones de La Balsa 1 y 2 (0.558) mientras que la mayor distancia se registró entre las subpoblaciones de La Balsa 2 y 4 (0.364) (Tabla 4). Al determinar las distancias genéticas entre estaciones de muestreo se establece la mayor entre La Balsa y Riofrío (0.715) y la menor entre las estaciones de La Virginia y Riofrío (0.574) (Tabla 4).

#### HETEROCIGOSIDAD MEDIA ESPERADA

Los patrones de bandas AFLP, revelaron polimorfismo genético entre estaciones (Tabla 5). La heterocigosidad promedio esperada, fue mayor

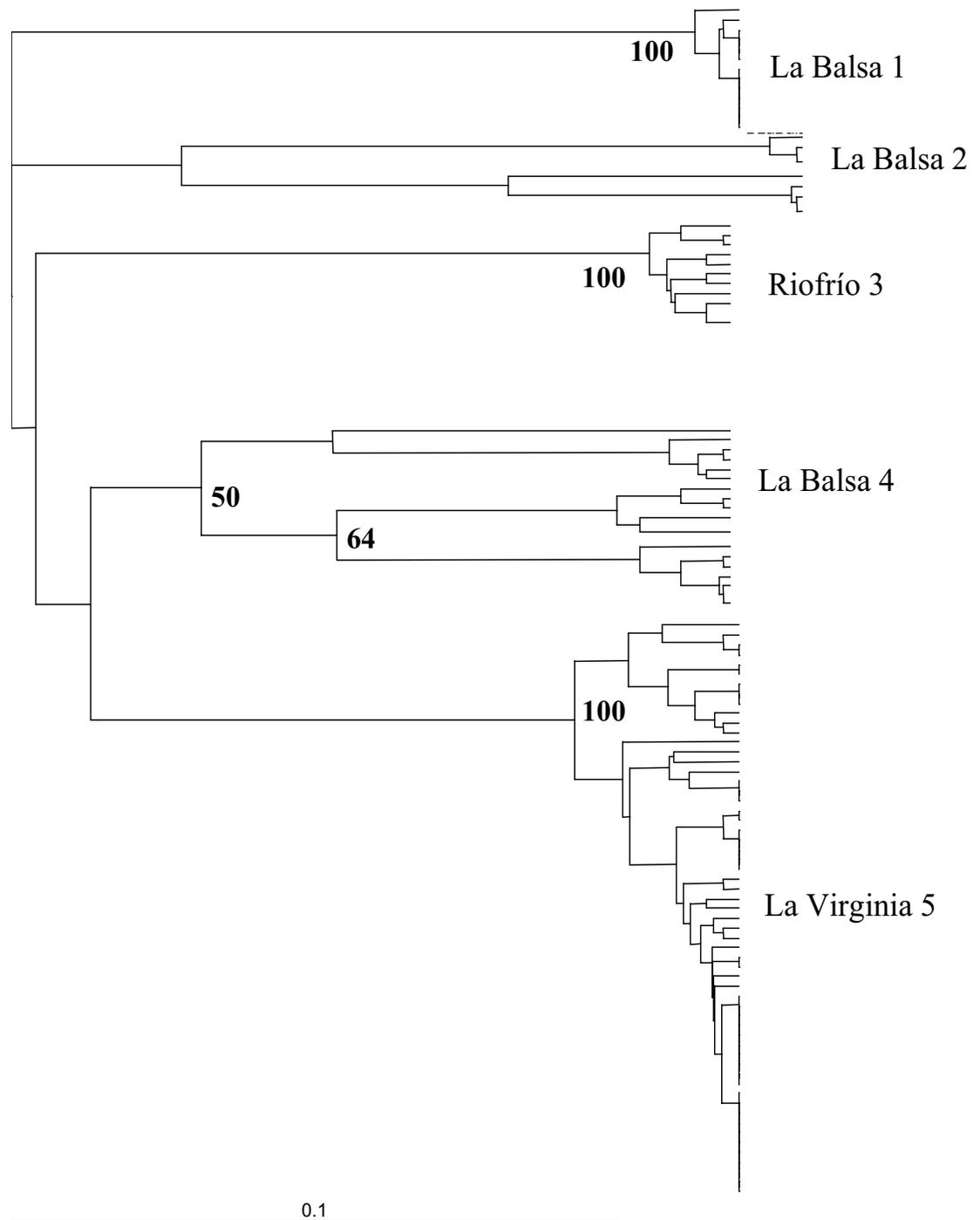


Fig. 1. Árbol consenso de poblaciones a partir de un análisis *Bootstrap* de andas de AFLP de *P. reticulatus* capturados en las estaciones de La Balsa, Riofrío y La Virginia de la cuenca alta del Río Cauca — Colombia, elaborado mediante el programa *NEIGHBOR*, usando el análisis NJ y una matriz de distancia S. Las cifras de las ramas significan, el porcentaje de consistencia del agrupamiento.

en la estación de La Balsa (0,400) la menor en Riofrío (0.039). Sin embargo, al evaluar las tres estaciones en conjunto, se estableció una



Fig. 2. Árbol consenso de subpoblaciones a partir de un análisis bootstrap de bandas AFLP de bocachico (*P. reticulatus*) capturados en las estaciones de La Balsa, Riofrío y La Virginia de la cuenca alta del Río Cauca — Colombia, elaborado por el programa *NEIGHBOR*, usando el análisis NJ y una matriz de distancia de Nei. Las cifras de las ramas significan el porcentaje de consistencia del agrupamiento

Tabla 4. Promedio de distancias genéticas entre cinco subpoblaciones de bocachico (*P. reticulatus*) de tres estaciones de muestreo de la cuenca alta del Río Cauca – Colombia comparando 92 loci de AFLP.

Estación	La Balsa 1 n = 13	La Balsa 2 n = 9	La Balsa 4 n = 20	Riofrío 3 N = 21	La Virginia 5 n = 59
La Balsa 1	0				
La Balsa 2	0.558	0			
La Balsa 4	0.413	0.364	0		
Riofrío 3	0.715	0.711	0.553	0	
La Virginia 5	0.589	0.554	0.466	0.574	0

Tabla 5. Heterocigosidad promedio esperada o diversidad genética de bocachico (*P. reticulatus*) de tres estaciones de muestreo de la cuenca alta del Río Cauca — Colombia, a partir de 92 loci AFLP.

Tipo de Marcador	Estación	Individuos analizados	Heterocigosidad Promedio Esperada
AFLP	La Balsa	42	0.365
	La Virginia	59	0.091
	Riofrío	21	0.039
	Todas	162	0.400

Tabla 6. Estimados de  $F_{st}$  y tasas de migración ( $Nm$ ) a partir de 92 loci AFLP, en poblaciones de bocachico (*P. reticulatus*) de tres estaciones de captura en la cuenca alta del Río Cauca — Colombia.

Tipo de Marcador	Estaciones	Wright's		Theta		Lynch y Milligan	
		$F_{ST}$	$Nm$	$F_{ST}$	$Nm$	$F_{ST}$	$Nm$
AFLP	Comparadas						
	La Balsa — Riofrío	0.356	0.5	0.577	0.2	0.584	0.2
	La Balsa — La Virginia	0.354	0.5	0.573	0.2	0.503	0.2
	Riofrío — La Virginia	0.602	0	0.841	0	0.855	0
	Todas	0.518	0.2	0.648	0.1	0.635	0.1

Con relación a otras investigaciones realizadas con peces teleósteos, mediante marcadores moleculares tipo AFLP, estas han sido escasas; sin embargo es importante destacar con propósitos de discusión, los estudios realizados por SPRUELL *et al.* (1999) quienes determinaron un número de bandas promedio en el Salmón Rosado de 30. LIU *et al.* (1998), cuantificó de 50 a 120 bandas en el Cadfish (*Ictalurus spp*) mediante la combinación de enzimas EcoRI y MseI. La Carpa mostró un promedio de 80 bandas en la investigación realizada por DAVID *et al.* (2001).

Valores altos de  $F_{ST}$  resultantes de similitudes dentro de las poblaciones y diversidad de las poblaciones de carpas como lo demuestra la investigación de DAVID *et al.* (2001) quienes estimaron  $F_{ST}$  (0.37) utilizando 41 loci SSR (Simple sequence repeats). Este estimativo fue similar al obtenido mediante análisis AFLP corroborando la estructura genética de la población seleccionada.

heterocigosidad de 0.400. Los anteriores valores, indican la mayor heterocigosidad de esta especie íctica en la estación de captura de La Balsa y poblaciones genéticamente homogéneas en las estaciones de Riofrío y La Virginia respectivamente, debido a las barreras fisiográficas, artificiales y contaminantes

#### TASA DE MIGRACIÓN POR GENERACIÓN

El análisis de la tasa de migración por generación  $Nm$ , mostró una tasa baja de individuos migrantes por generación (Tabla 6). Igual tendencia, se presenta entre las distintas estaciones de muestreo. Lo anterior indica la ausencia de flujo de genes debido a las barreras contaminantes presentes entre los municipios de Cali y Tuluá (UNIVERSIDAD DEL VALLE, 2001).

Según ORTEGA *et al.* (2000), el bocachico es una especie altamente afectada en cuanto a su abundancia, debido fundamentalmente a la sobreexplotación, utilización de mallas fina, pesca ilícita con dinamita y destrucción de su hábitat, debido a que prefiere ciénagas y lagunas con temperatura del agua de 20-24°C y se ubica en sitios con sustrato lodoso y las rocas están recubiertas por abundante perifiton. Esta especie, es tolerante a moderada contaminación, bajas concentraciones de oxígeno y gran cantidad de materia orgánica. Sin embargo y a pesar de ser la especie reofílica de mayor importancia económica en los ríos de Colombia y en las pesquerías locales, los mencionados autores solo los registraron en algunos sectores del río Cauca y en el río Jamundí lo que demuestra la vulnerabilidad de esta especie.

Igualmente, DAVID *et al.* (*op. cit.*) establecieron que las distancias genéticas promedias calculadas para todas las poblaciones de *Carpas* presentaron alta correlación negativa con el nivel de polimorfismo estimado por la proporción de bandas polimórficas dentro de cada población. En conclusión, los mencionados autores comprobaron el potencial de SSR y AFLP para estudios genéticos y de biodiversidad de poblaciones ícticas.

NAKAMURA *et al.* (2001) realizaron un estudio sobre incidencia de albinismo oculucutáneo (OCA) en trucha Arco Iris mediante la técnica AFLP y análisis segregante (BSA) para mapear el gen involucrado en el albinismo. Los mencionados autores determinaron cuatro marcadores AFLP fuertemente ligados al locus óculo dominante.

YOON & KIM (2001) evaluaron la similitud genética y la diversidad de poblaciones de Catfish cultivado (*Silurus asotus*) en dos áreas de Korea Occidental mediante técnica RAPD – PCR. De 20 cebadores analizados 5 generaron 1344 bandas RAPD que variaron de 8.2 a 13.2 bandas polimórficas por cebador. Las bandas polimórficas en estas poblaciones

variaron entre 56.4% a 59.6%. Los citados autores demostraron que el número de polimorfismo RAPD identificados en ese estudio fue suficiente para calcular la similitud genética y diversidad del Catfish de Korea.

SHIKANOT Y TANIGUCHI (2002) evaluaron microsátélites y RAPD como herramientas para estimular el grado de heterosis en diferentes cruces de guppies (*Poecilia reticulata*). con respecto a la tolerancia de salinidad, medida como el tiempo de sobrevivencia, después de transferir los peces de agua dulce a agua salada teniendo en cuenta que esta característica muestra heterosis significativa en esta especie pero es muy sensible a depresión por consanguinidad.

## CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que el bocachico (*Prochilodus reticulatus*), registro mayor heterocigosidad en la estación de captura de La Balsa. En contraste, fueron genéticamente homogéneas en las estaciones de Riofrío y La Virginia respectivamente, debido a las barreras fisiográficas, artificiales y contaminantes, principalmente en el tramo del río comprendido entre los municipios de Cali y Tulúa. De tal manera que esta especie, registró 5 subpoblaciones y la mayor distancia genética entre las subpoblaciones de la Balsa 1 y Balsa 2. Con respecto a las estaciones de muestreo, la mayor distancia genética se obtuvo entre La Balsa y Riofrío (0.715). Con relación a la heterocigosidad el mayor valor para esta especie se presentó en La Balsa con 0.385, seguido de La Virginia y Riofrío con el menor valor de 0.091. Los anteriores valores demuestran la gran vulnerabilidad del bocachico.

## RECOMENDACIONES

Desarrollar planes de conservación y repoblamiento del bocachico de la cuenca alta del Río Cauca y sus tributarios con ejemplares capturados en el tramo comprendido entre la Represa de Salvajina y la Balsa, debido a que son los ejemplares que presentan mayor heterocigosidad.

Valores altos de  $F_{ST}$  resultantes de similitudes dentro de las poblaciones y diversidad de las poblaciones de carpas como lo demuestra la investigación de DAVID *et al.* (2001) quienes estimaron  $F_{ST}$  (0.37) utilizando 41 loci SSR (Simple sequence repeats). Este estimativo fue similar al obtenido mediante análisis AFLP corroborando la estructura genética de la población seleccionada. Desarrollar programas integrales de control, vigilancia y recuperación en la cuenca alta del Río Cauca, Departamento del Valle del Cauca, con el propósito de disminuir la contaminación, no sólo del río sino de sus tributarios.

Iniciar un programa de reproducción inducida con ejemplares de bocachico capturados en el sector de La Balsa debido a su mayor variabilidad genética.

Implementar por parte de las diferentes instituciones oficiales y privadas, programas permanentes de monitoreo genético del bocachico.

## SUMÁRIO

O vale geográfico do rio Cauca, apresenta condições ecológicas singulares devido à existência de barreiras fisiohidrográficas artificiais e naturais, representadas pela represa barragem de Salvajina e à mudança na declividade do rio Cauca entre os povoados de La Virginia e Caucasia que geram quedas e jatos que separam as bacias alta e media, além da contaminação produzida pelos lançamentos de esgotos industriais e domésticos, provenientes de diferentes municípios. Em consequência, a fragmentação do meio aquático deste vale, possivelmente tem favorecido a presença dominante de espécies icticas exóticas tolerantes de baixo valor comercial, como o coroncoro (*Hypostomus plecostomus*) e a tilapia (*Oreochromis niloticus*), restringindo a certos trechos do rio, aos peixes nativos que requer usualmente corpos de água com adequados níveis de oxigênio e turbidez, impactando de maneira negativa a diversidade genética das espécies icticas nativos como o bocachico (*Prochilodus magdalenae*), facilitando os processos de endogamia, ao interior das populações. Pelo anteriormente exposto, na presente pesquisa, foi proposta a determinação do estado de vulnerabilidade desta espécie íctica, por meio de marcadores moleculares do tipo AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados). Para este efeito, foi obtido ADN de 122. exemplares, coletados, nas estações La Balsa, Rio frio e La Virginia. O estudo demonstrou que a técnica molecular AFLP, é útil para estabelecer a variação genética intra e interpopulacional. Os resultados determinaram cinco sub-populações de bocachico (*P. magdalenae*), com a maior heterocigosidade média esperada, na população de La Balsa (0.365) e a menor no Rio frio (0.039). Os valores  $F_{ST}$  e  $Nm$  indicam uma estrutura genética com moderado intercambio de genes e constituída por populações separadas por barreiras contaminantes e fisiohidrográficas. O análise molecular de varianza (AMOVA) determinou uma variação significativa interpopulacional de 64.1% e intrapopulacional de 35.81%. Os anteriores dados comprovam, de acordo a historia natural desta espécie íctica, o estado de ameaça, o que é muito grave, considerando que é o peixe de

maior importância comercial nas pesqueiras artesanais do vale geográfico do rio Cauca.

PALAVRAS CHAVE: *Bocachico*; *Prochilodus*; Pisces; diversidad-genetica; Cauca.

## RESUMEN

El valle geográfico del río Cauca, presenta condiciones ecológicas singulares, debido a la existencia de barreras fisiohidrográficas de tipo artificial y natural, representadas por la represa de Salvajina y al cambio de pendiente del río Cauca entre los poblados de La Virginia y Caucasia que genera saltos y chorros que separan las cuencas alta y media, lo mismo que la contaminación causada por las descargas industriales y domésticas, provenientes de diferentes municipios. En consecuencia, la fragmentación del medio acuático de este valle, posiblemente ha, favorecido la presencia dominante de especies ícticas foráneas tolerantes y de poco valor comercial, como coroncoro (*Hypostomus plecostomus*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*), restringiendo a ciertos tramos del río, a los peces nativos que requieren usualmente cuerpos de agua con adecuados niveles de oxígeno y turbidez, impactado negativamente la diversidad genética de las especies ícticas nativas como el bocachico (*Prochilodus magdalenae*), facilitando los proceso de endogamia, al interior de las poblaciones. Por lo anteriormente expuesto, la presente investigación, se propuso determinar el estado de vulnerabilidad de esta especie íctica, mediante marcadores moleculares tipo AFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados). Para este efecto, se obtuvo ADN de 122 ejemplares, colectados en las estaciones La Balsa, Riofrío y La Virginia. El estudio demuestra que la técnica molecular AFLP, es útil para establecer la variación genética intra e interpoblacional. Los resultados señalan cinco subpoblaciones de bocachico (*P. magdalenae*), con la mayor heterocigosidad promedio esperada, en la población de La Balsa (0.365) y la menor en Riofrío (0.039). Los valores  $F_{ST}$  y  $N_m$  indican una estructura genética con moderado intercambio de genes y constituida por poblaciones separadas por barreras contaminantes y fisiohidrográficas. El Análisis molecular de varianza (AMOVA,) determina una variación significativa interpoblacional de 64.1% e intrapoblacional de 35.81%. Los anteriores datos comprueban, de acuerdo a la historia natural de esta especie íctica, el estado de amenaza, lo cual es grave, si se considera que es el pez de mayor importancia comercial en las pesquerías artesanales del valle geográfico del río Cauca.

PALAVRAS CLAVE: bocachico; *Prochilodus*; Pisces; diversidad-genetica; Cauca.

## SUMMARY

The geographic valley of the Cauca River has certain ecological conditions due to the presence of natural, artificial and pollution barriers. Pollution is caused by industrial and domestic waste from the cities and towns of this region. This has had a negative impact on native fish populations, such as bocachico (*Prochilodus magdalenae*,) while foreign fish species as coroncoro (*Hypostomus plecostomus*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*), have prospered, restricting native fish to certain areas of this river, where the water offers more favorable physicochemical conditions. Therefore, the fragmentation of the aquatic environment of the geographical valley of the Cauca River, had possibly affected the genetic diversity of bocachico (*P. magdalenae*) contributing to higher instances of the endogamy process, within populations. For this purpose, genetic variability was determined through molecular markers of the kind of AFLP (Amplified fragment length polymorphism) extracting ADN from 122 fish, caught in the sampling stations of La Balsa, Riofrio and La Virginia. The investigation demonstrated that the molecular technique of AFLP, is useful in order to determine genetic variation on an intra and inter population level, mainly for ichthyic species, whose molecular genetic history has not been determined. The results established five subpopulations of bocachico (*P. magdalenae*) in three sampling stations. The greatest genetic distance was discovered between subpopulations of Riofrio 3 and La Balsa 1 (0.715). The average expected heterozygosity was higher in the population of La Balsa (0.365) than in the population of La Virginia (0.091) and Riofrio (0.039). The values  $F_{ST}$  and  $N_m$  detect a genetic structure with a moderate exchange of genes and consisting of populations separated by natural, artificial and water pollution barriers. The analyses of molecular variance (AMOVA) in bocachico, showed a significant inter population variation of 35.8%. The data proves, in keeping with the natural history of this fish, its serious level of vulnerability, especially if one takes into account that it has the highest commercial value of any fish, in the small fisheries of the geographical valley of the Cauca River.

KEY WORDS: *Prochilodus*; Pisces; genetic diversity; Cauca-river..

## RÉSUMÉ

La vallée géographique de la rivière Cauca présente des conditions écologiques particulières en raison de l'existence de barrières physio-hydrographiques du type artificiel ou naturel représentées par la barrage de la Salvajina ou le changement de la pente entre les agglomérations de La Virginia et de Caucasia qui génère des cascades et des torrents qui

séparent la haute vallée de la moyenne, et aussi de la contamination causée par les rejets industriels et domestiques des différentes municipalités. Il semble donc que la fragmentation du milieu aquatique de cette vallée a favorisé la présence dominante d'espèces ichthyologiques étrangères tolérantes et d'une valeur commerciale réduite comme le coroncoro (*Hypostomus plecostomus*) et la tilapia (*Oreochromis niloticus*) qui ont repoussé vers certaines parties de la rivière les espèces natives qui ont généralement besoin de corps d'eau aux niveaux d'oxygène et de limpidité adéquats. La diversité génétique des espèces ichthyologiques natives, comme le bocachico (*Prochilodus magdalenae*), s'en est vue compromise et l'on a observé des processus d'endogamie à l'intérieur de ces populations. Cette étude a donc pour but de déterminer l'état de vulnérabilité de cette espèce ichthyologique au moyen d'indicateurs moléculaires du type AFLP (Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés). À cet effet, on a obtenu l'ADN de 122 exemplaires recueillis dans les stations La Balsa, Río Frío et La Virginia. Cette étude démontre que la technique moléculaire AFLP est utile pour établir la variation génétique intra et inter-population. Les résultats signalent cinq sous-populations de bocachico (*P. magdalenae*), avec la plus forte moyenne d'hétérozygoté à La Balea (0.365) et la plus faible à Rio frío (0.039). Les valeurs  $F_{st}$  et  $N_m$  indiquent une structure génétique comportant un échange de gènes modéré, constituée par des populations séparées par des barrières contaminantes et physio-hydrographiques. L'Analyse moléculaire de variance (AMOVA) détermine une variation significative inter-population de 64.1% et intra-population de 35.81%. Ces résultats confirment, en accord avec l'histoire naturelle de cette espèce ichthyologique, son état d'espèce menacée, situation d'une grande gravité si l'on considère que c'est le poisson le plus important commercialement pour les pêcheries artisanales de la vallée géographique de la rivière Cauca.

MOTS CLÉS: *Bocachico*; *Prochilodus*; Pisces; diversité-génétique; rivière-Cauca.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGRESTI J. J.; S. SEKI; A. CNAANI; S. POOMPUANG; E. M. HALLERMAN; N. UMIEL; G. HULATA & G. GAE. 2000. Breeding new strains of tilapia: Development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture*, 185: 43-56.

- AUSBEL, L. B.; R. BRENT; R. E. KINGSTOON; D. MOORE & J. A. SMITH. 1987. *Current protocols in molecular biology*. Green publishing Associates and Wiley-Interscience. Harvard Medical School.
- BLACK, W. C. 1995. Statistical analysis of arbitrarily primed PCR patterns in molecular taxonomic studies. Pp. 39-55. In: *Methods in Molecular Biology*, v. 50: Species Diagnostics Protocols: PCR and Other Nucleic Acid Methods. J. P. Clapp (Ed) Humana Press Inc. Totowa, N. J.
- BRIDGES, W. R. 1973. Rainbow trout breedings projects. In *Progress in sport fishery research 1971*. US. Bur. Sports Fish. Wild. Resour. Publ., 121: 60-63.
- CAICYT. 1987. *Genética en acuicultura*. Industrias Gráficas. España. 274 pp.
- CONPES, 1997. *Documento marco sobre pesca y acuicultura*. Departamento Nacional de Planeación de Colombia. 20 pp.
- DAVID L.; P. RAJASEKARAN; J. FANG; U. LAVI & J. HILLEL. 2001. Polymorphism in ornamental and common cap strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers. *Mol. Genet. Genomics*, 266: 353-362.
- FALCONER, D. S. 1989. *Introducción a la Genética Cuantitativa*. Compañía Editorial Continental, S.A. 90 pp.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. EMBRAPA CENARGEN, Brasilia D.F.
- FYHN, V. & Y. SULLIVAN. 1974. Hemoglobin polymorphism in fishes. Complex phenotypes pattern in the toadfish. *Opsanus Tau. Biochem. Genet.* 2: 373-385.
- FYHN, V; FYHN; H., DAVIS & B. POWERS. 1979. Hemoglobin heterogeneity in amazonian fishes. *Camp. Biochem. Physiol.*, 62 A: 67-72.
- LIU Z.; A. LI P. NICHOLS & R. A. DUNHAM. 1998. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. Furcatus*), and their F1m F2, and backcross hybrids. *Mol. Gen. Genet.*, 258: 260-268.
- LÓPEZ, J. & Y. RUBIO, E. 2001. Vulnerabilidad de las especies ícticas de la cuenca alta del río Cauca en el departamento del Valle del Cauca. *Zootecnia*, 6: 42-53.
- LYNCH, M. Y & B. G. MILLIGAN. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecology*, 3: 91-99.
- MOAV, R.; G. HULATA & G. W. WOHLFARTH. 1975. Genetic differences between the Chinese and European races of the common carp. I. Analysis of genotype-environment interactions for growth rate. *Heredity*, 34: 323-340.

- NAKAMURA K.; A. OSAKI; K. IWAI; F. SAKAMOTO & T. AKUTSA. 2001. *Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss**, 265: 687–693.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Naturalist*, 106: 283–292.
- ORTEGA, A.; O. MURILLO; M. Y. PIMIENTA & J. STERLING. 1999. *Caracterización de la ictiofauna nativa de los ríos de la cuenca alta del Río Cauca en el departamento del Valle del Cauca*, Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC. 83 pp.
- ORTEGA, A.; O. MURILLO; M. Y. PIMIENTA & J. STERLING. 2000. *Peces de la cuenca alta del Río Cauca. Riqueza ictiológica del Valle Cauca*. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC. 68 pp.
- PEREZ, J.; K. Y. RYLANDER & M. NIRCHIO. 1985. The evolution of multiple hemoglobins in fishes. *Reviews Fish Biol, Fish.*, 5: 304-319.
- PEREZ, J. 1996. *Mejoramiento genético en acuicultura*. Editorial Universitaria de la Universidad de Oriente. Cumaná. Venezuela. 178 pp.
- SAMBROOK, J.; C. R. FRITSCH & T. MANIATAS. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- SHIKANOT, T. Y. & N. TANIGUCHI. 2002. Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Pecilia reticulata*) as a fish. *Aquaculture*, 204: 271-281.
- SPRUELL P.; K. L. PILGRIM; B. A. GREENE; C. HABICHT; K. L. KNUDSEN; K. R. LINDNER; J. B. OLSE; G. K. SAGE; J. E. SEEB & F. W. ALLENDORF. 1999. Inheritance of nuclear DNA markers in gynogenetic haploid pink salmon. *J. Hered.*, 90: 289-296.
- UNIVERSIDAD DEL VALLE. 2001. *Caracterización de la calidad del agua del Río Cauca y sus tributarios. Tramo Salvajina- La Virginia – Corporación autónoma Regional del Valle del Cauca*. 139 pp.
- VALDERRAMA, M.; M. PETRERE; M. Y. ZÁRATE & G. VERA. 1993. *Parámetros poblacionales, (Mortalidad, rendimiento máximo sostenible) y estados de explotación del Bocachico (*Prochilodus magdalenae*) del bajo río Magdalena 1*: pp. 43 – 60.
- VOS, P.; R. HOGERS; M. REIJANS; T. VAN DE LEE; M. HORNES; M. FREIJTEERS, J. POT; J. POLEMAN; M. KUIPER & M. ZABEAU. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuclei Acids Res.*, 23: 4407-4414.
- WEIR, B. S. & C. C. COCKERHAM. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.
- WRIGHT, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*, v. 4. *Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago.

- YOON, J.& & J. KIM. 2001. Random amplified polymorphic DNA — polymerase chain reaction analysis of two afferent populations of cultured Korean catfish *silurus asotus*. *J. Biosci.*, 5: 641-647.
- YOUNG W. P.; P. A. WHEELER; V. H. CORYELL; P. KEIM & G. H. THORGAARD. 1998. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics*. 148: 439-850
- ZEBEAU, A. 1993. *Key gene protocols AFLPs procedure, new version, february*. 9 pp.

---

Recebido em 20 de abril de 2008