

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN BOSQUES Y CONSERVACIÓN AMBIENTAL

VARIABILIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL EN
***Brycon henni* E. (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) EN LA CUENCA**
MEDIA DE LOS RÍOS NARE Y GUATAPÉ, ANTIOQUIA

Por:

JULIO CÉSAR HURTADO ALARCÓN, ZTC.

Tesis de Maestría presentada como requisito parcial para optar al Título de
Magister en Bosques y Conservación Ambiental

Director:

NÉSTOR JAVIER MANCERA RODRÍGUEZ, BIOL. Ph.D.

Profesor Asociado. Departamento de Ciencias Forestales
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

Asesor:

CLARA SALDAMANDO, BIOL. Ph.D.

Profesor Asistente. Escuela de Biociencias.
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Medellín, Julio de 2009

AGRADECIMIENTOS

- Corporación Autónoma Regional de los Ríos Negro y Nare e ISAGEN S.A. E.S.P., por la financiación y ayuda logística necesaria para llevar a cabo esta investigación.
- Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, por la utilización de la infraestructura y equipos presentes en los Laboratorios de Anatomía Animal, Ecología Aplicada (LECA), y Biología Molecular y Celular.
- Postgrado en Bosques y Conservación Ambiental, Departamento de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; por su financiación en la compra de materiales y reactivos necesarios para terminar el trabajo de laboratorio.
- Biólogos Verónica María Duque, ISAGEN S.A. E.S.P. y Javier Cardona, CORNARE; quienes gestionaron la firma del convenio interinstitucional CORNARE-ISAGEN y velaron por la consecución y ejecución de los recursos para este proyecto de investigación.
- Ings. Maria Isabel Pulgarín y Winston Cuéllar, Empresas Públicas de Medellín, por la logística y gestión en el uso de las instalaciones del campamento “La Araña”, en el municipio de San Rafael.
- Profesor Mauricio Marín, Director del Laboratorio de Biología Molecular y Celular, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, quien aportó las secuencias cebadoras para evaluar los marcadores RAPD.
- Profesora Edna Judith Márquez Fernández, por sus aportes en la interpretación de los datos obtenidos.
- Profesor Álvaro Lema, Departamento de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, por su colaboración en los análisis estadísticos.
- Zoot. Fabio García, con quien se diseñó conjuntamente la propuesta de investigación de la cual se originó esta Tesis de Maestría.
- Bióls. MSc., Alexandra Arango y María Isabel Ríos, profesoras de la Universidad Católica de Oriente, por todo el apoyo logístico (gestión para acceder al equipo de pesca eléctrica, propiedad de la U. Católica), así como por su apoyo académico y de trabajo de laboratorio brindados para la evaluación de los peces obtenidos en campo.
- Biól. Ariel Bermúdez y Zoot. Juan Guillermo Ospina, por su trabajo de campo y de identificación de las especies en laboratorio.
- A todos los compañeros del Laboratorio de Biología Celular y Molecular que colaboraron en alguna instancia del trabajo de laboratorio o en el análisis de los datos.
- Al personal que colaboró en la obtención de las muestras y el trabajo de campo en el oriente antioqueño (conductor Segio Tobón, Zoot. Fabio García, asistentes de campo, pescadores artesanales).
- Carolina Villafañe y Juan Diego Palacio, anteriormente vinculados al Instituto Alexander von Humboldt, quienes enviaron material necesario para la colecta inicial de muestras y de protocolos para trabajo con peces.
- A aquellas personas que no se mencionaron y que hayan tenido que ver con la realización de este proyecto.

RESUMEN

Brycon henni (sabaleta), es una especie nativa de la cuenca del río Magdalena y tributarios. En el departamento de Antioquia se distribuye en los ríos Nechí, Porce, Grande, Nus, Anorí, Nare y Guatapé, donde por décadas ha sido aprovechada por los campesinos y pescadores deportivos. Su sobre-explotación podría generar una pérdida de la variabilidad genética en sus poblaciones. En este estudio, fue determinada la variabilidad genética y la estructura poblacional en *Brycon henni* E. en la cuenca media de los ríos Nare y Guatapé. Se extrajo ADN genómico total de 195 ejemplares, para su evaluación con cebadores para amplificación de regiones de ADN microsatélite y con oligonucleótidos para la técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Con relación a las regiones de ADN microsatélite, no se obtuvieron amplificaciones de utilidad, solo múltiples bandeos inespecíficos y monomórficos con algunas de las secuencias, sin utilidad en la estimación de variabilidad y estructura genética. Por el contrario, con la amplificación de secuencias RAPD se hallaron 66 fragmentos diferentes, de los cuales un 63% fueron polimórficos. Mediante análisis de varianza molecular (AMOVA), se mostró estructuración poblacional para todos los sitios en las dos cuencas evaluadas y para la cuenca del río Nare ($\Phi_{ST}=0.297$ y $\Phi_{ST}=0.163$, $p<0.001$; respectivamente). Se estimaron las distancias genéticas y se encontró que todas las poblaciones diferían entre sí ($p<0.01$). La matriz de distancias genéticas permitió discriminar entre ejemplares provenientes de las dos cuencas. Se realizó un Test de Mantel y se halló correlación entre las distancias genéticas y geográficas ($r=0,431$; $p<0.001$, ambas cuencas; $r=0.377$, $p<0.001$, cuenca del río Nare). Los hallazgos de este trabajo sugieren la ocurrencia de una población estructurada, y pueden tener implicaciones importantes para la conservación de la variabilidad genética de diferentes poblaciones naturales de *Brycon henni*.

Palabras clave: Variabilidad genética, *Brycon henni*, estructura poblacional, RAPD, conservación.

Genetic variability and population structure in *Brycon henni* E. (Characiformes: Characidae) in the middle basin of Nare and Guatapé rivers, Antioquia

ABSTRACT

Brycon henni (sabaleta) is a native fish from Magdalena River and tributaries. In Antioquia, it is distributed across Nechí, Porce, Grande, Nus, Anorí, Nare and Guatapé rivers, and it has been widely exploited by local countrymen and sport fishermen. The overfishing could drive to losses of genetic variability into populations. In this study were determined genetic variability and structure in populations of sabaleta from middle basin of Nare and Guatapé rivers. Total genomic DNA from 195 individuals were extracted, for evaluation with primers for amplification of microsatellite regions of DNA and oligonucleotides for the RAPD technique (*Random Amplified Polymorphic DNA*). With regard to regions of microsatellite DNA, no amplification were useful, because it was obtained only nonspecific multiple monomorphic bands with some of the primer sequences, useless in the estimation of variability and genetic structure. Nevertheless, by means of amplification of RAPD sequences were found 66 different fragments, of which 63% were polymorphic. Through analysis of molecular variance (AMOVA), population structure was shown for all sites in the two basins and the river Nare ($\Phi_{ST}=0.297$ y $\Phi_{ST}=0.163$, $p<0.001$; respectively). Genetic distances were estimated and found that all populations were different ($p < 0.01$). The genetic distances matrix allowed to discriminate between both of the middle river basins evaluated. It was carry out a Mantel Test, finding correlation between genetic and geographic distances ($r=0.431$, $p<0.001$, both of the basins evaluated; $r=0.377$, $p<0.001$, Nare river basin). The results of this work suggest the occurrence of structured populations, and could have valuable implications to conservation of genetic variability in natural populations of *Brycon henni*.

Key words: Genetic variability, *Brycon henni*, population structure, RAPD, conservation

INTRODUCCIÓN

En Colombia los ríos andinos están sometidos a problemáticas asociadas con la alteración de ecosistemas por fragmentación y pérdida de hábitat, alteración en las dinámicas de regulación hídrica, pérdida de la cobertura vegetal de sus laderas, alta presión sobre recursos hidrobiológicos, contaminación, entre otros problemas, lo cual conlleva a una alta pérdida de biodiversidad (Mojica 1999; Mojica *et al.* 2002). El país posee un enorme potencial en recursos ícticos, y se estima que el número de especies de peces de agua dulce en el país podría ser superior a 2000 (Cala 1987, 2001).

Brycon es uno de los principales géneros de peces de agua dulce del neotrópico, y algunas de sus especies son explotadas como recurso pesquero (Wasko *et al.* 2004). Dentro de este género se encuentra *Brycon henni* (Eigenmann 1913), especie endémica colombiana de alta importancia para la seguridad alimentaria de los pobladores ribereños de los cuerpos de agua que habita, y alternativa promisoría para realizar reintroducciones, como opción para la conservación de la especie y el desarrollo de pesca deportiva. *B. henni*, conocido en los Andes Centrales de Colombia como sabaleta, es una especie nativa de la cuenca del principal río colombiano, el río Magdalena y tributarios, distribuyéndose ampliamente desde el suroccidente hasta el noroccidente colombianos (Montoya *et al.* 2006).

B. henni no aparece en ninguna de las categorías de riesgo propuestas por el libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia (Mojica *et al.* 2002), ni en la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN 2003). Sin embargo, esta especie es altamente susceptible a cambios en las características físico-químicas del agua, en particular a la disminución del contenido de oxígeno disuelto (Builes & Urán 1974), así como a la contaminación de los cauces de agua, lo que puede ocasionar disminuciones significativas en el número de individuos dentro de sus poblaciones.

En la cuenca alta y media del río Nare, la sabaleta comparte su hábitat con algunas especies de peces nativos, así como con especies exóticas de peces (*Cyprinus carpio* -carpa-, *Oreochromis* sp. -tilapias-, *Micropterus salmoides* -“trucha Bass”). Esta última especie fue reportada por el antiguo Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura – INPA, con una amplia distribución en Antioquia, en el área de influencia del presente estudio (Alvarado & Gutiérrez 2002). Dada la introducción de especies exóticas en muchos ecosistemas acuáticos colombianos, se han generado desequilibrios, provocados por la competencia que ejercen sobre las poblaciones de peces nativos (Alvarado & Gutiérrez 2002).

Por otra parte, las modificaciones de las condiciones ambientales en sistemas lóticos pueden reducir las poblaciones de peces. En particular, la construcción de presas puede producir serios impactos en las comunidades de peces, debido a perturbaciones o bloqueos de las migraciones de peces (Katano *et al.* 2003, 2006). Así mismo, se han encontrado reducciones en distribución, densidad y diversidad de poblaciones de peces, luego de la construcción de presas (Morita & Yamamoto 2002; Katano *et al.* 2006).

Dentro de este contexto, las modificaciones marcadas en las condiciones propias en diferentes tramos del río Nare, tales como la construcción de embalses en el oriente antioqueño, podrían originar impactos sobre las poblaciones naturales de sabaleta presentes en el río. Estos cambios en el hábitat pueden estar generando procesos de pérdida de biodiversidad y modificaciones marcadas en las condiciones propias en diferentes tramos del río Nare. Hasta el momento, no existen estudios que hayan evaluado los posibles impactos del aislamiento ocasionado por los embalses del oriente antioqueño sobre la estructura poblacional de la sabaleta presentes en diferentes tramos del río Nare.

Para la cuenca media del río Nare podría esperarse que las poblaciones de sabaleta se estén aislando unas de otras debido a la fragmentación de hábitat y a barreras físicas para su

migración. Mediante el uso de marcadores moleculares en *Brycon henni*, con este trabajo se realizaron estimados de variabilidad y estructura genética en algunas poblaciones de esta especie, en la cuenca media de los ríos Nare y Guatapé.

La información obtenida en el presente estudio podría ser de utilidad para la formulación de nuevas recomendaciones de manejo de esta especie para esta zona del departamento de Antioquia. Una de tales recomendaciones recae en el planteamiento de alternativas de investigación en variabilidad genética en esta especie, lo cual puede brindar información previa necesaria antes de formular recomendaciones de manejo más complejas entre las que se pueden mencionar los repoblamientos (reintroducciones) de individuos.

Las regiones de ADN microsatélite han sido ampliamente usadas para el análisis de variación genética entre y dentro de poblaciones. Una aplicación incluye el cálculo de distancias genéticas entre individuos, para inferir diferentes niveles de relación jerárquica, o pueden ser de ayuda en la estimación de parentesco, lo cual es una base importante para la evaluación de caracteres evolutivos o ecológicos (Blouin 2003; Jones & Ardren 2003). Por su parte, la técnica de Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar (RAPD), es una herramienta útil para determinar la diversidad genética entre poblaciones (Barman *et al.* 2002; Barfai *et al.* 2003). Esta técnica consiste en la amplificación de pequeños fragmentos de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*), distribuidos a lo largo del genoma, utilizando un único iniciador de secuencia arbitraria (Welsh & McClelland 1990; Williams *et al.* 1990). Es una técnica que se utiliza con mucha frecuencia porque ofrece muchas ventajas: no se necesita tener un conocimiento previo de las secuencias en el genoma a analizar, el iniciador utilizado se puede hibridar al azar en cualquier región del cromosoma, permite asegurar una buena interpretación de la diversidad genética al usar un número alto de iniciadores, y permite obtener un gran número de fragmentos con poca cantidad de ADN (Palumbi 1996; Bardakci 2001).

De acuerdo a los planteamientos descritos, se tomó como objetivo principal del presente estudio la evaluación de variabilidad y estructura genética en poblaciones naturales de *Brycon henni* (Eigenmann 1913) aisladas por barreras físicas (embalses y represas del Oriente Antioqueño) presentes en la cuenca media de los ríos Nare y Guatapé, Antioquia, con la utilización de marcadores moleculares específicos -regiones de ADN microsatélite - e inespecíficos (Polimorfismos de ADN Amplificados Aleatoriamente – *RAPD*), con el fin de aportar herramientas y elementos útiles para la toma de decisiones relacionadas con el manejo de este recurso pesquero endémico.

METODOLOGÍA

Área de estudio

La colección de material biológico se realizó en jurisdicción de los municipios de San Vicente, Concepción, San Roque, Alejandría, San Rafael y San Carlos, oriente del departamento de Antioquia, en diferentes sectores de los ríos Nare y Guatapé, así como en algunos de sus afluentes (Figura 1). El territorio es montañoso, pero cuenta con regiones planas y topografía ondulada, cuyo relieve forma parte de la cordillera central. Presenta zonas de vida de bosque húmedo montano bajo (bh-MB) y bosque muy húmedo premontano (bmh-PM), según la clasificación de Holdridge (1978). La temperatura promedio es de 18°C para San Vicente, Alejandría y Concepción, y de 23°C para San Rafael, San Carlos y San Roque.

Se realizaron un total de 4 muestreos distribuidos entre octubre de 2007 y mayo de 2008, tiempo en el cual se colectaron ejemplares de *Brycon henni*. Se establecieron siete estaciones de muestreo, cinco ubicadas en la cuenca media del río Nare y dos ubicadas en la cuenca media del río Guatapé. La estación de muestreo aguas arriba embalse Peñol-Guatapé, estuvo conformada por dos sitios de muestreo (quebradas La Compañía y La Magdalena), debido al

bajo número de ejemplares presentes en cada uno de ellos. En la Tabla 1 se pueden observar las estaciones de muestreo y su ubicación y altura sobre el nivel del mar, así como el número de ejemplares estudiados en cada una de ellas.

Se midieron de forma puntual a nivel de superficie los parámetros temperatura, pH, conductividad, porcentaje de saturación de oxígeno y contenido de oxígeno disuelto en el agua, en los diferentes cuerpos hídricos donde se realizaron las capturas, con el fin de tener un referente general de las condiciones del hábitat de la especie. El valor presentado para estos parámetros corresponde al valor medio de cada uno de ellos para las cuatros salidas de campo.

Captura de individuos y toma de muestras biológicas

Los ejemplares de *B. henni* se capturaron utilizando diferentes artes de pesca (pesca eléctrica, atarraya, nasa, anzuelo), contando con los respectivos permisos de la autoridad ambiental local, la Corporación Autónoma Regional de las Cuencas de los Ríos Negro y Nare - CORNARE. De cada uno de los ejemplares capturados se colectó aprox. 1 gr de tejido muscular, y/o 0.5-1 ml de sangre periférica, en viales para microcentrífuga (AMERICAN SCIENTIFIC, USA) de 2.0 ml, los cuales contenían solución *buffer* de colecta (0.1 M Tris, 0.1 M EDTA, 0.01 M NaCl y 0.5% p/v SDS). Se refrigeraron a 4°C, y se transportaron a los Laboratorios de Ecología Aplicada –LECA- Área de Fauna Silvestre, Departamento de Ciencias Forestales, y de Biología Molecular, Escuela de Bio-Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, en donde se almacenaron a -20°C antes de someterse a procesos de extracción de ADN.

Extracciones de ADN Genómico

Para la extracción de ADN a partir de los tejidos de los ejemplares de sabaleta capturados (sangre y músculo) se utilizaron diferentes métodos, de acuerdo al tipo de tejido (sangre y músculo). El objetivo de este ítem fue obtener ADN de buena calidad y en alta concentración, para lo cual se realizaron modificaciones de varios métodos de extracción (Taggart *et al.* 1992; Sambrook *et al.* 1989), así como se evaluó el protocolo de precipitación de ADN con una solución concentrada de NaCl, descrito por Lopera-Barrero *et al.* (2006). La utilización de los dos métodos de extracción se debió a la necesidad de trabajar con reactivos de baja peligrosidad para su manipulación y descarte.

Protocolo de extracción cloroformo-alcohol isoamílico: Éste método es una modificación de los métodos de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico descritos por Sambrook *et al.* (1989) y por Taggart *et al.* (1992). Se toman aprox. 0.3 gr. de músculo, se macera y se resuspende en 500 ul de solución de extracción STE (0,1M Tris, 0,01M NaCl, 0,5M EDTA) en microtubos estériles de 2 ml, adicionándole 30 ul SDS 10% y 15 ul proteinasa K (20mg/ml). Se deja incubando por 14-16 horas a una temperatura de 55°C, luego de lo cual se adicionan 400 ul de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agita suavemente por dos minutos y se centrifuga a 13000 rpm durante 15 minutos. Se toma el sobrenadante, se adicionan 400 ul de isopropanol frío, se homogeniza suavemente y se centrifuga nuevamente a 13000 rpm por 15 minutos. Se descarta el sobrenadante y el tubo se resuspende con 100 ul de agua ultrapura estéril, se almacenan por 24 horas a 4°C para la completa hidratación y dilución de las extracciones, y finalmente se adicionan a cada muestra 2 ul de RNasa pura y se incuban por 30 minutos a 37°C. Se almacena a 4°C.

Protocolo de precipitación de ADN con una solución concentrada de NaCl (modificado por Lopera-Barrero *et al.* 2008): Se toman aproximadamente 0,3 g. de músculo macerado, y se adicionan 550 ul de solución de lisis (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM de EDTA, 100

mM de NaCl), 1% de SDS y 7 μ L de 200 μ g·mL⁻¹ de proteinasa K, y las muestras se incuban a 50°C por 12 h. Luego, se adicionan 600 μ L de NaCl 5M a cada muestra antes de centrifugar por 10 min a 12000 rpm. El sobrenadante se transfiere, se precipita el ADN con 700 μ L de etanol absoluto frío y se incuba a -20°C por 2 h. Se centrifuga, se lava con 700 μ L de etanol 70% y se resuspende en solución tampón TE 10:1 (10mM de Tris pH 8.0 y 1 mM de EDTA). SE incuba con 2 ul RNasa a 37°C por 30 minutos. Se almacena a 4°C.

Evaluación de la calidad y cantidad de ADN obtenido en las extracciones

La cantidad y calidad del ADN extraído se evaluó en geles de agarosa (0.8%) teñidos con bromuro de etidio, se verificó en transiluminador de luz U.V., y se cuantificó con ayuda de un espectrofotómetro (ThermoScientific, USA), para lo cual la concentración del ADN genómico se determinó mediante un análisis de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

Estandarización del proceso de amplificación de loci de ADN Microsatélite y de RAPD (Polimorfismos de ADN Amplificados Aleatoriamente)

ADN *microsatélite*: Se evaluaron diferentes condiciones de amplificación para 7 pares de cebadores (Forward -sentido- y Reverse -antisentido), diseñados para la especie cercana *Brycon hilarii* (Sanches & Galetti 2006). Adicionalmente, se evaluaron dos pares de cebadores, diseñados para *Prochilodus argenteus* (cebador *Par53*) (Barbosa *et al.* 2006), y para *Prochilodus costatus* (cebador *Pcos17*) (Carvalho-Costa *et al.* 2006) (Tabla 2).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PT-100 (MJ RESEARCH, USA) en microtubos de 200 μ l, en los cuales se adicionó la mezcla de reacción que contenía para cada tubo, 1 μ l de ADN molde, 0.5 U de *Taq* polimerasa, 1.25 mM de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfatados, 1.5 mM MgCl₂ y 2.5 μ mol de cebadores (sentido [F] y antisentido [R]), en una solución tampón (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl y 15mM MgCl₂). Los tubos se aforaron con agua bidestilada, autoclavada y microfiltrada, hasta un

volumen final de 25 µl por reacción. Se estandarizaron las concentraciones de ADN, de cloruro de magnesio y las temperaturas de hibridización de los cebadores. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: temperatura 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de un minuto a 95°C, un minuto a una temperatura óptima de alineamiento (entre 50-56°C, de acuerdo a la T^om ideal para cada pareja de cebadores usados), y un minuto a 72°C. Finalmente, cinco minutos a 72°C. Los productos de amplificación se almacenaron a -20°C (Barbosa *et al.* 2006; Carvalho-Costa *et al.* 2006; Sanches & Galetti 2006).

Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en geles de agarosa (1.5%), teñidos con bromuro de etidio en cámaras de electroforesis horizontales (BIO-RAD, USA) y observados sobre una pantalla de luz ultravioleta para confirmar la efectividad de la amplificación. Para determinar el tamaño de los distintos alelos y genotipos, se realizó electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (poliacrilamida 6%, 6 M de urea, 30% formamida), en cámaras de electroforesis verticales (SEQUI-GEN, BIORAD, USA). La visualización de las bandas en los geles se realizó mediante tinción con nitrato de plata (Bassam *et al.* 1991). Para determinar los tamaños de los alelos, en cada corrida se insertó un marcador molecular de secuencia conocida en un rango entre 10-330 pares de bases (GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder, FERMENTAS CANADA INC).

Evaluación de cebadores para la técnica RAPD: Se ensayaron 16 cebadores decámeros (10 bases cada uno) para RAPD de las series OPBA, OPAN y OPE (OPERON TECHNOLOGIES, USA) (Tabla 3), los cuales se sometieron a evaluación para detectar como primera medida contaminación de los mismos, seguido de la identificación de los más polimórficos al momento de efectuar las reacciones de amplificación aleatoria de ADN mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Para obtener productos de amplificación de secuencias RAPD, se evaluaron diferentes condiciones, a partir de las recomendadas por Pineda *et al.* (2007) y Wasko *et al.* (2004), las cuales incluyeron las concentraciones usadas de cada reactivo, así como los perfiles térmicos de amplificación. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PT-100 (MJ

RESEARCH, USA) en microtubos de 200 μ l, en los cuales se adicionó la mezcla de reacción que contenía para cada tubo, 1 μ l de ADN molde (60-100 ng), 0.5 U de *Taq* polimerasa (FERMENTAS UAB, CANADÁ), 0.2 mM de una solución de los cuatro deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs; FERMENTAS UAB, CANADÁ), 2.0 mM $MgCl_2$ (FERMENTAS UAB, CANADÁ), 10 pmol de cebador decámero (*primer*) y 2.5 μ l de solución *buffer* 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl y 1.5mM $MgCl_2$). El volumen final fue de 25 μ l por reacción. Se estandarizaron las concentraciones de ADN, de cloruro de magnesio y las temperaturas de hibridización de los cebadores. El perfil térmico para las reacciones de PCR incluyó denaturación inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de un minuto a 95°C, entre 35-45 segundos a una temperatura óptima de alineamiento (36°C), y un minuto a 72°C. Finalmente, un paso de extensión final de dos minutos a 72°C, y enfriamiento a 4°C durante 30 minutos. Los productos de amplificación se almacenaron a -20°C.

Para determinar el tamaño de los distintos fragmentos obtenidos en el proceso de amplificación, los productos de amplificación se cargaron en geles de agarosa (1.4%) en tampón TBE 1X, y se utilizó una escalera de peso molecular, la cual contiene 14 bandas entre 100-3000 pares de bases (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, FERMENTAS CANADA INC.). Para su visualización, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 ug/ml), y se sometieron a electroforesis en cámaras horizontales (BIO-RAD, USA). Las condiciones de corrido fueron 80 voltios y 400 mA durante dos horas. Los geles se observaron sobre una pantalla de luz ultravioleta para confirmar la efectividad de la amplificación. Por último, los geles se fotografiaron en un equipo de captura de imágenes (BIODOC ANALYZE - BIOMETRA, GERMANY), y las imágenes se guardaron como archivos .JPG para el análisis de las bandas (fragmentos) obtenidas. Debido a los potenciales problemas de replicabilidad de la amplificación relacionados con la técnica RAPD, aproximadamente el 25% de las muestras fueron amplificadas y corridas electroforéticamente por duplicado.

Análisis de datos

Amplificación de regiones de ADN microsatélite: Para estimar variabilidad y estructura genética con este marcador molecular, se debe construir una matriz con los genotipos de cada individuo evaluado, para obtener medidas de diversidad genética general (número total de alelos, número efectivo de alelos, frecuencias alélicas, heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada o índice de diversidad genética (H_e)) (Hartl y Clark, 1997; Hedrick 2004). Otros análisis posibles con este marcador incluyen desequilibrio de ligamiento (para determinar si los loci analizados se encuentran bajo asociados por ligamiento físico entre ellos o epístasis), diferenciación génica y genotípica, y estructura poblacional (Φ_{ST}) (Hartl y Clark, 1997; Hedrick 2004, Peakall y Smouse 2006). En los resultados se hará referencia a los problemas de amplificación obtenidos con esta técnica.

Amplificación de polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente (RAPDs): La presencia o ausencia de fragmentos de tamaños moleculares idénticos se usó para la construcción de una matriz de similaridad con base en el cálculo del coeficiente de similaridad de Jaccard, codificando 1 como presencia de fragmento y 0 como su ausencia. La variabilidad genética se determinó por el porcentaje de loci (fragmentos) polimórficos. El análisis de estructura poblacional se obtuvo mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA), mediante la estimación del análogo del F_{ST} de Wright (1978), Φ_{ST} , descrito por Excoffier *et al.* (1992) y Michalakis & Excoffier (1996), y Peakall y Smouse (2006) con el cual se obtienen estimados de los componentes de la varianza inter e intra-poblacional.

La determinación del nivel de diferenciación genética entre poblaciones se estableció similarmente por medio de la definición propuesta por Wright (1965), donde valores entre 0,00 a 0,05; 0,05 a 0,15; 0,15 a 0,25 y $> 0,25$ indican pequeña, moderada, alta y elevada diferenciación genética, respectivamente (Hartl y Clark 1997). Por último, se realizó una prueba de Mantel con 999 permutaciones, para evaluar la posible correlación entre las

matrices de distancias genética y geográfica. Esta prueba de Mantel puede mostrar patrones de aislamiento por distancia (Wright 1943), mediante la medición de la independencia entre las distancias genéticas y geográficas, por lo que se plantearon dos hipótesis:

- H_0 : ambas distancias son independientes
- H_A : hay una correlación entre ambas variables, tal y como se espera bajo aislamiento por distancia.

Por otra parte, se llevaron a cabo análisis de distancia e identidad genética insesgados, según lo descrito por Nei (1978). Todos los análisis mencionados se realizaron con el programa GENAIEx (Peakall & Smouse 2006), versión 6.2, (2008), el cual es una aplicación para el programa Microsoft Office Excel. Puede descargarse gratuitamente en el sitio URL <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx/> .

La matriz del coeficiente de similaridad de Jaccard se utilizó para elaborar un dendrograma de distancias genéticas mediante el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*, Método No Ponderado de Apareamiento por Grupos con Media Aritmética), con el programa estadístico NTSYS 1.7 (Rohlf 1989). Así mismo, se realizó un análisis de conglomerados (*cluster*) a nivel de poblaciones, para obtener un dendrograma por el método Neighbor-Joining (vecino más cercano), utilizando los datos obtenidos de distancias genéticas intrapoblacionales, con el programa STATGRAPHICS CENTURION XV (versión de prueba obtenida en el sitio URL <http://www.statgraphics.com/>)

RESULTADOS

Los valores medios de oxígeno disuelto y porcentaje de saturación en superficie son altos para la mayoría de las estaciones localizadas aguas arriba de los embalses (7.28-8.28 mg/l O₂; 86-105.3 % sat.O₂), a excepción de la quebrada San Lorenzo (4.6mg/l O₂; 58.2% sat. O₂). No se hallaron valores que indicaran condiciones de anoxia en ninguna de las estaciones de muestreo. Los valores medidos de temperatura y pH del agua son muy similares en todas las estaciones de muestreo. Sin embargo, los valores más altos de temperatura se presentaron en las estaciones ubicadas en el río Nare, la cual es la estación ubicada a menor altura sobre el nivel del mar (694 m.s.n.m). Por último, los valores de conductividad de las aguas tuvieron sus máximos en las estaciones localizadas aguas abajo de cada una de las cuencas evaluadas (río Nare-cuenca río Nare y quebrada El Cardal- cuenca río Guatapé; 61.1 y 62.7 µS/cm, respectivamente) (Tabla 4).

Extracción de ADN genómico total: Con los dos métodos de extracción evaluados, se obtuvieron concentraciones similares de ADN. En la figura 2 se puede apreciar una de las extracciones de ADN obtenida en algunos de los individuos provenientes de los sitios de muestreo Antes embalse Peñol-Guatapé y Santa Gertrudis.

Al momento de cuantificar el ADN extraído, para la mayoría de muestras se hallaron valores muy aceptables de concentración del mismo, y suficientes para acometer los procesos de amplificación de ADN. Para todos los sitios de muestreo, en las extracciones de ADN se hallaron valores de absorbancia entre 0.012-0.212, En la Tabla 5 se pueden apreciar los rangos de absorbancia obtenidos en las extracciones de ADN, con los cuales se estimaron las concentraciones de ADN previo a las diluciones para trabajar en PCR.

Amplificación de regiones de ADN

ADN Microsatélite: Luego de los procesos realizados de optimización de las reacciones de amplificación de ADN, no fue posible obtener matriz alguna de genotipos de *Brycon henni* debido a que se encontraron inespecificidades de amplificación de los cebadores para regiones de ADN microsatélite. Los resultados no arrojaron medidas de diversidad genética general, ni fue posible estimar estructura poblacional ni los parámetros F ni sus análogos (θ , f) (Wright 1978; Weir & Cockerham 1984). Aunque las variaciones en el proceso de estandarización son inherentes al trabajo de laboratorio, en el presente estudio surgieron diferentes problemas que conllevaron a una pobre o nula amplificación (inespecificidades de apareamiento de los cebadores usados con el ADN molde). Esto puede conducir a largos procesos y altos costos, tal y como sucedió con los cebadores usados para amplificación de regiones de ADN microsatélite.

Estandarización de las condiciones de amplificación de regiones de ADN microsatélite: Los cebadores diseñados para las especies relacionadas *Brycon hilarii* (Sanchez & Galetti 2006), *Prochilodus costatus* (Carvalho-Costa *et al.* 2006) y *Prochilodus argenteus* (Barbosa *et al.* 2006), mostraron que del total de las secuencias mencionadas diseñadas para las especies relacionadas (9 pares diferentes de cebadores), solo se logró la visualización de un alto número de bandas inespecíficas, monomórficas y reproducibles para los pares de cebadores *Bh5* y *Bh6*, aunque para algunos de los otros cebadores también se encontraron bandas inespecíficas (*Bh8*, *Pcos17*, *Par53*). En las figuras 3 a 6 se puede observar la inespecificidad y/o la falta de amplificación de las regiones de ADN microsatélite, con algunos de los cebadores usados. Para *Bh5* y *Bh6*, solo se observaron monomorfismos de múltiples bandas, con dos bandas más marcadas que el resto con un peso molecular aproximado de 450 pb, reflejando alta inespecificidad en la amplificación (más del doble de lo esperado para el género *Brycon*). (Figuras 3-6).

Para las parejas de cebadores mencionados, las variaciones realizadas incluyeron cambios sucesivos en las temperaturas de alineamiento de acuerdo a cada pareja de cebadores. Se comenzó con 56°C, y se continuó con 57, 58, 60, 55, 54, 52 y 50°C. Con estas variaciones, no hubo cambios en los patrones de amplificación, solo aparecieron amplificadores inespecíficos y monomórficos y de bandas múltiples, en lugar de una o dos bandas como es normal en amplificación de microsátélites de especies diploides. Sin embargo, el caso más común fue la desaparición total de señales de amplificación.

Otra modificación realizada fue el cambio en las concentraciones de cloruro de magnesio, *Taq polimerasa*, y concentraciones de ADN incorporado como molde. Ninguna de estas modificaciones tuvo efecto, además se resalta el hecho de que no había problemas de contaminación, puesto que en cada reacción de amplificación se incluía una muestra control (sin ADN). Se corroboró por el corrido electroforético, puesto que las bandas de control no reaccionaban a la tinción (EtBr). Así mismo, se tomaron muestras aleatoriamente, y se realizó una evaluación preliminar de amplificación y secuenciación de la región 16S del ADN ribosomal, encontrándose que las secuencias amplificadas correspondían a peces y no a potencial contaminación de las extracciones de ADN de *Brycon henni*.

Verificación de los resultados obtenidos en las amplificaciones inespecíficas y monomórficas de los cebadores para ADN microsatélite: En la figura 8 se puede observar uno de los geles desnaturalizantes de poliacrilamida (6%), teñido con nitrato de plata (Bassam *et al.* 1991), con los cuales se verificaron las inespecificidades arrojadas por los cebadores utilizados para amplificación de ADN microsatélite. En esta figura se corroboran las inespecificidades observadas inicialmente en los geles de agarosa, ya que las muestras 1-21 (cebador *Bh6*) y 1-13 (cebador *Bh5*) muestran bandeos múltiples e inespecíficos, en lugar de mostrar una o dos bandas para cada muestra, lo cual es lo usual y normal para marcadores de ADN microsatélite.

Amplificación aleatoria de Polimorfismos de ADN

Variabilidad genética: Se caracterizaron genéticamente 195 ejemplares de *Brycon henni* mediante oligonucleótidos para la técnica RAPD. De un total inicial de 16 secuencias cebadoras de decámeros para RAPD, se escogieron cuatro secuencias de oligonucleótidos (OPBA13, OPBA10, OPE07, OPAN17), basándose en la replicabilidad de los perfiles obtenidos (dada por los procesos de estandarización) y en el éxito de amplificación en todos los 195 individuos muestreados. En la Tabla 6 se pueden apreciar los cebadores escogidos, el número de fragmentos arrojado por cada uno de ellos, y el tamaño de los fragmentos amplificados.

Con la utilización de estos marcadores RAPD, se obtuvo un total de 66 fragmentos de amplificación reproducibles, con tamaños entre 350 y 3000 pb, de los cuales 41 fragmentos (62,55 %) fueron polimórficos. El menor número de fragmentos polimórficos lo aportaron los cebadores OPBA13 y OPBA10 (9 cada uno), y el mayor número de fragmentos polimórficos se obtuvo con el cebador OPAN17 (12 fragmentos). Los valores de variabilidad genética arrojados por la amplificación de las secuencias RAPD en los siete sitios de muestreo, se pueden observar en la Tabla 7.

Entre el total de bandas amplificadas, solo se encontró un alelo privado para los sitios de muestreo localizados aguas arriba del embalse Peñol-Guatapé (estación de muestreo Antes Peñol). Así mismo y también reseñado en la Tabla 7, aparece el número de bandas comunes localmente con una frecuencia menor o igual al 50 %, para cada población. En las figuras 7-9 se pueden observar algunos de los geles de los amplificados obtenidos de secuencias RAPD en geles de agarosa.

Distribución de la variabilidad genética: Cuando se evaluaron todos los sitios de muestreo de las cuencas de los ríos Nare y Guatapé en conjunto, el análisis de varianza molecular AMOVA arrojó que el 30 % de la variabilidad se atribuyó a diferencias entre los sitios de muestreo, y que el 70 % restante de la variabilidad se debía a diferencias dentro de los sitios de muestreo. Sin embargo, cuando se realizó un análisis de varianza molecular solo para los sitios de la cuenca del río Nare, se encontró que solo el 16 % de la variabilidad se explicaba por diferencias entre los sitios de muestreo, y que el resto (84%) de la variabilidad era explicada por diferencias dentro de sitios.

Los estimados de diferenciación genética (Φ_{ST}) obtenidos en el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) mostraron que para los sitios de muestreo de las dos cuencas se presentó estructuración genética en las poblaciones, debido a que el valor de Φ entre poblaciones (Φ_{ST}) obtenido fue de 0,297 (g.l.=194; $p < 0,001$). De acuerdo con Excoffier *et al.* (1992), los valores de Φ se pueden interpretar como análogos del índice de fijación F_{ST} descrito por Wright (1978), por lo que se puede concluir que el nivel de estructuración genética obtenido con estos marcadores RAPD para las poblaciones evaluadas se sitúa en un nivel muy alto. Similarmente, al analizar solo las poblaciones de la cuenca del río Nare (estaciones 1 a 5) se halló un valor Φ_{ST} de 0.163 (g.l.=133; $p < 0.001$). Este valor, con relación a lo planteado por Excoffier *et al.* (1992), se sitúa en un rango medio-alto de estructuración genética.

Distancia genética entre poblaciones

En la Tabla 8 aparecen la matriz de distancias genéticas de Nei (1978) (debajo de la diagonal) y la matriz de identidades (sobre la diagonal). En la comparación por pares de poblaciones, cuando se evaluaron las dos cuencas muestreadas (río Nare y río Guatapé) se encontró que para la especie bajo estudio (*Brycon henni*), la menor distancia genética observada entre poblaciones fue de 0.032 (Quebrada San Lorenzo y el río Nare) y la mayor distancia genética hallada fue de 0.211 (entre las quebradas Santa Gertrudis y El Cardal). Así mismo, en la matriz de distancias genéticas de Nei (1978), se pudo discriminar entre ejemplares

provenientes de las dos subcuencas de donde se extrajeron (río Nare, poblaciones 1-5, vs río Guatapé, poblaciones 6-7). Además, los datos de identidad genética obtenidos con estos marcadores moleculares indican que las poblaciones de la subcuenca del río Nare son muy similares entre sí, con valores entre 0.925-0.969. El valor obtenido de identidad genética de Nei (1973) para las poblaciones de la subcuenca del río Guatapé fue de 0.911, siendo inferior a los obtenidos para las poblaciones del río Nare.

Test de Mantel: En el presente trabajo, tanto para todas las poblaciones evaluadas en las cuencas de los ríos Nare y Guatapé, así como para la cuenca del río Nare, se halló una correlación positiva significativa entre la distancia genética y la geográfica (coeficiente de correlación $R_{xy}=0.431$, $p<0.001$, ambas cuencas; $R_{xy}=0.377$, $p<0.001$, cuenca del río Nare). (Figura 10). Estos resultados sugieren que la especie estudiada presenta aislamiento por distancia, descrito inicialmente por Wright (1943) (Hartl y Clark 1997; Peakall & Smouse 2006).

En las figuras 11 y 12 se pueden observar los dendrogramas de distancias genéticas, mediante el agrupamiento del vecino más próximo (Neighbor-Joining). Para el caso de las cuencas de los ríos Nare y Guatapé, (Figura 11), se forman dos agrupaciones, diferenciando las poblaciones provenientes de ambas cuencas. En el caso de las poblaciones del río Nare (Figura 12), algunos de los sitios de muestreo se agruparon con mayor proximidad debido a valores similares de distancia genética. Con la matriz de datos también se estimó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), el cual mostró tendencias de agrupar individuos del mismo sitio de muestreo (Figura 13).

DISCUSIÓN

La caracterización genotípica de diferentes especies, así como la evaluación de su estructura poblacional mediante marcadores moleculares RAPD ha sido demostrada en múltiples estudios (Soto-Marambio 2003; Wasko *et al.* 2004; Pineda *et al.* 2007; Lopera-Barrero *et al.* 2008), lo que refleja la validez y la vigencia de esta técnica. Con respecto a la variabilidad genética, en el presente estudio se halló un nivel de polimorfismo promedio cercano al 63%, y para todas las poblaciones muestreadas se hallaron valores entre 50-70%. Para la cuenca del río Nare, en las poblaciones muestreadas antes y después del embalse Peñol-Guatapé, así como en la quebrada El Nusito y el río Nare se hallaron valores cercanos al 70% (entre 65-70%). El sitio de muestreo conformado por las quebradas San Lorenzo y San José tuvo valores de polimorfismo cercanos al 60%. Para la cuenca del río Guatapé, los valores de polimorfismo obtenidos fueron menores (50-55%). De acuerdo a los anteriores datos, al analizar las poblaciones de la cuenca del río Nare, se determinó similaridad genética entre dichos sitios, lo cual está evidenciado por el número similar de loci y por el porcentaje similar de loci polimórficos hallados para cada uno de esos sitios. Según Moreira *et al.* (2007), una pérdida de variabilidad genética siempre es esperada cuando no hay un buen manejo genético en lotes de reproductores debido al cruzamiento de individuos emparentados, lo que consecuentemente puede aumentar el coeficiente de endogamia (Kang *et al.* 2006) y reducir el número efectivo de reproductores (Melo *et al.* 2006), afectando la variabilidad genética de una población (Povh *et al.* 2005). Cabe anotar que efectos de cuellos de botella no pudieron ser evaluados en este trabajo, pero éstos también pueden ser causantes de una reducción en la variabilidad genética de una población, además tampoco fue posible evaluar un efecto potencial de endogamia debido al carácter dominante de los marcadores moleculares usados.

Las reducciones en el número de loci polimórficos presentes en peces podrían estar correlacionadas con un bajo número de especímenes en su medio silvestre, y/o por el hecho de poblaciones que se utilizan para establecer parentales para cría (Winkler *et al.* 1999). Para la zona del oriente antioqueño, no se cuenta con información de este tipo. Sin embargo, Pineda *et al.* (2004, 2007) mostraron que la diversidad genética en poblaciones de *Brycon henni* en

diferentes sitios del departamento de Antioquia es relativamente alta y similar para todos los sitios, excepto uno de ellos, expresada tanto en número de fragmentos totales como en el número de fragmentos únicos (ríos Piedras y Humarada, estación piscícola San Carlos, 201, 209, 190 fragmentos amplificadas, respectivamente; 40, 20, 54 fragmentos únicos, respectivamente). Los valores superiores de polimorfismo genético en la estación piscícola San Carlos, posiblemente tengan relación con procesos mediados por el hombre, debido a potenciales cruzamientos entre ejemplares de sabaleta de procedencia desconocida, lo cual podría ayudar a explicar los resultados obtenidos (Pineda *et al.* 2004, 2007). Según estos mismos autores, para el establecimiento de la estación piscícola San Carlos, la cual está localizada en el área de influencia del presente proyecto, se trasladaron ejemplares de *B. henni* de ríos con mayor abundancia hacia ríos con menos presencia de dichos animales, sin tener las precauciones necesarias para la identificación correcta de los parentales en cautiverio. Por estas razones, se podrían haber hallado los valores superiores de fragmentos únicos (mayor variabilidad genética en la estación piscícola) en dicho estudio (Pineda *et al.* 2007).

Los valores de polimorfismo genético hallados en este estudio son similares a los hallados por otros autores, cuando se han usado esta misma clase de marcadores aleatorios en especies relacionadas. Wasko *et al.* (2004) encontraron valores de polimorfismo de 85% en cuatro poblaciones amazónicas de *Brycon cephalus*. Lopera-Barrero *et al.* (2008) evaluaron diferentes poblaciones de la especie relacionada *Brycon orbygnianus* en el suroeste del Brasil, hallando niveles de polimorfismo entre 54-59%. Para otras especies de peces también se han realizado dichas evaluaciones de polimorfismo con esta técnica. En tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) en el Brasil, se han hallado niveles entre 47-80 % de polimorfismo. La amplitud en los rangos obtenidos en esta especie se relaciona con el hecho de que las poblaciones con menores valores de variabilidad genética provienen de criaderos, y debido a que las tilapias han tenido introducciones en sus linajes en los sitios de cría, ya que es una especie que se adapta muy bien a los efectos del mejoramiento genético. En trabajos de ese tipo, los menores valores de polimorfismo genético están directamente relacionados con el tiempo de introducción de nuevos linajes (Vieira *et al.* 2005).

Con relación a los datos obtenidos de estructura genética con el análisis de varianza molecular (AMOVA), se encontró una gran diferenciación genética entre las poblaciones muestreadas (ambas cuencas), de acuerdo al valor de Φ_{ST} obtenido (0,297; g.l.=194; $p<0,001$). Adicionalmente, los valores de estructuración genética cuando se evaluaron solo las poblaciones de la cuenca del río Nare son relativamente altos de Φ_{ST} (0.163; g.l.=133; $p<0.001$). Estos datos pueden dar luces de lo que está sucediendo en los ecosistemas de la región de los embalses. Inicialmente, se debe tener en cuenta que la sabaleta se afecta por cambios extremos en las condiciones cualitativas del agua, con respecto al contenido de oxígeno disuelto, sólidos suspendidos, entre otros (Montoya *et al.* 2006). Dichas condiciones físico-químicas del agua podrían afectar las rutas de migración de esta especie.

Sin embargo, los movimientos de migración que realiza esta especie son migraciones laterales cauce principal-quebradas-cauce principal, y movimientos río arriba. Los movimientos de la sabaleta entre el cauce principal y tributarios pequeños, pueden considerarse como movimientos de protección, ya que se considera que se desplaza en busca de condiciones ideales del agua (temperatura, transparencia), y podrían considerarse movimientos de protección y no necesariamente de migración reproductiva (Perdomo 1978). Estas afirmaciones están de acuerdo con lo encontrado por Mancera-Rodríguez *et al.* (2008), quienes para los peces evaluados en este estudio hallaron tallas más altas (expresadas como longitud estándar) en los ríos, comparadas a las halladas para las quebradas y afluentes de caudal más bajo. Para la cuenca del río Nare los valores hallados de longitud estándar estuvieron entre 38.7 y 147.8 mm (quebrada San Lorenzo y río Nare, respectivamente). Para la cuenca del río Guatapé dichos valores estuvieron entre 107.2 y 177.8 mm (quebrada El Cardal y río Guatapé, respectivamente) (Mancera-Rodríguez *et al.* 2008).

Dentro del contexto anterior, podría esperarse que los desplazamientos de la sabaleta se realicen solo para buscar mejores condiciones de las características del agua. Esto ayudaría a explicar la estructura poblacional anteriormente descrita, lo cual también tiene sustento en el

trabajo realizado por Mancera-Rodríguez *et al.* (2008), del cual se desprendieron los muestreos para el presente trabajo. Estos autores evaluaron la presencia de *B. henni* y de las especies de peces acompañantes en las quebradas afluentes de los ríos Nare y Guatapé, encontrando una gran cantidad de individuos de pequeño tamaño en los sitios más conservados de las cuencas estudiadas. Las condiciones de dichos sitios no difirieron significativamente en cuanto a parámetros físico-químicos del agua, sin embargo se pudo apreciar que uno de los sitios con menos capturas de *B. henni* y de otras especies de peces estaba localizado a una mayor altitud sobre el nivel del mar (2094 msnm, quebrada La Compañía, San Vicente).

Los sitios en que se capturaron las mayores cantidades de ejemplares juveniles de sabaleta eran quebradas correntosas y bien oxigenadas, afluentes de los ríos Nare y Guatapé. Este hecho, se suma al problema de contaminación en algunos cauces de agua muestreados, visible y perceptible en todas las campañas de muestreo realizadas aunque no evaluada en los análisis realizados (sólidos suspendidos, coliformes totales y fecales, entre otros). Dichos factores hacen suponer que la sabaleta tiene varias clases de barreras que evita, por lo que la conformación de unidades discretas podría ser una salida para soportar dichas condiciones adversas. A esto se le puede agregar la presencia de especies exóticas y depredadoras de peces (*Micropterus salmoides*), las cuales pueden estar obligando a las poblaciones de sabaleta a replegarse en las quebradas, pudiendo realizar sus migraciones laterales y manteniendo su acervo genético como unidades discretas. Esto se apoya en el trabajo de Mancera-Rodríguez *et al.* (2008), quienes para el presente proyecto realizaron muestreos de las especies presentes de pesca acompañante. Sin embargo, las capturas de esta especie en los muestreos de este depredador exótico fueron bajas y no se encontraron en todas las estaciones de muestreo (solo un ejemplar en cada una de las estaciones Agua arriba Peñol-Guatapé, quebradas El Nusito y San Lorenzo). Hacen falta más datos de la ecología trófica de la especie bajo estudio y de los depredadores presentes para afirmar esta hipótesis.

Distancias genéticas: Es evidente la diferencia existente entre las dos cuencas muestreadas, con relación a los valores obtenidos de distancias genéticas. Los datos muestran bajos valores entre las poblaciones de la cuenca del río Nare (0.054-0.077), así como altos niveles de distancia genética en la cuenca del río Guatapé (0.144-0.210). La explicación al parecer es sencilla ya que no hay flujo genético entre ambas cuencas.

Aunque en el presente informe no se estimó de forma directa el número de migrantes entre las poblaciones evaluadas debido al carácter dominante del marcador molecular usado, para obtener el número estimado de individuos migrantes (Nm) se puede utilizar la siguiente

ecuación (Wright 1931): $F_{st} = \frac{1}{1 + 4Nm}$. A partir de esta fórmula, se puede tomar como

análogo al valor F_{st} el valor obtenido en los cálculos de estructuración genética (Φ_{ST} para las poblaciones de las dos cuencas muestreadas=0.297; Φ_{ST} cuenca del río Nare=0.163). Al despejar de la ecuación el número de migrantes, arrojó un valor bajo para todas las poblaciones en las dos cuencas bajo estudio (ríos Nare y Guatapé, 0.59), así como para el caso de la cuenca del río Nare (1), lo cual apoya los resultados obtenidos de estructuración genética, y ayuda a suponer un bajo flujo genético entre las poblaciones bajo estudio. No obstante, para confirmar estos cálculos es necesario evaluar marcadores codominantes, que además puedan hablar de los posibles efectos de la endogamia (microsatélites), así como posibles problemas tales como cuellos de botella, efecto Wahlund, deriva genética, entre otros (Frankham *et al.* 2002). Adicional a esto, para aportar nuevos datos para una discusión al respecto, pueden ser útiles métodos directos de dispersión mediante marca-recaptura, los cuales pueden proveer elementos para un uso más adecuado de estimados de estructura genética en la búsqueda de indicadores de flujo genético (Whitlock & McCauley 1999).

El test de Mantel estima la correlación existente entre dos matrices de distancia, típicamente una matriz de distancias genéticas y una matriz de distancias geográficas, con test de significancia por permutación. De acuerdo a los resultados obtenidos al correlacionar las

matrices triangulares de distancias genética y geográfica, la significancia de este test fue alta, demostrado por la correlación positiva hallada (coeficiente de correlación $R_{xy}=0.431$, $p<0.001$, ambas cuencas; $R_{xy}=0.377$, $p<0.001$, cuenca del río Nare) (Peakall *et al.* 2003), lo cual puede indicar evidencias de procesos de aislamiento por distancia en las poblaciones evaluadas. En el modelo de aislamiento por distancia de Wright (1943), la población no está subdividida en subunidades donantes o receptoras de migrantes, ni es una unidad panmíctica. Los cruzamientos al azar están limitados por la distancia, de modo que los individuos tendrán una mayor probabilidad de aparearse con vecinos que con individuos más lejanos. De este modo se pueden agrupar a los individuos en "vecindarios", áreas definidas por "individuos centrales" cuyos progenitores se pueden tratar como extraídos al azar (Wright 1943).

Este aislamiento por distancia asume la discontinuidad en las poblaciones, por diversas causas. Como un supuesto, entre las causas que pudieran crear tal discontinuidad en las poblaciones de sabaleta del presente trabajo se podrían mencionar barreras geográficas, barreras bióticas, pendientes muy altas, condiciones físico-químicas del agua muy diferentes, temperatura y altura sobre el nivel del mar, entre otras. Esto puede ser fácil de entender, si se tiene en cuenta la amplia distribución de la sabaleta en los andes colombianos -cuencas de los ríos Cauca, Magdalena, San Juan, Dagua, Patía y San Jorge- (Montoya *et al.* 2006). Al respecto, en los muestreos realizados en el trabajo de Mancera-Rodríguez *et al.* (2008), de los cuales se capturaron los ejemplares evaluados en el presente estudio, el menor número de individuos se colectó en las estaciones localizadas en el sitio con mayor gradiente de altitud sobre el nivel del mar (sitio de muestreo 1, aguas arriba del embalse Peñol-Guatapé, 2094 m.s.n.m., 19 capturas en dos quebradas muestreadas vs. río Nare, 694 m.s.n.m., 101 capturas; Tabla 1) (Mancera-Rodríguez *et al.* 2008).

La anterior información tiene sustento de diversos trabajos con poblaciones naturales de peces y otros vertebrados. Soto-Marambio (2003), quien evaluó parámetros morfométricos y genéticos en *Bufo spinulosus*, confirmó la diferenciación entre las poblaciones bajo un modelo

de aislamiento por distancia. Este autor evaluó las poblaciones de *Bufo spinulosus* del norte y centro del Chile, considerando las condiciones desérticas imperantes entre ellas, teniendo en cuenta datos morfométricos, genéticos y ambientales (Soto-Marambio 2003). En otro trabajo, Mulvey *et al.* (2002) realizaron test de Mantel de tres vías usando distancia genética, distancia geográfica y distancia de contaminantes entre pares de sitios. Este test se utilizó para intentar correlacionar diferencias en contaminación de sedimentos con PAH (*polycyclic aromatic hydrocarbons*; hidrocarburos policíclicos aromáticos), con la distancia genética entre las poblaciones evaluadas del pez *Fundulus heteroclitus* en diferentes sitios del estuario del río Elizabeth (Virginia, USA). El test de mantel indicó una correlación positiva pero no significativa estadísticamente ($r=0.47$; $\alpha=0.05$), entre la diferencia en contaminación de PAH en sedimentos y la distancia genética entre poblaciones de nueve sitios evaluados. No obstante, coeficientes de correlación muy bajos y no significativos estadísticamente indicaron que no existía relación entre la distancia genética y geográfica en peces capturados a una escala geográfica inferior (Mulvey *et al.* 2002).

También puede citarse el trabajo de Bay *et al.* (2008), quienes evaluaron diversidad genética y estructura genética entre regiones y arrecifes en el pez arrecifal *Acanthochromis polyacanthus*, el cual tiene amplio rango de distribución en la Gran Barrera de Coral de Australia. En este estudio se evaluaron mediante test de Mantel (1000 permutaciones), correlaciones entre matrices de distancias genéticas y geográficas de pares de poblaciones, utilizando para ello el programa GenAlEx 6 (Peakall & Smouse 2006). Los resultados de análisis para el modelo de aislamiento por distancia (Wright 1943), indicaron que se halló correlación entre distancias genéticas y geográficas solo para algunas de las áreas muestreadas (Φ_{ST} vs. km: $r =0.77$; $p =0.001$). Sin embargo, esta correlación permaneció estadísticamente significativa cuando el número de arrecifes muestreados se redujo a seis (dos de cada una de las regiones evaluadas - norte, centro y sur), para obtener un número de comparaciones similar al evaluado dentro de regiones (Φ_{ST} vs. km: $r =0.91$; $p =0.02$). En contraste, las distancias genéticas y geográficas no se correlacionaron dentro de regiones ($P > 0.05$ para todos los casos) (Bay *et al.* 2008).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los datos arrojados por el presente trabajo, para *Brycon henni* se obtuvieron estimados de variabilidad y estructura genética en los siete sitios de muestreo ubicados en las cuencas de los ríos Nare y Guatapé, utilizando la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN (RAPD).

Al analizar las poblaciones de las cuencas de los ríos Nare y Guatapé, se halló que las distancias genéticas fueron diferentes cuando se compararon ambas cuencas. Se concluye con base en el marcador molecular usado (RAPD), que ambas cuencas al parecer no han tenido mezcla de individuos por barreras geográficas existentes entre los sitios de muestreo. Esto permitiría realizar recomendaciones de manejo pesquero previas a las potenciales reintroducciones de sabaleta que se realicen en la zona.

Un hecho que no se debe desconocer es que las barreras ocasionadas por los embalses del oriente antioqueño, tienen un tiempo de establecimiento relativamente bajo. El embalse Peñol-Guatapé se creó a partir de su llenado en 1971, y el embalse San Lorenzo, solo tiene 22 años desde su llenado inicial en 1987, así como el embalse Playas (FAO 1992). Por estas razones, y debido a que los valores encontrados de variabilidad y estructura genética están de acuerdo con trabajos realizados en el mismo género de peces y en otras especies de peces y organismos relacionados evolutivamente, es posible que los fenómenos descritos en el presente trabajo se deban mayoritariamente a la distribución original de estos peces en el oriente antioqueño.

Es más probable que los estimados de variabilidad genética hallados se deban a aislamiento por distancia y no a la presencia de los embalses. Esta idea puede sustentarse con base en los aspectos biológicos de la especie. Deben tenerse en cuenta los fenómenos normales de migraciones laterales y longitudinales entre el cauce principal y los afluentes de aguas de

mejor calidad, los cuales no son necesariamente indicadores de rutas de migración. Si ese fuera el caso, probablemente se hubiera encontrado flujo genético entre algunos de los sitios de muestreo.

De acuerdo a los resultados obtenidos para los marcadores moleculares usados, al momento de capturar animales para producción de alevinos, estos se deberían manejar como lotes separados y evaluar su variabilidad genética, antes de liberarlos o mezclar las poblaciones de los parentales indiscriminadamente. De realizarse reintroducciones de esta especie para esta zona antioqueña, los resultados obtenidos con los marcadores RAPD indican que se deberían realizar repoblamientos en cada zona aislada con semilla obtenida en la misma zona o de poblaciones con una constitución genética similar, y en algunos casos más variable que la población original. Sin embargo, para realizar este tipo de reinsertaciones se debe contar con información aportada por otros marcadores moleculares, así como por estudios de comportamiento, marca y recaptura, entre otros.

Con relación al trabajo con loci microsatélites, pueden plantearse opciones para estudios posteriores. La falta de amplificaciones exitosas en este trabajo puede ser resultado del desconocimiento del genoma de esta especie, y es inherente al trabajo con este marcador, cuando no se tiene conocimiento previo del genoma de la especie y no se cuenta con cebadores específicos. Una solución podría ser diseñar cebadores específicos para *Brycon henni*, sin embargo esto conllevaría altos costos de tiempo y dinero. Otra opción puede ser evaluar regiones del DNA ribosomal, las cuales son regiones altamente conservadas en vertebrados, las cuales se han utilizado para la reconstrucción de filogenias y la identificación de poblaciones en diferentes especies.

Se sugiere evaluar técnicas que arrojen la mayor cantidad de información posible, por lo que podrían evaluarse otros marcadores moleculares que arrojen mayor cantidad de información

(AFLP, regiones específicas del genoma de vertebrados, etc.), sin necesidad de conocer el genoma de esta especie.

Las anteriores recomendaciones se convierten en temas de alta relevancia, dadas las posibilidades de interferir en la composición genética de toda una especie en el momento de realizar reintroducciones de peces sin tener en cuenta parámetros de tipo genético, morfométrico, comportamental. Lo más indicado es velar inicialmente por el óptimo manejo y recuperación de las cuencas que habitan esta y otras especies, debido a que futuros trabajos corren el riesgo de perderse al no tener en cuenta el componente de sanidad ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, H. y Gutiérrez, F. 2002. Especies hidrobiológicas continentales introducidas y trasplantadas y su distribución en Colombia. Unión Gráfica Ltda. Ministerio del Medio Ambiente. Colombia. 167p.
- Barbosa, A.C., Correa, T.C., Galzerani, F., Galetti Jr., P.M. & Hatanaka, T. 2006. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Molecular Ecology Notes* 6: 936–938.
- Bardakci, R. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol.* 25:185-196.
- Barfai, R., S. Egedi, G.H. Yue, B. Kovacs, B. Urbanyi, G. Tamas, L. Horvath & L. Orban. 2003. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture* 219:157-167.
- Barman, H.K., A. Barat, B.M. Yadav, S. Banerjee, P.K. Meher, P.V. Reddy & R.K. Jana. 2002. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. *Aquaculture* 202: 1-9.
- Bassam, D.J., Caetano-Anollés, G. & Greshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196:80-83.
- Bay, L., Caley, J., and Crozier, R. 2008. Meta-population structure in a coral reef fish demonstrated by genetic data on patterns of migration, extinction and re-colonisation. *BMC Evolutionary Biology* 8:248 URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/8/248>.
- Blouin, M.S. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* 18:503–511.
- Builes, J. y Urán, A. 1974. Estudio del ciclo sexual de la Sabaleta *Brycon henni* Eigenmann. Su comportamiento y fecundación artificial. *Actualidades Biológicas* 7(3):2-12.
- Cala, P. 1987. La ictiofauna dulceacuícola de Colombia: una visión histórica y su estado actual. *Rev Acad Colomb Cienc.* 16: 69-84.
- Cala, P. 2001. La ictiofauna epicontinental de Colombia en el contexto global neotropical y su estado actual: una revisión bibliográfica. *Dahlia* 4: 3-14.

- Carvalho-Costa, L.F., Hatanaka, T. & Galetti Jr., P.M. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Molecular Ecology Notes* 6: 818–819.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479– 491.
- FAO -Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1992. Avances en el manejo y aprovechamiento acuícola de embalses en América Latina y el Caribe. Capítulo 3. Aprovechamiento Acuícola de Embalses en Colombia. Proyecto Aquila II. FAO –Italia. Documento de Campo N°8.
- Frankham, R., Ballou, J., and Briscoe, D. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. 617 p.
- Hartl, D. L., and Clark, A.G. 1997. Principles of population genetics. Editorial Sinauer Associates Publishers.
- Hedrick, P. W. 2004. Genetics of populations. Jones and Barlett Publishers. Sudbury Massachusets.
- Holdridge, L. 1978. Ecología basada en zonas de vida. IICA. SERIE DE LIBROS Y MATERIALES EDUCATIVOS. San José, Costa Rica. 216 p.
- Jones, A.G., Ardren, W.R. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 12, 2511–2523.
- Katano, O., Hosoya, K., Iguchi, K., Yamaguchi, M., Aonuma, Y. & Kitano, S. 2003. Species diversity and abundance of freshwater fishes in irrigation ditches around rice fields. *Environmental Biology of Fishes* 66:107–121.
- Katano, O., Nakamura, T., Abe, S., Yamamoto, S. & Baba, Y. 2006. Comparison of fish communities between above- and below-dam sections of small streams; barrier effect to diadromous fishes. *Journal of Fish Biology* 68:767–782.
- Kang, J.H., Noh, J.K., Kim, J.H., Lee, J.H., Kim, H.C., Kim, K.K., 2006. Genetic Relationship Between Broodstocks of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) Using Microsatellite Markers. *Aquac. Res.* 37(7):701-707.
- Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Povh, J.A., Gomes, P.C., Vargas, L., & Streit Jr., D.P. 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers. *Journal Animal Science* 84:170.

- Lopera-Barrero, N., Ribeiro, R., Sirol, R., Povh, J., Gomes, P., Vargas, L., Mangolin, C. 2008. Variabilidad genética de lotes de *Brycon orbignyanus* utilizados en programas de repoblamiento: manejo y conservación. *Acta Biol. Colomb.* 13(1): 107 – 118.
- Mancera-Rodríguez, N., Hurtado, J., Arango, A., Ríos, M.I., Bermúdez, A., Ospina, J. 2008. Estudio de la biología, ecología y diversidad genética de las poblaciones naturales de sabaleta *Brycon henni* en las cuencas de los ríos Nare y Guatapé, departamento de Antioquia – Fase 1. Informe final. Corporación Autónoma Regional Rionegro - Nare – CORNARE, ISAGEN S.A. E.S.P., UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. 129 p.
- Melo, D.C., Oliveira, D.A.A., Ribeiro, L.P., Teixeira, C.S., Sousa, A.B., Coelho, E.G.A. 2006. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 58(1):87-93.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. *Genetics* 142:1061-1064
- Mojica, I. 1999. Lista preliminar de las especies de peces dulceacuícolas de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 23 (Suplemento Especial): 547-566.
- Mojica, J.I., Castellanos, C., Usma, J.S., & Álvarez, R. (eds). 2002. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La serie libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Bogotá: Instituto de Ciencias naturales, Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente.
- Montoya, A., Carrillo, L., & Olivera, M. 2006. Algunos aspectos biológicos y del manejo en cautiverio de la sabaleta *Brycon henni* Eigenmann, 1913 (Pisces: Characidae). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19(2):180-186.
- Moreira, A.A., Hilsdorf, A.W.S, Silva, J.V., Souza, D.A. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. *Pesqui Agropecu Brás.* 42(4):521-526.
- Morita, K. & Yamamoto, S. 2002. Effects of habitat fragmentation by damming on the persistence of stream-dwelling charr populations. *Conservation Biology* 16:1318–1323.
- Mulvey, M., Newman, M., Vogelbein, W., Unger, M. 2002. Genetic structure of *Fundulus heteroclitus* from PAH-contaminated and neighboring sites in the Elizabeth and York Rivers. *Aquatic Toxicology* 61:195–209.
- Nei, M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc Nat Acad Sci USA.* 70(12):3321-3323.

- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction, p. 205-247. In D.M. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable (eds). *Molecular systematics*. Sinauer Ass. Sunderland, Massachusetts, EEUU.
- Peakall, R., Ruibal, M., & Lindenmayer, D.B. 2003. Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* 57:182-1195.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1471.8286.2005.01155.x>
- Perdomo J. 1978. La sabaleta (*Brycon henni*) observaciones bioecológicas y su importancia como especie de cultivo. *Rev. Div. Pesq.* 11(1):1-46.
- Pineda, H., Pareja, D., Olivera, M. & Builes, J. 2004. Contribución a la relación taxonómica entre cuatro especies de peces de la familia Characidae mediante el Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 17: 30-37.
- Pineda, H., Arboleda, L., Echeverry A., Urcuqui, S., Pareja, D., Olivera, M., & Builes, J. 2007. Caracterización de la diversidad genética en el pez *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en Colombia central por medio de marcadores RAPD. *Rev. Biol. Trop.* 55 (3-4): 1025-1035.
- Povh, J.A., Moreira, H.L.M. Ribeiro, R.P., Prioli, A.P., Vargas, L. Blanck, D.V. 2005. Estimativa da variabilidade genética em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Sci An Sci.* 27(1):1-10.
- Rohlf, F.J. 1989. NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Exeter.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sanches, A. & Galetti Jr., P.M. 2006. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes* 6:1045–1046.
- Soto-Marambio, E.R. 2003. Variación morfológica, variación genética y estructura poblacional en poblaciones alopátricas de *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae) en Chile. Tesis de Maestría. Universidad de Chile. 94 p. URL:

http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2003/soto_e/html/index-frames.html (fecha de consulta 13 de septiembre de 2008)

- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodohl, P.A. & Ferguson, A. 1992. A simplified protocol for routine DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 40:963-965.
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza -UICN. 2003. Lista Roja de Especies en Peligro (fecha de consulta 13 de febrero de 2009) URL: <http://www.redlist.org>
- Vieira, V., Ribeiro, R., Vargas, L., Marques, H., Povh, J., & Lopera, N. 2005. Avaliação da variabilidade genética de linhagens de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) com o uso do marcador de RAPD. *Rev. Acad. Curitiba* 3(3): 41-49.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveir, C., Senhorini, J.A. & Foresti, F. 2004. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *J. Appl. Ichthyol.* 20:48–52.
- Weir, B.S., and Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Welsh, J. & M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7 213-7 218.
- Whitlock, M., and MacCauley, D. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm+1)$. *Heredity* 82:117-125.
- Williams, J.G.K., M.K. Kubelik, K.J. Licak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6 531-6 535.
- Winkler, F.M., Bartley, D., & Díaz, N.F. 1999. Genetic differences among year classes in a hatchery population of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792)) in Chile. *Aquaculture* 173: 425–433.
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16: 97-158. Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 38 : 114 -138.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.

TABLAS

Tabla 1. Estaciones de muestreo y ejemplares evaluados por estación.

Estación de muestreo	Cuenca	Sitios por Estación	Descripción de los sitios	Municipio	Coordenadas geográficas	Altitud (m.s.n.m)	N° ejemplares evaluados
Aguas arriba embalse Peñol-Guatapé	Río Nare	Q. La Magdalena	Aguas claras sin malos olores	San Vicente	6°18'13.3"N 75°14'14.8"W	2003	19
Aguas abajo Peñol-Guatapé	Río Nare	Q. Santa Gertrudis	Predominantemente pedregoso de aguas claras.	Concepción	6°19'32.3"N 75°09'50.4"W	1820	28
Aguas arriba embalse San Lorenzo	Río Nare	Q. El Nusito	Lecho pedregoso y rocas de gran tamaño	San Roque	6°26'8.3"N 75°03'7.2"W	1256	22
		Q. San Lorenzo	Rocas de gran tamaño. Aguas arriba lechos arenosos.	Alejandría	6°22'27.3"N 75°03'50.7"W	1250	32
Aguas abajo embalse San Lorenzo	Río Nare	Río Nare	Aguas claras y sin olores. Sustrato arenoso y rocoso.	San Rafael	6°24'19.4"N 74°55'10.7"W	694	33
Aguas arriba emb. Playas	Río Guatapé	Río Guatapé	Sustrato pedregoso, buena pendiente. Aguas muy claras.	San Rafael	6°16'52"N 75°06'0.6"W	1209	31
Aguas abajo e. Playas	Río Guatapé	Q. El Cardal	Sustrato arenoso-pedregoso. Aguas con olores a materia orgánica en descomposición.	San Carlos	6°16'56.4"N 74°55'37.7"W	898	30
Total individuos evaluados							195

Tabla 2. Secuencias cebadoras para ADN microsatélite evaluadas en el presente estudio.

<i>Locus</i>	Secuencia de los cebadores	Motivo de repetición	Rango de tamaño (bp)	Referencia
<i>Bh5</i>	F: CTTCCACTCATACCGGCACT R: ACATCTGGCATTAGGCATAG	(AC)13	204–220	Sanches & Galetti (2006)
<i>Bh6</i>	F: GCGTTGCGTGTGTATGTAA R: AGAGGTGTCCACAAAGTTTT	(GT)14	160–184	Sanches & Galetti (2006)
<i>Bh8</i>	F: CCATGGCTCAACACAGATAT R: TGTACGAATCCTGAAATGCT	(GAT)5	127–196	Sanches & Galetti (2006)
<i>Bh13</i>	F: AGCAATTTAAGCAAGTGAAG R: GCGTCGGAGCAGTAGTTATA	(AT)7	120–160	Sanches & Galetti (2006)
<i>Bh15</i>	F: GAGAGCATTGTCAGGATTTA R: ACTAATGACTGCTACTGCGG	(ATTT)5	130–142	Sanches & Galetti (2006)
<i>Bh16</i>	F: CCTCCAATGAAAACAGTGCG R: ACGACTTAGCCACCCACCCT	(TAA)8	141–147	Sanches & Galetti (2006)
<i>Bh17</i>	F: GTCAGCACTCAGCACATAGC R: AGAGAGCCTGAAAGTGAGTC	(GTTT)4 (GGTTT)3	152–212	Sanches & Galetti (2006)
<i>Par53</i>	F: ACGAATAACTGGCTGGCTGT R: CAGCCAATCATGGACTCAGA	(GTT)2 A(GTTT)6	164–192	Barbosa <i>et al.</i> (2006)
<i>Pcos17</i>	F: ACGGTAATGATGGGTATTTG R: CGTTGTTTAACCCTTCTCAG	(CAAA)13	158–242	Carvalho-Costa <i>et al.</i> (2006)

Tabla 3. Cebadores oligonucleótidos para RAPD evaluados en este estudio

<i>PRIMER</i>	<i>SECUENCIA</i>	<i>% G-C</i>
OPBA03	GTGCGAGAAC	60
OPBA10	GGACGTTGAG	60
OPBA13	AGGGCGAATG	60
OPBA14	TCGGGAGTGG	70
OPBA16	CCACGCATCA	60
OPBA17	TGTACCCCTG	60
OPBA20	GAGCGCTACC	70
OPAN05	GGGTGCAGTT	60
OPAN10	CTGTGTGCTC	60
OPAN11	GTCCATGCAG	60
OPAN14	AGCCGGGTAA	60
OPAN17	TCAGCACAGG	60
OPE02	GGTGCGGGAA	70
OPE07	AGATGCAGCC	60

Tabla 4. Valores promedio de los parámetros físico-químicos del agua (pH, oxígeno disuelto, % de saturación de oxígeno, conductividad y temperatura) tomados en superficie para las 7 estaciones de muestreo.

Sitio de muestreo	pH	O₂ (mg/L)	O₂ (%S)	Conductividad (μ S/cm)	Temperatura (°C)
Aguas arriba embalse Peñol-Guatapé	6,99	7,45	86	49,2	19,0
Q. Santa Gertrudis	6,85	5,1	68,3	22,2	19,7
Q. El Nusito	7,47	7,69	96,2	38,7	20,0
Q. San Lorenzo	6,97	4,60	58,2	27,9	20,5
Río Nare	7,46	4,79	60,2	61,1	23,5
Río Guatapé	7,29	8,28	105,3	32,6	21,0
Q. El Cardal	7,34	4,90	60,5	62,7	21,0

Tabla 5. Rangos de concentración obtenidos en las extracciones de ADN de las muestras, a partir de la absorbancia medida a 260 nm

Sitios de muestreo	Rangos obtenidos de absorbancia (260 nm)	Rangos de concentración (ng/ul)
Aguas arriba embalse Peñol-Guatapé	0,021-0,104	105-520
Q. Sta. Gertrudis	0,012-0,086	60-430
Q. El Nusito	0,012-0,239	60-195
Q. San Lorenzo	0,011-0,176	50-880
Río Nare	0,013-0,183	60-195
Río Guatapé	0,016-0,212	80-160
Q. El Cardal	0,013-0,178	60-890

Tabla 6. Cebadores para RAPD que amplificaron en todas las poblaciones evaluadas.

Cebador (<i>primer</i>)	N° loci amplificados	N° loci polimórficos / <i>primer</i>	Rango de tamaño (pb)
OPBA 13	14	9	350-3000
OPBA 10	15	9	450-2500
OPE 07	18	11	450-2500
OPAN 17	19	12	350-2500
Total	66	41	

Tabla 7. Variabilidad genética hallada con los marcadores RAPD utilizados.

Sitio de muestreo (población)	Número de fragmentos obtenidos	% loci fragmentos polimórficos	N° bandas privadas	N° bandas comunes
Aguas arriba emb. Peñol-Guatapé	59	69,70%	1	6
Santa Gertrudis	57	69,70%	0	5
El Nusito	54	68,18%	0	3
San Lorenzo	56	59,09%	0	2
Río Nare	56	65,15%	0	2
Río Guatapé	52	56,06%	0	3
El Cardal	51	50,00%	0	4

Tabla 8. Matriz de distancias genéticas (bajo la diagonal) e identidades genéticas (sobre la diagonal) de Nei (1978), para las 7 poblaciones bajo estudio.

Población	1	2	3	4	5	6	7
Antes Peñol	---	0,945	0,925	0,948	0,944	0,866	0,811
Santa Gertrudis	0,057	---	0,963	0,965	0,941	0,881	0,810
El Nusito	0,077	0,038	---	0,956	0,944	0,920	0,852
San Lorenzo	0,054	0,036	0,045	---	0,969	0,898	0,853
Río Nare	0,057	0,061	0,058	0,032	---	0,901	0,874
Río Guatapé	0,144	0,127	0,083	0,107	0,104	---	0,911
El Cardal	0,210	0,211	0,161	0,159	0,135	0,093	---

FIGURAS

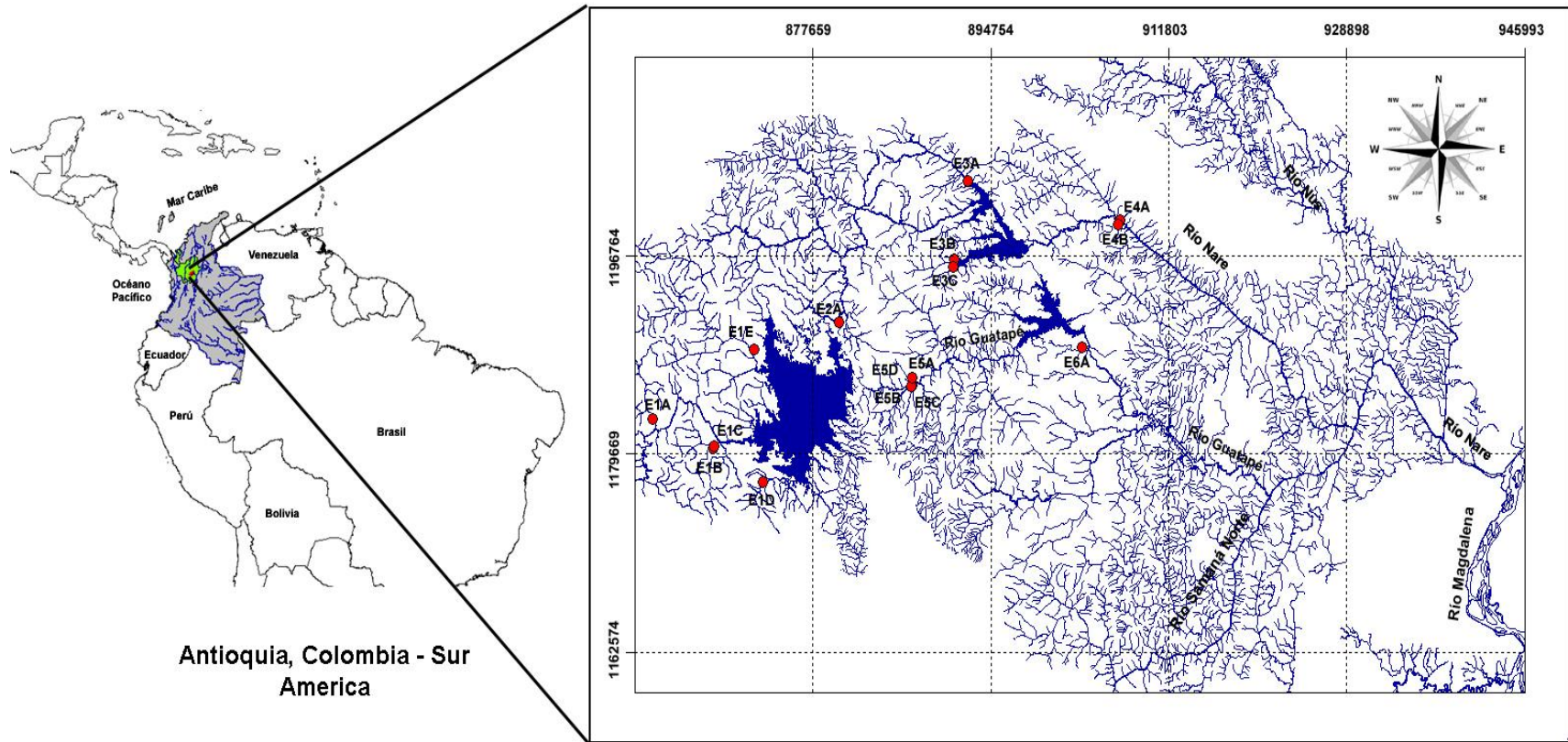


Figura 1. Ubicación de las estaciones de muestreo con respecto a Colombia y Antioquia. (E1C: Quebrada La Compañía; E1E: Q. La Magdalena; E2A: Q. Santa Gertrudis; E3A: Q. El Nucito; E3B/C: Q. San José/San Lorenzo; E4A: Río Nare; E5A: Río Guatapé; E6A: Q. El Cardal).

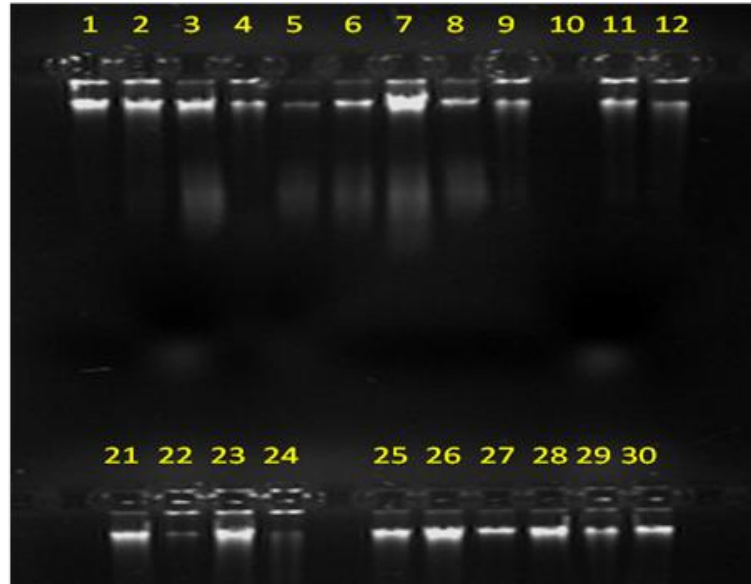


Figura 2. Gel de agarosa (0.8%) teñido con EtBr para verificar calidad de extracción de ADN de *B. henni*. Pozos 1-12: individuos sitio Antes embalse Peñol-Guatapé; 21-30: individuos quebrada Santa Gertrudis.

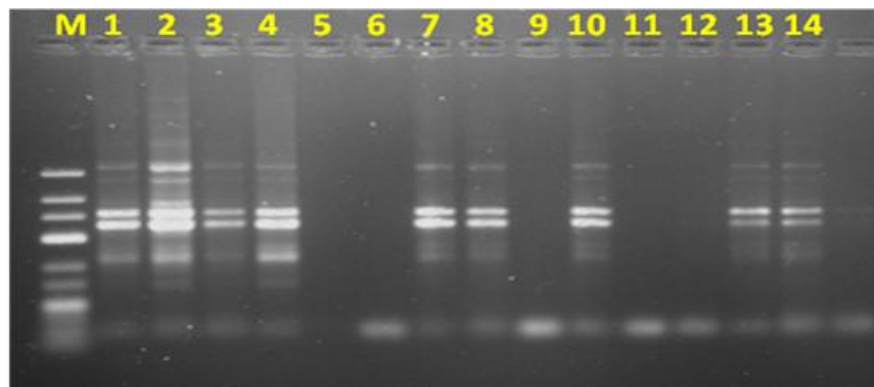


Figura 3. Amplificaciones inespecíficas y monomórficas de secuencias microsatélite para el cebador *Bh5*. Muestras 1-15 (Aguas arriba embalse Peñol-Guatapé). La primera columna corresponde al marcador de peso molecular (700 pb).

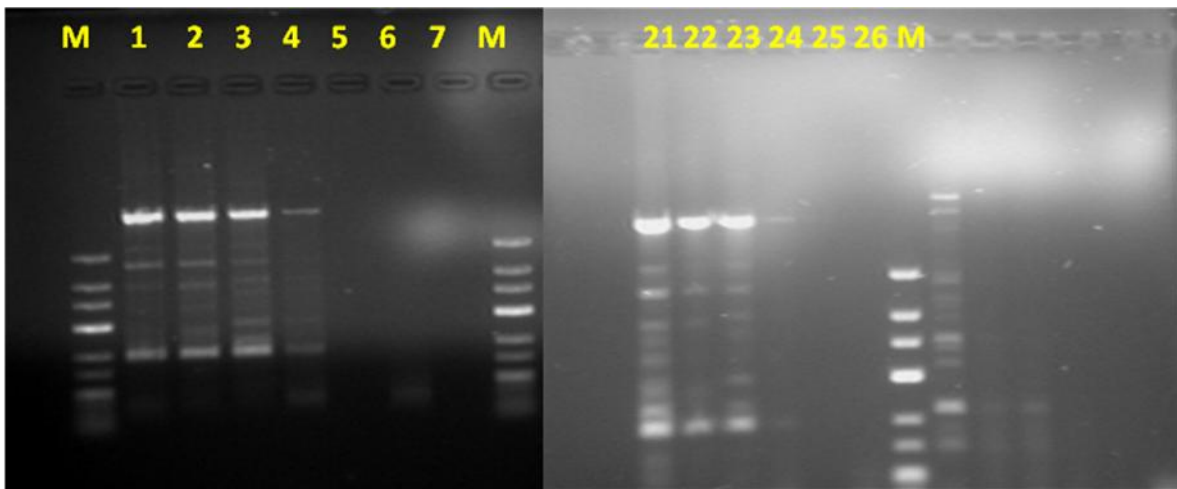


Figura 4. Amplificación inespecífica y monomórfica obtenida con el cebador *Bh6*. Se observan bandas con un peso aproximado de 1000 pb (5 veces lo esperado; 1-7 muestras sitio antes Peñol-Guatapé; 21-26 muestras Santa Gertrudis; M: marcador de peso molecular 700 pb.)

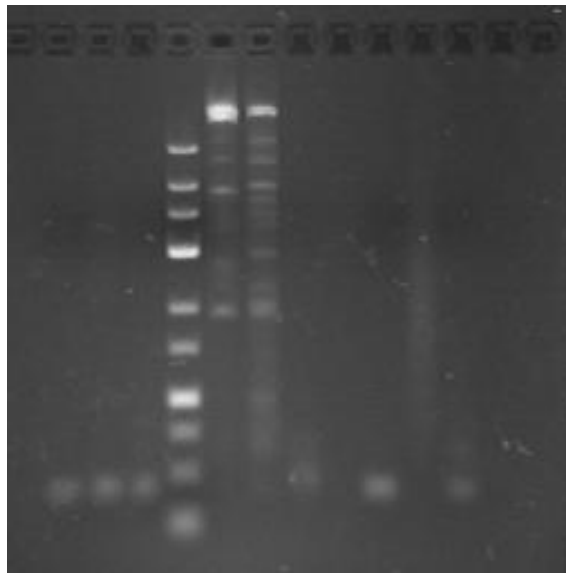


Figura 5. *Primer Pcos17*, para el cual sólo se pudo hallar una señal de muchas bandas monomórficas y de un tamaño 2-3 veces lo esperado en Characiformes (aproximadamente 1000 pares de bases – 1kb).

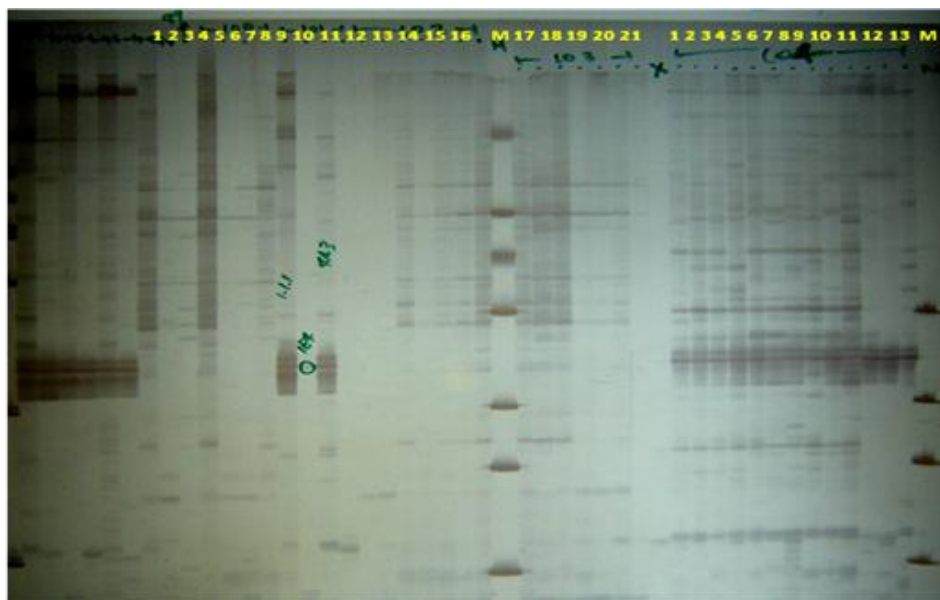


Figura 6. Gel de poliacrilamida 6%, teñido con nitrato de plata. Cada columna es un individuo. Izq., *Bh6*, muestras 1-21; Der., *Bh5*, muestras 1-13. M: marcador de peso molecular 700 pb. (en el medio y a la derecha de la imagen)

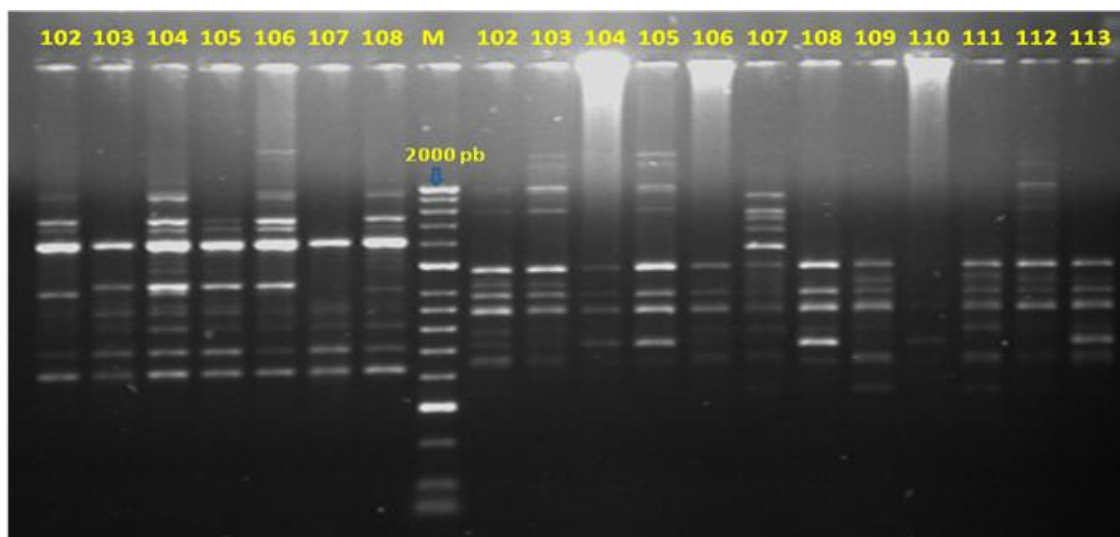


Figura 7. Amplificación de RAPD con los cebadores OPBA10 (muestras 102-108) y OPBA13 (muestras 102-113). M: marcador de peso molecular (100-200 pb).

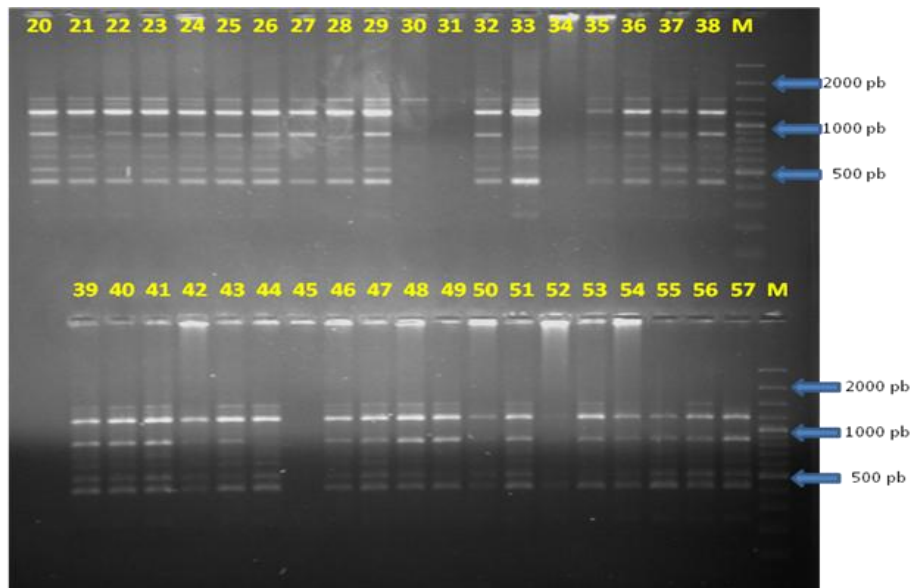


Figura 8. Amplificación de RAPD con el cebador OPBA10 en las muestras 20-47 (Sta Gertrudis); 47-57 (El Nusito). Derecha arriba y abajo: M: marcador de peso molecular (100-3000 pb).

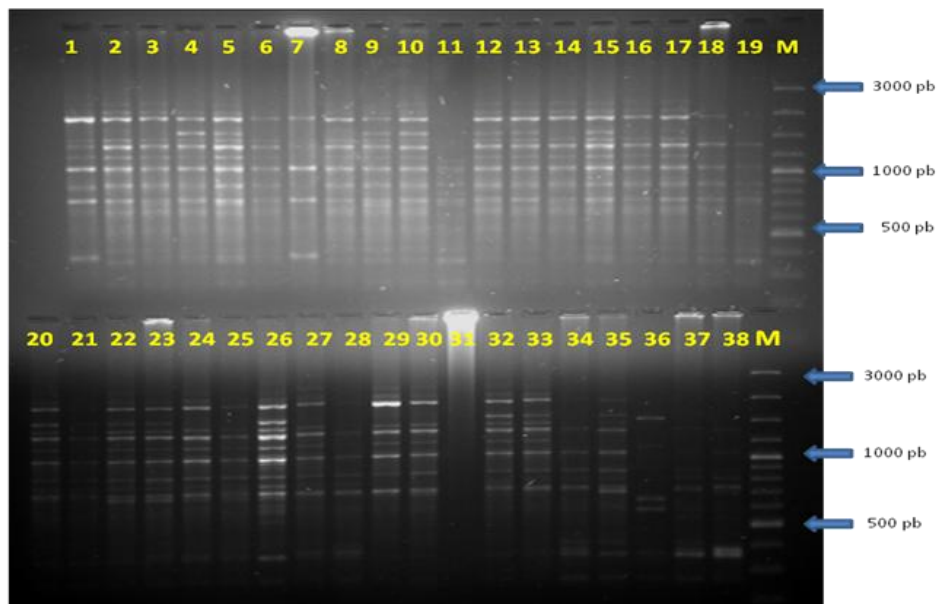


Figura 9. Amplificación de RAPD con el *primer* OPAN17 en las muestras 1-19 (Antes Peñol) y 20-38 (Santa Gertrudis). M: Marcador de peso molecular (100-3000 pb), derecha de la imagen arriba y abajo.

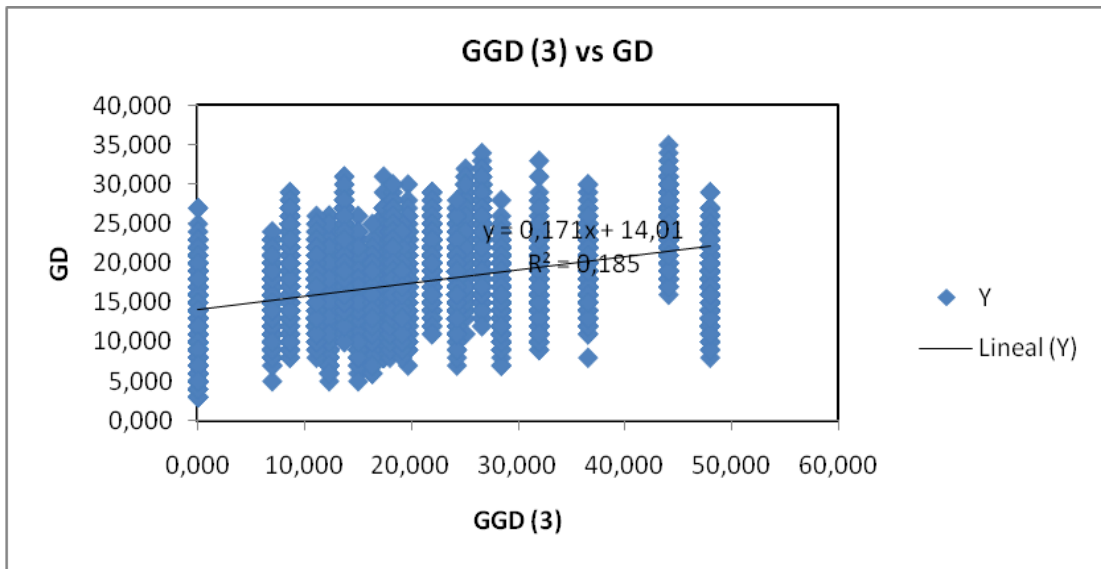


Figura 10. Modelo de regresión obtenido a partir del Test de Mantel. GGD: Distancia geográfica. GD: Distancia genética.

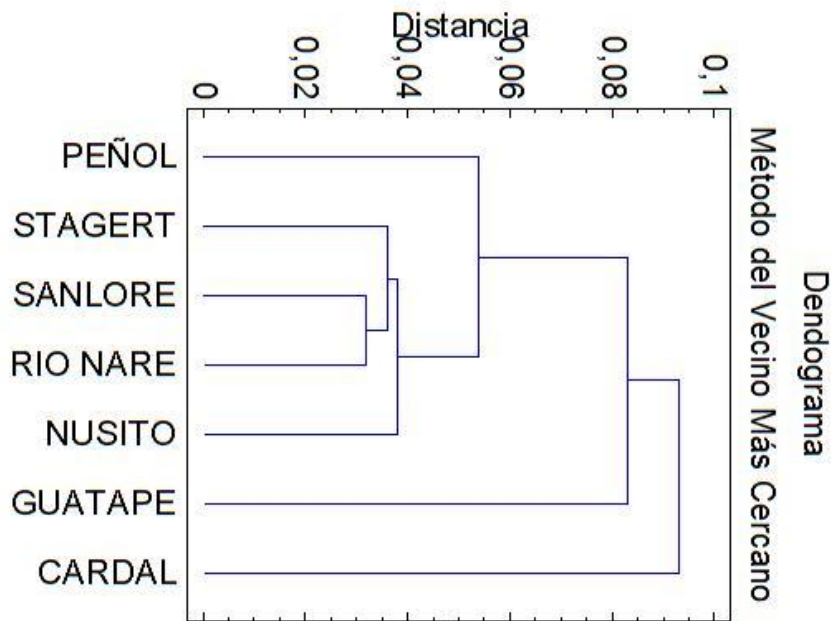


Figura 11. Dendrograma Neighbor-Joining de distancias genéticas para las poblaciones de las cuencas de los ríos Nare y Guatapé.

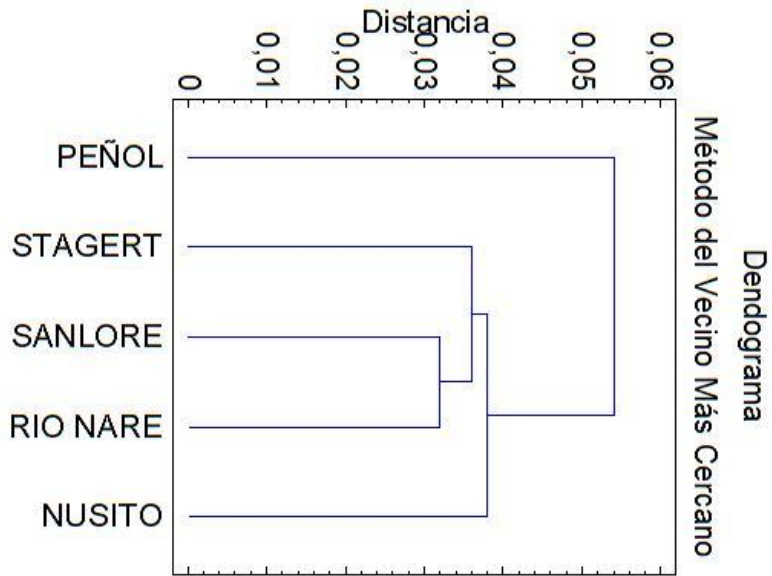


Figura 12. Dendrograma N-J de distancias genéticas para las poblaciones del río Nare.

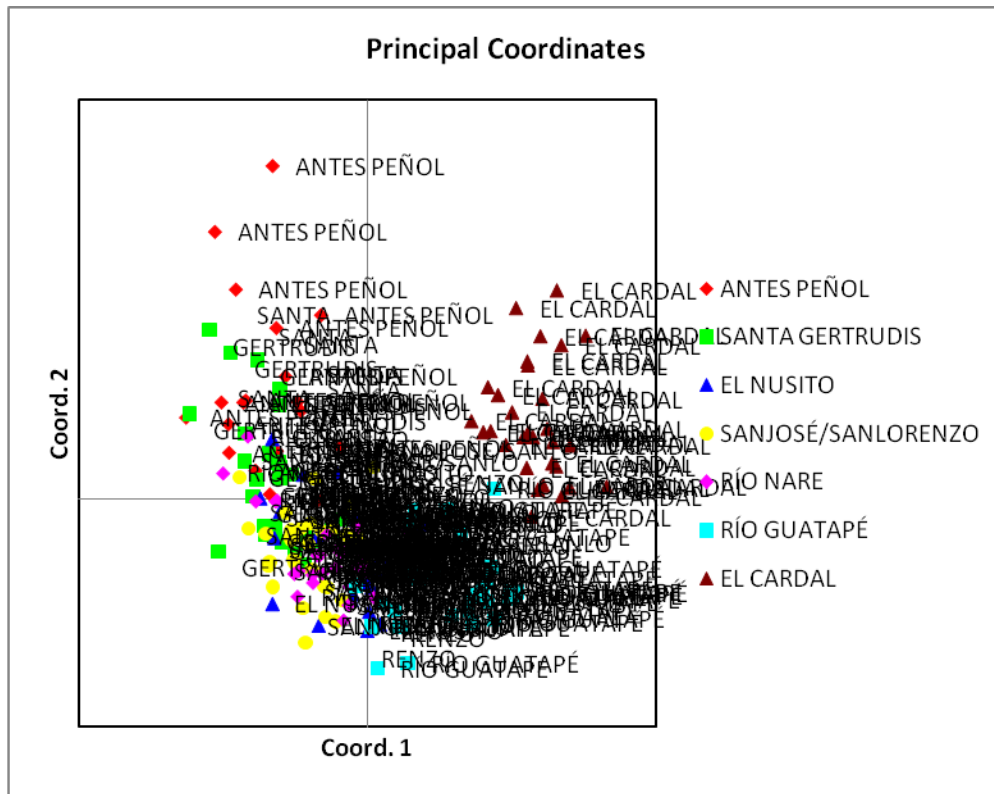


Figura 13. Análisis de Coordenadas Principales para todos los individuos y los sitios de muestreo.