

CARACTERIZACION MOLECULAR Y SANITARIA DEL BOCACHICO(*Prochilodus reticulatus*) DE LA CUENCA ALTA DEL RIO CAUCA.

JORGE NELSON LOPEZ MACIAS¹, FELIPE GARCIA VALLEJO²,EFRAIN RUBIO RINCON³.

RESUMEN.

Investigaciones anteriores realizadas por los autores sobre la caracterización sanguínea del Bocachico y su correlación con las características fisicoquímicas de la cuenca alta del Río Cauca, durante un periodo de cuatro años, detectó gran número de ejemplares afectados por patologías sanguíneas tipo: anemias micròcíticas, anemias macròcíticas, policitemias, poiquilocitosis, anisocitosis, hipocramias, leucocitosis, eosinofilia, basofilia lo que demuestra la vulnerabilidad de esta especie principalmente en el sector comprendido entre los municipios de Cali y Tulúa. (López & Rubio, 2001) Por esta razón, se realizó la caracterización molecular de las poblaciones y subpoblaciones de bocachico mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphisms, AFLP). Para este efecto, se procesó exitosamente ADN de 122 ejemplares de esta especie, de diferente talla y sexo, capturados durante un año en distintos regímenes climáticos en tres sectores equidistantes de la cuenca alta del Río Cauca en el Departamento del Valle del Cauca, denominados La Balsa, Ríofrío y La Virginia. El presente estudio determinó mediante el análisis de polimorfismo molecular de AFLP , con base en 92 loci para un tamaño muestral de 122, cinco subpoblaciones de Bocachico (*Prochilodus reticulatus*), las cuales registraron mayor heterocigosidad en la estación de captura de La Balsa. En contraste, fueron genéticamente homogéneas en las estaciones de Ríofrío 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. Igualmente, esta especie, registró 5 subpoblaciones y la mayor distancia genética entre las subpoblaciones de la Balsa 1 y Balsa 2. Igualmente, con respecto a las estaciones de muestreo, la mayor distancia genética se detectó entre las poblaciones de Bocachico existentes en La Balsa y Ríofrío (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 Ríofrío con el menor valor de 0.091. Los anteriores valores demuestran la gran vulnerabilidad del Bocachico, en la zona de estudio. Este hecho, es aún mas grave si se considera que el Bocachico (*P. reticulatus*), es la especie reofílica de mayor importancia económica en los ríos de Colombia y representó durante el período 1977 – 1988, el 85% de la producción pesquera de agua dulce (Valderrama et al, 1993).

1 MSc . ,Ph.D(C) PROFESOR TITULAR, FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS, UNIVERSIDAD DE NARIÑO.

2 Ph.D PROFESOR TITULAR, FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD, UNIVERSIDAD DEL VALLE.

3 Ph.D PROFESOR TITULAR, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DEL VALLE.

1. INTRODUCCION

La problemática ambiental del recurso hídrico en el Valle geográfico de Río del 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 y grava deteriora el hábitat de los peces, dificultando la alimentación de especies ícticas bentónicas, 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 degradación de los ambientes acuáticos en la cuenca alta del Río Cauca se ha intensificado por la pesca ilegal con dinamita y barbasco, los continuos procesos de deforestación generalizada, la ausencia de vegetación riparia, 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 riego y de lluvias. 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 los peces (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) el río recibió durante 1997 un promedio de 56 ton/día de materia orgánica en términos de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅). 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 (Corpes de Occidente, 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), el municipio de Palmira 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 escaso tratamiento de aguas residuales. La ciudad de Cali con una población estimada de 1'819.436 habitantes (DAGMA, 2000) vierte al Río Cauca aproximadamente 5.8 m³/seg. de aguas residuales y alcantarillado pluvial. La problemática es aún más crítica si se considera que el Basurero de Navarro, principal sitio de eliminación de residuos sólidos y orgánicos de la ciudad de Cali 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.

La contaminación del Río Cauca se intensifica en el tramo comprendido entre los municipios de Cali y Tulúa debido a los principales ingenios azucareros e industrias localizados en esta zona. De tal manera que el Río Cauca se diferencia claramente desde el punto de vista de alteración ambiental en tres tramos. El sector comprendido

entre las estaciones Salvajina y Hormiguero presentó una carga contaminante promedia en términos de DBO₅ de 28.5 ton/día entre 1996 a 1999. El tramo ubicado entre las estaciones Hormiguero y Media Canoa fue de 157 ton/día y entre Media Canoa y La Virginia de 96.1 ton/día durante el mismo período (Universidad del Valle, 2001).

El Bocachico (*Prochilodus reticulatus Steindachner*) es la especie reofílica de mayor importancia económica de los ríos de Colombia y representó durante el período 1977 – 1988, 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 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).

Igualmente, la especie íctica de mayor importancia comercial en la cuenca alta del Río Cauca en el departamento del Valle del Cauca, es el Bocachico (*Prochilodus reticulatus*). 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 reticulatus*) 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 Guayana y la Tilapia (*Oreochromis niloticus*) especie introducida de Africa. Lo expuesto anteriormente plantea la delicada situación de vulnerabilidad del Bocachico de la cuenca alta del Río Cauca, especie distribuida en hábitats fragmentados (López & Rubio, 2001) 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).

Según García - Vallejo (2000) la evolución se ha definido como el cambio en la composición genética de las poblaciones a lo largo del tiempo. Por esta razón, es importante la investigación del genoma de los organismos como punto de partida tanto para su manipulación como para analizar el destino evolutivo de los genes de las poblaciones. El concepto de genoma incluye toda la información genética de un determinado organismo desde el punto vista no solo de su estructura física, sino del proceso de variación en el tiempo y en el conjunto de individuos que componen una especie. Actualmente, los estudios de variabilidad genética de poblaciones, se han fortalecido mediante la aplicación de distintas técnicas moleculares y uno de los métodos más sensibles es el análisis de patrones de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP).

La presente investigación, se desarrolló con el objetivo de caracterizar la diversidad genética del Bocachico de la cuenca alta del río Cauca en su recorrido por el Departamento del Valle, mediante marcadores moleculares tipo AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados) y establecer la dinámica poblacional a nivel genético, que permita posteriormente implementar una estrategia efectiva de reproducción, repoblación, conservación y uso sostenible de estas especies a mediano y largo plazo. Es importante aclarar que la biodiversidad genética de los peces, no se ha analizado en Latinoamérica y esta investigación es el primer estudio que utiliza la técnica de AFLP en recursos ícticos. Para este efecto, se extrajo exitosamente ADN de 122 ejemplares de Bocachico de diferente talla y sexo, en tres estaciones de muestreo, localizadas equidistantemente a lo largo del cauce del río Cauca. La estación sur de muestreo ubicada cerca del puente sobre el río Cauca, en el corregimiento de La Balsa y cercana a la represa de Salvajina, donde el río presenta las mejores condiciones fisicoquímicas y bacteriológicas de calidad de agua (López & Rubio, 2001). La estación central de muestreo, ubicada cerca del puente sobre el río Cauca en el sector denominado Riofrío (Municipio de Tulúa), donde el agua empieza a recuperarse de la gran carga contaminante proveniente de los municipios de Cali, Palmira, Yumbo y Tulúa. La estación norte de muestreo localizada próxima al puente sobre el río Cauca en la zona de La Virginia, sitio en que se incrementa notoriamente la contaminación debido a las aguas residuales industriales y domésticas de la ciudad de Cartago y el aporte contaminante proveniente de la industria del café por medio de su tributario el Río la Vieja. Es importante destacar que en el sector de la Virginia, el Río Cauca abandona el altiplano e inicia su descenso por un terreno montañoso hacia tierras bajas (Universidad de Valle, 2001).

El presente estudio se propuso como objetivos específicos:

- Estandarizar la técnica de extracción de ADN para el Bocachico de la Cuenca Alta del río Cauca en el departamento del Valle del Cauca.
- Establecer el protocolo de AFLP y su tinción con plata para estudios moleculares del bocachico (*Prochilodus reticulatus*).
- Estimar la variabilidad genética del Bocachico de la Cuenca Alta del Río Cauca en el departamento del Valle del Cauca utilizando el marcador molecular AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCADORES MOLECULARES

Un marcador molecular es una secuencia de ADN o una proteína que pueda ser detectada fácilmente y cuya herencia pueda ser monitoreada. La variación o el polimorfismo de los marcadores moleculares se utiliza para estudios de diversidad genética. Los marcadores se pueden clasificar dependiendo de: 1) si se utiliza genoma nuclear o de un organelo, 2) si se usa ADN o proteínas, 3) si se requiere reconocer la secuencia de ADN a priori o no, 4) si se utiliza la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o no, 5) Adicionalmente, el tipo de información genética que genera cada marcador depende su fenotipo dominante o codominante y si es específico de un solo locus o es anónimo, que cubre muchos loci (Craig, 1998).

Según Ferreira & Grattapaglia (1998) los marcadores moleculares presentan las siguientes ventajas sobre los marcadores morfológicos:

- Mayor esfuerzo y planificación para construir mapas genéticos a partir de marcadores morfológicos, puesto que el número reducido de marcadores por linaje restringe la cobertura total del genoma. El limitado polimorfismo presenta en estos marcadores generalmente hace que el investigador deba recurrir a un gran número de cruzamientos para el estudio de ligamiento genético. Mientras que un gran número de loci polimórficos de marcadores moleculares cuyos alelos pueden ser estudiados en poblaciones segregantes de cruzamientos específicos, facilitan la construcción de mapas genéticos. El nivel de polimorfismos de estos marcadores es generalmente alto para cada locus estudiado, mientras que los marcadores morfológicos poseen un bajo nivel de polimorfismo.
- En general los marcadores moleculares, son neutros con relación a los efectos fenotípicos y con efecto epistático o pleiotrópico mínimo o nulo. Los marcadores morfológicos muchas veces cohíben o restringen y su control genético puede afectar, o ser afectado, por genes que controlan otros caracteres, dificultando la caracterización de los genotipos de interés.
- Los marcadores moleculares pueden ser codominantes y contener más información genética por locus que los marcadores morfológicos, los cuales en su mayoría son dominantes o recesivos (Stuber, 1992).

2.1.1 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 (Zabeau, 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 vía PCR utilizando oligonucleótidos “primers” específicamente diseñados para reconocer las secuencias en los adaptadores. En la cuarta y última, la subpoblación de fragmentos amplificados es separada en geles de alta resolución. La etapa de digestión del ADN genómico se realiza con una enzima de corte raro combinada con una enzima de corte frecuente. Las enzimas de corte raro reconoce de 6 a 8 pares de bases o una secuencia rara de bases (EcoRI, NotI) y las de corte frecuente reconoce 4 pares de bases (MseI, RsaI). Con esta digestión se generan tres clases de fragmentos distintos en cuanto a sus extremos: fragmentos grandes resultantes de la digestión por la enzima rara en ambos extremos; fragmentos pequeños resultantes del corte con la enzima frecuente en ambos extremos; fragmentos de tamaños intermedios resultantes del corte combinado de ambas enzimas, rara y frecuente (Vos et al. Op. Cit.). La siguiente etapa consiste en la incorporación de adaptadores específicos con terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con enzimas de restricción. Por ejemplo, los adaptadores EcoRI, se unen a los extremos “adhesivos” producidos por la EcoRI, mientras que los adaptadores MseI, se unen específicamente a los extremos resultantes del corte con la enzima MseI .

Los adaptadores constan de tres partes, una secuencia esencial igual para ambos (EcoRI y MseI), una secuencia específica de una de las dos enzimas de restricción y una extensión selectiva del adaptador de 1 a 3 nucleótidos adicionales en el extremo 3' (Vos et al. Op. cit). La especificidad del extremo es importante para que en este sitio se inicie la polimerización. Por consiguiente, los oligonucleótidos cebadores hidridizan únicamente con aquellos fragmentos que posean la secuencia complementaria a su secuencia arbitraria adicional, generándose una acción selectiva en la reacción de PCR, la cual amplifica específicamente la subpoblación de fragmentos.

La tercera etapa, es la amplificación por PCR, en dos fases. La primera, se denomina preamplificación, la cual se desarrolla con dos oligonucleótidos cebadores que

presentan un nucleótido selectivo. Por tanto, uno de cada cuatro bases posibles (A, C, G y T) intervienen en la producción de fragmentos amplificados. Una vez que esta presión de selección se realiza de forma independiente en cada sitio de iniciación de la PCR, el resultado es que solamente 1 de cada 16 fragmentos será amplificado (1 de cada 4 x4 bases.). Después, se diluye el amplificado y se hace una segunda ronda de amplificación con cebadores que tienen dos o tres nucleótidos selectivos (Vos et al. Op. cit.) Así, solamente 1 de cada 4096 o de cada 65536 fragmentos existentes se amplifica si se utiliza un oligonucleótido “primer” con dos o tres nucleótidos selectivos, respectivamente.

El polimorfismo de AFLP depende de la reacción entre el número de nucleótidos selectivos, los oligonucleótidos cebadores de la PCR y la complejidad del genoma. En consecuencia, para genomas primarios de microorganismos, debe ser utilizado un número menor de nucleótidos selectivos para obtener el número adecuado de bandas visibles. Por ende en genomas derivados se utiliza un mayor número de nucleótidos selectivos (Vos et al. Op. Cit.).

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 reconocida por los nucleótidos arbitrarios en los extremos 3' de los oligonucleótidos cebadores que direccionan la PCR a partir de los adaptadores. La dominancia completa de este marcador, no permite identificar heterocigotos, o sea, no es posible distinguir si la presencia de una banda en un gel es el resultado de la amplificación de uno o de los dos alelos. En principio, sin embargo, bandas procedentes de heterocigotos poseen la mitad de la intensidad de las bandas provenientes de homocigotos (tinción por fluorescencia). Si el sistema de lecturas se hace por densitometría, es posible la diferenciación entre los dos fenotipos (Ferreira & Grattapaglia Op. Cit.).

La ventaja más importante de esta tecnología con relación a las demás, es el gran número de fragmentos que se producen y revelan en un único gel. El índice de múltiplex del ensayo AFLP, es decir, el número de marcadores simultáneamente analizados en un único gel, es el más alto entre las tecnologías de marcadores. 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 el gran poder de detección de variabilidad genética, puesto que explora simultáneamente el polimorfismo de presencia y ausencia de sitios de restricción con lo que se logra 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.

De forma análoga a los marcadores RAPD, la principal limitación de los marcadores AFLP es el bajo contenido de información genética por locus. Debido a que sólo se detecta un alelo, o sea, el fragmento que se amplifica. Las demás variaciones alélicas son clasificadas conjuntamente como alelo nulo. Los marcadores AFLP son por tanto, marcadores dominantes y los datos tienen naturaleza binaria pero los genomas heterocigotos no pueden discriminarse directamente de los homocigotos.

El análisis de marcadores AFLP incluye un mayor número de etapas que el análisis de RAPD. Es necesaria una mayor cantidad de reactivos (enzimas de restricción, adaptadores y oligonucleótidos cebadores específicos) y un mayor número de equipamientos de biología molecular. El ADN necesario debe ser más puro, lo que demanda métodos de extracción más elaborados. Son necesarias etapas de digestión enzimática y de unión de adaptadores. La electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida. Es necesario algún tipo de marcación de los oligonucleótidos cebadores con radioisótopos o compuestos fluorescentes. No obstante, el equipamiento necesario para la detección de secuencias marcadas por fluorescencia es más costoso. En consecuencia, los factores mencionados anteriormente hacen a la tecnología de marcadores AFLP menos accesible que la RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1989).

La digestión parcial durante la primera etapa del AFLP puede dar como resultado serios problemas de interpretación de polimorfismo cuando un fragmento erróneamente cortado genera ausencia de una banda de tamaño menor, apareciendo un fragmento adicional de mayor tamaño. Igualmente, un ADN de baja calidad puede contener secuencias adicionales fragmentadas por otra acción diferente a la de las endonucleasas utilizadas, causando la ausencia de bandas en posiciones específicas del gel.

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 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)).

En general, 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. La consanguinidad, la deriva genética y la migración son agentes no selectivos muy importantes que afectan la estructura genética de las poblaciones de organismos acuáticos. La consanguinidad es una desviación de la panmixia, es decir del apareamiento aleatorio presente cuando los apareamientos se producen entre individuos emparentados. La consanguinidad produce un incremento de 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, 1981). Se ha descrito fenómenos de depresión por consanguinidad para diversos caracteres en la trucha arco iris (Bridges, 1973) y la carpa (Moav y Wohlfarth, 1963). 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, además, presentan fenómenos de reducción de su variabilidad genética y consanguinidad como consecuencia de la deriva genética. Todo esto es de importancia para la acuicultura pues el cultivo de cualquier organismo trae siempre consigo el manejo de grupos reducidos de individuos, es decir de las poblaciones pequeñas. El uso de un número limitado de reproductores, la selección de un pequeño número de individuos considerados superiores por algún criterio, la fundación de un "stock" a partir de un número pequeño de individuos de la población natural (efecto fundador), la reducción ocasional del número de progenitores (efecto de cuello de botella) son algunas de las razones que conducen al acuicultor a manejar una población pequeña. En el caso concreto de la acuicultura hay que tener presente que muchos organismos acuáticos como son los peces y los moluscos poseen una gran fecundidad lo que hace que se pueda obtener un gran número de individuos a partir de un número muy reducido de progenitores. Esto explica por que en el cultivo de peces y moluscos se utilizan muy pocos reproductores, por lo que el acuicultor se ve obligado a enfrentarse con los problemas genéticos generados en una población pequeña (Caicyt, 1987).

Existen dos niveles fundamentales de variabilidad o diversidad genética, la variabilidad intrapoblacional y la variabilidad interpoblacional. La variabilidad 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).

Los estudios de genética cuantitativa con organismos acuáticos son escasos, Neweirk (1980) ha efectuado una revisión de las estimas de heredabilidad en bivalvos y Gjedrem (1976) ha realizado una similar en salmónidos. Este último autor ha efectuado, una amplia revisión de los estudios de genética cuantitativa que abarca a un gran número de especies de interés para la acuicultura (Gjedrem, 1983).

Según Pérez (1996), la heredabilidad, es una propiedad no sólo de un carácter, sino también de la población y del ambiente en que viven los individuos. El valor de la heredabilidad depende de la magnitud de todos los componentes de la varianza y un cambio en cualquiera de ellos lo afectará. Todos los componentes genéticos son influenciados por las frecuencias génicas, las cuales pueden diferir de una población a otra. Las poblaciones pequeñas que han mantenido su tamaño muchos años, seguramente han fijado alelos y se espera que posean heredabilidades más bajas que poblaciones grandes. Igualmente, la varianza ambiental es dependiente de las condiciones de cultivo o su manejo. Condiciones muy variables reducen la heredabilidad, condiciones más uniformes la aumentan. Por consiguiente la h^2 se refiere no solo a una población particular, sino a unas condiciones determinadas. La h^2 para crecimiento postlarval de *Envola ziczac*, puede ser de 0.55 en ambiente controlado de laboratorio y de 0.25 en ambiente natural. Sin embargo el conocimiento de la heredabilidad permite predecir la posible respuesta a la selección. Valores de h^2 cercano a 1 como el determinado por Longwell (1975) de 0.93 para el crecimiento de postlarvas de *Crassostrea virginica*, indican que la mayor parta de la variación es debida a factores genéticos y que la respuesta a la selección será importante. Por otra parte, valores de h^2 cercanos a 0 señalan que el ambiente es el agente causal principal de la variación y que la selección no tendrá resultados positivos.

La caracterización de una cepa, población o especie comprende básicamente la determinación de las frecuencias de ocurrencia de cada alelo en un número de loci. Varia estimaciones se emplean para detectar los niveles de variación genética: la

proporción de loci polimórficos (%P), calculado como el número de loci que exhibe claramente un polimorfismo, donde la frecuencia del alelo más común es <0.99 , dividido entre el número total de loci claramente resueltos; la heterocigosidad observada en un locus (H_o), la proporción observada de individuos heterocigotos en ese locus; el número de alelos en un locus (n) y el número efectivo de alelos en un locus (n_e).

Singh & Zouros (1978) relacionaron el crecimiento con factores genéticos en ostras de la especie *C. virginica*, en la cual determinó que el peso está positivamente correlacionado con el grado de heterocigosidad de varios loci enzimáticos. Sin embargo, la correlación heterocigosidad adaptabilidad no es general (Beaumont & Zouros, 1991). Se han adelantado dos tipos de hipótesis para explicar las correlaciones entre grado de heterocigosidad y adaptabilidad. Uno señala que las variantes enzimáticas son directamente responsables de la correlación. Esto implica que los heterocigotos serían superiores a los homocigotos en determinados loci. La otra hipótesis indica que las variantes enzimáticas detectadas no son directamente responsables por el efecto de mayor crecimiento o adaptabilidad y actúan sólo como marcas de anomalías genéticas, responsables por el efecto, pero no detectadas por electroforesis. En estas anomalías se incluyen los llamados alelos nulos (variantes que no producen enzimas activas), que impiden diferenciar por electroforesis a los homocigotos para alelos activos de los heterocigotos portadores de alelos nulos; que pudieran determinar un crecimiento menor y así los homocigotos para alelos activos tendrían un tamaño promedio menor que los heterocigotos (Pérez, 1996).

Loehn & Shumway (1982) determinaron que los especímenes heterocigotos de la ostra americana (*C. virginica*) presentan un consumo menor de oxígeno que los homocigotos, lo cual indicaría una menor pérdida calórica por respiración. La interpretación fisiológica de la correlación, es que el mayor nivel de heterocigosidad, permite al individuo mantener su metabolismo basal con un menor gasto de ATP. La correlación heterocigosidad- adaptabilidad también se ha encontrado en algunas especies de peces. En la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), los organismos más heterocigotos presentan mayor crecimiento y menor consumo de oxígeno, lo que indica un metabolismo más eficiente; las hembras más heterocigotas de la misma edad presentaron huevos de mayor tamaño (Danzmann et al. 1988). Por otra parte, los peces con más loci heterocigotos sobrevivieron en número significativamente mayor a infecciones bacterianas que provocan enfermedades de las branquias, que los menos heterocigotos (Ferguson & Draushchack, 1990).

Diferentes estudios sobre variabilidad 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, pero una conexión directa entre una hemoglobina específica y una bien definida presión de selección aun no se ha demostrado en los peces. Intentos para

deducir tales conexiones se han basado en ciertas evidencias que establecen la presencia de hemoglobinas múltiples y polimorfismo de hemoglobina en peces de medios ambientes donde hay gran variación de temperatura (Sullivan, 1979); no obstante, estudios recientes de peces en la cuenca amazónica (Fyhn et al, 1979) cuestionan la significancia de la temperatura como un factor importante, responsable de la heterogeneidad de la hemoglobina. Estudios señalan mayor número de hemoglobinas en peces provenientes de ambientes termolábiles, en comparación con peces de ambientes termoestables (Sullivan, 1979). Esta explicación, adecuada para peces bajo ciertas condiciones medioambientales, es insuficiente para explicar el alto nivel de diversidad de hemoglobinas en todos los peces continentales y estuarinos. Pérez et al (1985) encontraron que el número promedio de hemoglobinas y la incidencia de polimorfismo es similar en peces tropicales y en peces extratropicales. Si las hemoglobinas múltiples son el resultado de presiones de selección, luego sus propiedades fisiológicas tienen que ser diferentes y correlacionadas con parámetros medio ambientales específicos, en donde un incremento en la temperatura del agua puede reducir la disponibilidad de oxígeno mediante el incremento de la cantidad de bacterias y plancton. La temperatura alta también disminuye la solubilidad del oxígeno, reduce la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno e incrementa los propios requerimientos de oxígeno de los peces. Los peces pueden responder a una disponibilidad de oxígeno reducida mediante estrategias comportamentales como migración a hábitats más favorables. Igualmente, pueden incrementar la tasa respiratoria, la frecuencia cardíaca, hemoglobina, la densidad de eritrocitos, mayor afinidad de la hemoglobina, mediante el cambio de los niveles intracelulares de los modificadores alostéricos o desarrollando ciertos tipos de hemoglobinas que no sean afectadas por los cambios térmicos.

Dos mecanismos fundamentales diferentes, se han sugerido para explicar la ocurrencia de un amplio polimorfismo de la proteína en poblaciones naturales: La hipótesis seleccionista, la cual sostiene que el polimorfismo es el resultado de selección natural y que la variación en las frecuencias de los genes refleja, diferentes valores de ajuste. La hipótesis neutralista, la cual plantea que el polimorfismo es el producto de la interacción entre mutaciones neutrales y deriva genética. De acuerdo a la última hipótesis las variaciones genéticas pueden ser funcionalmente equivalentes (Pérez et al, 1985). Se han reportado cuatro tipos de evidencias que apoyan la hipótesis seleccionista y demuestran que las hemoglobinas múltiples han sido fijadas por selección:

- Polimorfismo más alto en los peces que viven en medio ambientes variables (Fyhn et al, 1979).
- Correlación entre multiplicidad y nivel de actividad en peces.
- Cambio en la concentración de fracciones específicas de la hemoglobina durante el proceso termoclimático.

En un estudio de un polimorfismo de la enzima octopina deshidrogenasa en la vieira *Euvola ziczac* descrito por Coronado et al. (1991), Pérez et al (1994) aislaron varias isoenzimas y realizaron un estudio cinético de la enzima, cuyos resultados señalan una mayor afinidad por uno de los sustratos: piruvato en los individuos heterocigotos, lo que probablemente refleja una estrategia adaptativa relacionada con la conducta de escape de estos pectínidos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la investigación realizada por el autor, 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, se detectó un alto porcentaje de patologías referentes a anemias microcíticas, anemias macrocíticas, policitemias, poiquilocitosis, anisocitosis, hipocromias, leucocitosis, eosinofilia, basofilia que implica el estado de vulnerabilidad de las poblaciones de esta especie. Por esta razón, se decidió estudiar mediante el marcador molecular AFLP la estructura genética de las poblaciones de Bocachico en las 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.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MUESTREOS

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 señaladas en la introducción (Universidad de Valle, 2001). Se capturaron 450 ejemplares de diferentes tallas y sexos, estados gonadales y especies ícticas mediante varios métodos de pesca (Anexo 1).

3.2 OBTENCIÓN DEL TEJIDO BRANQUIAL

Se utilizaron como muestras un centímetro de filamento branquial derecho e izquierdo de cada uno de los peces evaluados. La muestra se obtuvo 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 la muestra, río y fecha. Igualmente se registraron los datos morfométricos 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.

3.3 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN se obtuvo de la muestra branquial, mediante el método de Ausbel et al., (1987). Con este propósito el tejido branquial se pulverizó en un tubo eppendorf con nitrógeno líquido, utilizando un punzón macerador; se adicionaron 445ul de buffer RSB 1x, el cual está compuesto por (10 mM Tris pH 7.4; 10 mM cloruro de sodio; 25mM EDTA) y 50 µl de SDS al 10%. Se agregaron 5ul de proteinasa K para una concentración de 10 ug/ml, se incubó durante 2 horas a una temperatura de 37-56 °C. Posteriormente, se adicionaron 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se continuó incubando por otras 2 horas. Luego se agregaron 45 µl 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. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se repitió el procedimiento anterior tres veces. Se trasladó la fase acusa 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 µl de 0.1SSC (citrato de sodio) y se dejó durante la noche a 4°C. Se adicionó 1 µl 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 µl 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

3.4 CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Se diluyeron los DNA genómicos extraídos previamente por el método de Ausbel hasta obtener una concentración de 100 ng/µl de acuerdo con cuantificaciones electroforética empleando DNA estándar de concentración conocida (Anexo 2).

3.5 DIGESTIÓN DE ADN

El control se comparó con la muestra empleando los reactivos y cantidades registradas en la tabla 3.

Tabla 3. Reactivos y cantidades de digestión de ADN

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

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 μ l de cada muestra digerida y se mezclaron con 2 μ l 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 μ l 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 μ g/ μ l, después se decoloró en agua por 10 minutos, se tomó la fotografía respectiva y se registraron los resultados.

3.6 LIGACIÓN DE ADAPTADORES

Al último paso de la reacción de restricción, se le adicionaron 12 μ l de solución de ligación de adaptadores y 0.5 μ l 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 \pm 2°C durante dos horas. Luego se realizó una dilución 1:10 de la mezcla de ligación se tomaron 10 μ l de reacción y se adicionaron

90µl 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.

3.7 REACCIÓN DE PREAMPLIFICACIÓN

Se adicionaron a un tubo de PCR de pared delgada de 0.5 ml los siguientes reactivos: 2.5µl de ADN plantilla diluido; 20µl de mezcla de primer de pre-amplificación; 2.5µl de buffer 10x PCR para AFLP; 0.5µl de taq ADN polimerasa (1 U/µl) para un volumen final de 25.5µl. Se mezclaron bien y se centrifugaron brevemente para coleccionar 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 47µl de buffer TE en un tubo eppendorf de 1.5ml. Se almacenaron las soluciones diluidas y concentradas a -20°C.

Finalmente, se efectuó una electroforesis según el protocolo de Sambrook et al., (1995). Para esto, se preparó un gel de agarosa al 1% con una concentración de bromuro de etidio de 0.5 ug/ml; 1µl volumen buffer carga; un voltaje de 75 voltios y se utilizó 5µl 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.

3.8 AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Se efectuó una dilución 1/50 de la muestra, luego se tomó 3µl de muestra y 147 µl de buffer TE y se almacenaron soluciones diluidas y concentradas a - 20 °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 y para genomas grandes se deben utilizar primers con mayor proporción de G/C. Por esta razón, se seleccionaron los siguientes oligonucleótidos primers (tabla 4).

Tabla 4. 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

La selección de cebadores más polimórficos se realizó según el número total de bandas amplificadas y el criterio de Lynch y 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 límites no son significativamente polimórficas.

3.8.1 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 μ l del primer EcoRI seleccionado y se adicionaron 32 μ l de buffer TE, para un volumen final de 50 μ l. Se almacenó a -20°C . Posteriormente, se efectuó la preparación de las mezclas 1 y 2.

3.8.2 Preparación de la mezcla 1

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

3.8.3 Preparación de la mezcla 2

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

3.9 REACCIÓN DE PCR PARA AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Se adicionaron a un tubo de PCR de pared delgada de 0.2ml, los siguientes reactivos: 5µl de ADN plantilla (dilución 1:50 RX de pre-amplificación); 5µl de mezcla 1 (primers dNTPs); 10µl de Mezcla 2 (Taq polimerasa/buffer) para un volumen total de 20µl. Se mezclaron bien y se centrifugaron brevemente en una microcentrífuga marca eppendorf modelo 5415C para colectar la reacción. Posteriormente, se realizaron los ciclos correspondientes en un termociclador Perkin Elmer serie P17101 según lo establecido en la tabla 5.

Tabla 5. 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

3.10 PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

Se utilizó una cámara de electroforesis marca BRL de 42cm por 39cm, 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 (3 uL 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 ul 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 ul 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 ul de muestra: y 2.5 ul de buffer de secuencia (xilencianol 0.05%, azul de bromofenol 0.05%, formamida al 95% y EDTA 10mM). 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.

Posteriormente, el gel se colocó en ácido acético durante 20 minutos, luego se lavó en agua destilada 3 veces. Se impregnó con nitrato de plata en una proporción de 1g/l con el propósito de visualizar las bandas por tinción de plata. Se reveló el gel con carbonato de sodio Na_2O_3 durante 15 minutos, se seca al medio ambiente y se procedió a hacer la lectura de las bandas, mediante una lámpara de luz opaca. Posteriormente se levantaron las matrices correspondientes, se toma las fotografías y efectuaron los análisis estadísticos respectivos.

3.11 LECTURA DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida se observaron en un trasiluminador de luz blanca para realizar el conteo de bandas. La lectura de bandas se realizó 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 presentaba una banda determinada. Para la lectura de los geles se consideraron los siguientes criterios: solamente se contaron las bandas que presentaron buena visualización. No se tuvo en cuenta la intensidad de las bandas. Todos los geles fueron leídos por la misma persona con el fin de disminuir el error de criterio. Las bandas gruesas se registraron como una sola banda, sin importar que su grosor fuera de tamaño de dos o tres bandas delgadas. Además, se incorporaron las recomendaciones formuladas por Lynch y Milligan (1994) referentes a que los alelos de diferente loci no presentan comigración a la misma posición. Cada locus se trata como un sistema de dos alelos. El alelo nulo siempre faltará en la amplificación y por consiguiente no se puede distinguir entre homocigotos y heterocigotos.

3.12 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.

3.12.1 Propósitos Taxonómicos

Se derivó una matriz de distancia (1-M) generada por el programa RAPDPLOT-FORTRAN elaborado por Bill Black (1996) que estima la fracción de emparejamientos (M) mediante la formula:

$$M = N_{AB} / N_T \quad (8)$$

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. Apóstol et al (1993) obtuvo 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) elaborado por Joseph Felsenstein (2001), 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 gracias al programa TREEVIEM elaborado por Page (1996).

3.12.2 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)

$$D = \ln I \quad (9)$$

De donde $I = \hat{j}_{XY} / \sqrt{\hat{j}_X \hat{j}_Y}$ en donde \hat{j}_X , \hat{j}_Y y \hat{j}_{XY} son las medias estimadas de las poblaciones X y Y en todos los loci. Los valores fueron corregidos por el factor de Lynch y 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 gracias al programa TREEVIEM elaborado por Page (1996).

3.12.3 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 (1951), Theta de Weir & Cockerham (1994) y Lynch & Milligan (1994). La tasa de migración por generación (Nm) entre poblaciones fue estimada de F_{ST} a partir de la fórmula:

$$Nm = (1-F_{ST})/4 F_{ST} \quad (10)$$

Asumiendo un modelo de islas de migración entre poblaciones.

Los cálculos fueron realizados utilizando el programa RAPDFST-FORTRAN elaborado por Bill Black (1997). 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.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 ANÁLISIS MOLECULAR CON AFLP DE POBLACIONES DE BOCACHICO EN TRES SECTORES DE LA CUENCA ALTA DEL RÍO CAUCA EN EL DEPARTAMENTO DEL VALLE DEL CAUCA

4.1.1 Poblaciones y Subpoblaciones

El análisis de polimorfismo molecular de AFLP , con base en 92 loci para un tamaño muestral de 122, mostró cinco subpoblaciones (Figura 6). 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 (Figura 7).

Al computar las distancias de Nei (Figura 8 y Tabla 6), 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 6). 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 6).

4.1.1.2 Heterocigosidad media esperada

Los patrones de bandas AFLP, revelaron polimorfismo genético entre estaciones (Tabla 7). La heterocigosidad promedio esperada, fue mayor 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 heterocigosidad de 0.400. Los anteriores valores de heterocigosidad indican la gran heterogeneidad del Bocachico (*P reticulatus*) que existe en las estaciones de la Virginia y Riofrío, señalando la vulnerabilidad de las poblaciones de esta especie íctica nativa del Río Cauca.

4.1.1.3 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 8). 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. (1999) el Bocachico es una especie altamente afectada en cuanto a su abundancia debido fundamentalmente a la sobre-explotación, la utilización de mallas finas y a la pesca ilícita con dinamita y destrucción de su hábitat debido a que prefiere ciénagas y madre-viejas con temperatura del agua de 20-24°C y se ubica donde el sustrato es lodoso o 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.

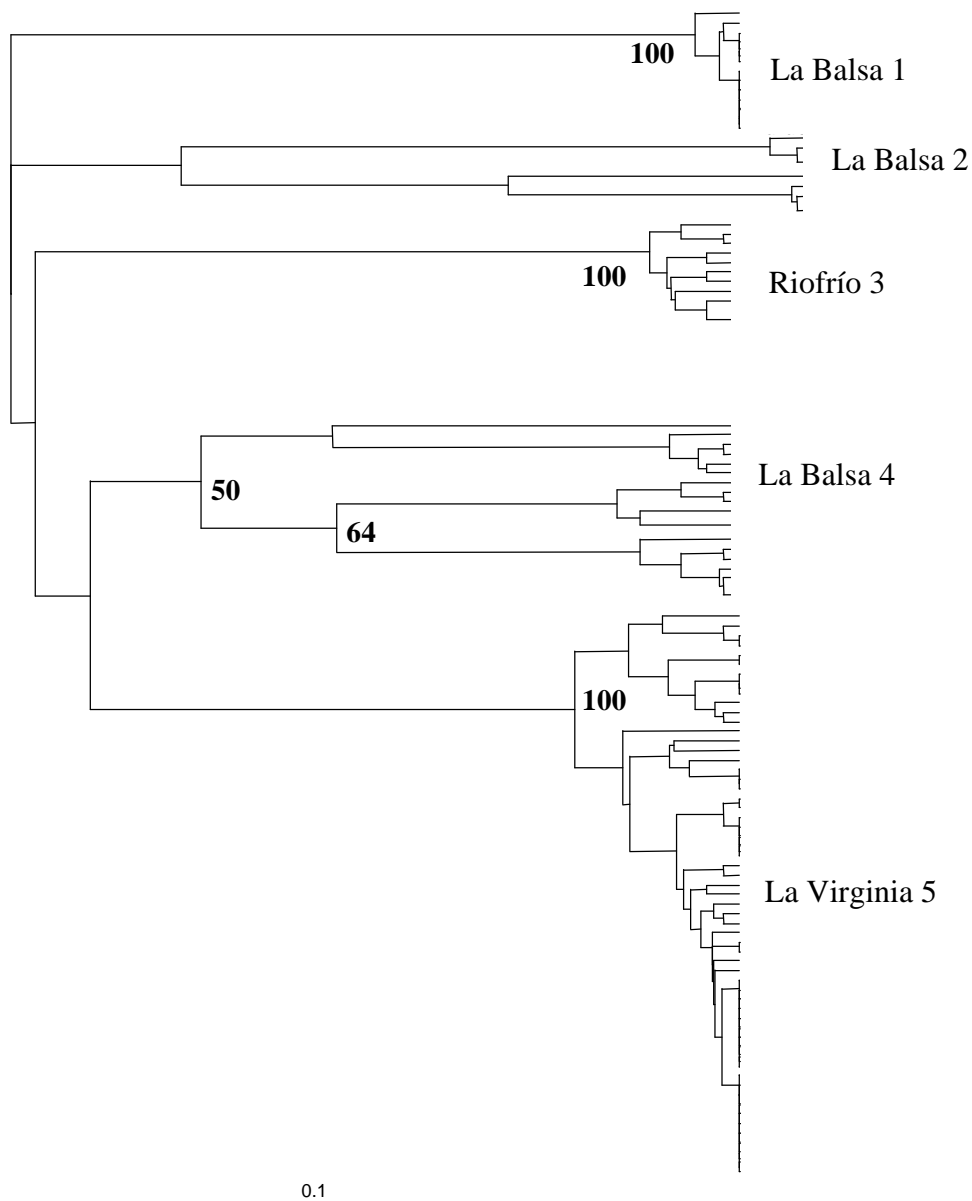


FIGURA 7. Árbol consenso de poblaciones a partir de un análisis Bootstrap de bandas de AFLP de Bocachico (*P. reticulatus*) capturados en las estaciones de La Balsa, Riofrío y La Virginia de la cuenca alta del Río Cauca – Colombia. Elaborado mediante el programa NEIGHBOR, usando el análisis NJ y una matriz de distancia S. Las cifras de las ramas significan, el porcentaje de consistencia del agrupamiento.

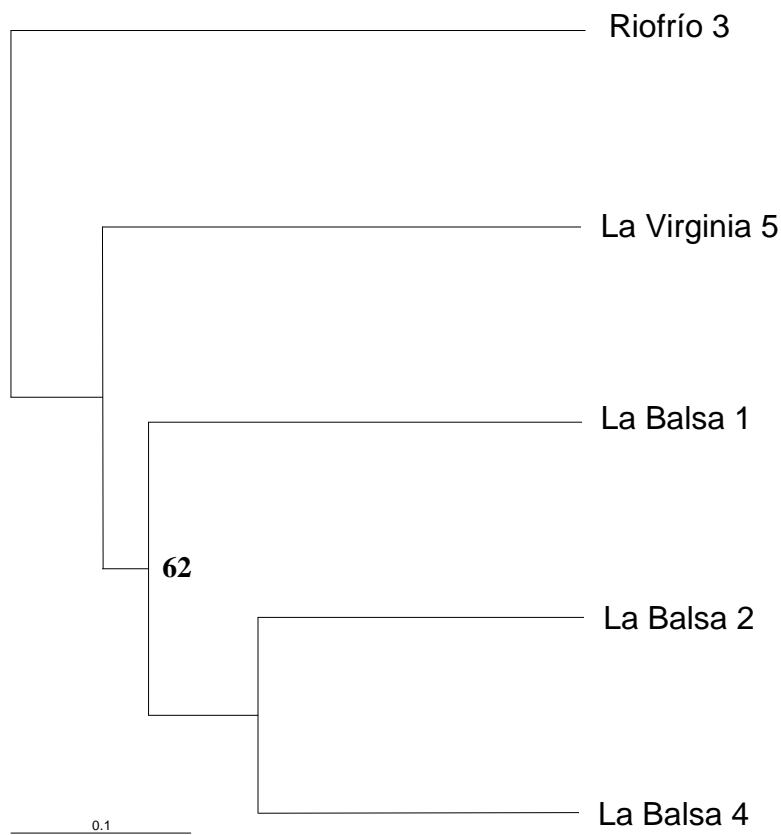


FIGURA 8. Árbol consenso de subpoblaciones a partir de un análisis bootstrap de bandas AFLP de Bocachico (*P reticulatus*) capturados en las estaciones de La Balsa, Riofrío y La Virginia de la cuenca alta del Río Cauca – Colombia. Elaborado por el programa NEIGHBOR, usando el análisis NJ y una matriz de distancia de Nei. Las cifras de las ramas significan el porcentaje de consistencia del agrupamiento

Tabla 6. 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	La Balsa 2	La Balsa 4	Riofrío 3	La Virginia 5
	n = 13	n = 9	n =20	N = 21	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 7. 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 8. 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 Comparadas	Wright's		Theta		Lynch & Milligan	
		F_{ST}	Nm	F_{ST}	Nm	F_{ST}	Nm
AFLP	La Balsa – Riofrío	0.356	0.5	0.577	0.2	0.58 4	0.2
	La Balsa – La Virginia	0.354	0.5	0.573	0.2	0.50 3	0.2
	Riofrío – La Virginia	0.602	0	0.841	0	0.85 5	0
	Todas	0.518	0.2	0.648	0.1	0.63 5	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 Spruel 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. (2000).

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.

Igualmente, David et al (2001) 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 oculocutáneo (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 y Kim et al. (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 este estudio fue suficiente para calcular la similitud genética y diversidad del Catfish de Korea.

Shikanu y Taniguchi (2002) evaluaron microsatélites y RAPD como herramientas para estimular el grado de heterosis en diferentes cruces de guppies (*Poecilia reticulata*). Evaluaron la tolerancia de salinidad medida como el tiempo de sobrevivencia después de transferir los peces de agua dulce a agua salada y fue utilizado este parámetro para estimar el grado de heterosis debido a que esta característica muestra heterosis significativa en esta especie pero es muy sensible a depresión por consanguinidad.

5. 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 referencia 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 sensibilidad del Bocachico. Este hecho, es aún mas grave si se considera que el Bocachico (*P reticulatus*), es la especie reofílica de mayor importancia económica en los ríos de Colombia y representó durante el período 1977 – 1988, el 85% de la producción pesquera de agua dulce (Valderrama et al, 1993).

Los resultados del presente estudio demuestran vulnerabilidad de acuerdo a la heterocigosidad calculada del bocachico, en las siguientes especies ícticas de la cuenca alta del Río Cauca, Departamento del Valle del Cauca: Jetudo (*I longirrostris*); Viringo (*S macrurus*); Bagre sapo (*P bufonius*); Corroncho (*C fisheri*); Cucha Real (*P Gibbosus*); Capaz (*P grosskopfii*) y Bocachico (*P reticulatus*). En contraste, el Coroncoro (*H plecostomus*), especie íctica transplantada de otras cuencas hidrográficas mediante los cultivos de peces ornamentales, ha colonizado la cuenca alta del Río Cauca, específicamente en los tramos de mayor contaminación, debido a su tolerancia a bajos niveles de oxígeno del agua.

6. 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 las estaciones de Salvajina y la Balsa, debido a que son los ejemplares que presentan mayor heterocigosidad.

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

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, N., SPEARMAN, W., BURGER, C. CURRENS, K. SCHERECK, C., & LI, H., 1994. Variation in mitochondrial DNA and allozymes discriminates early and late forms of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in the Kenai and Kasilof rivers international. Symposium on genetics of sabartic fish and shellfish. 1: 84-94..

AGRESTI J.J., SEKI S., CNAANI A., POOMPUANG S., HALLERMAN EM., UMIEL N., HULATA G., GALL GAE., May b (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.

ALIAH R.S., TAKAFI M., DONG S., TEOH C.T., TANIGUCHI N. (1999) isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio*. fisheries sci 65: 235-239.

ALLENDORF, F. E., Ryman, N., Stennek, A., y Stahl, G., 1976. Genetic variation in Scandinavia brown trout (*Salmo trutta* L.): evidence of distinct sympatric populations. Hereditas, 83: 73-82.

AUSBEL, L. B., BRENT, R., KINGSTOON, R. E., MOORE, D., SMITH, J. A. 1987. Current protocols in molecular biology, Green publishing Associates and Wiley-Interscience. Harvard Medical School.

AVISE, J. C. 1989. A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. Trends Ecol. Evol. 4: 279-281.

BEGG G. A., KEENAN C. P. and SELLIN M. J. 1998. Genetic variation and stock structure of school mackerel and sopped mackerel in northern Australian waters; j. Fish Biol. 54: 543-559.

BERNARDI G. & TALLEY D. 2000. Genetic evidence for limited dispersal in the coastal California killifish, *Fundulus parvipinnis*; J. Exp, Mar. Biol. Ecol. 255: 187-199.

BERNEY, E & J., Pérez, 1971. Inheritance of múltiple hemoglobins in two species of woodrats, genus *Neotoma*. Uni Kansas. Sci. Bull 49: 35-45.

BIELAWSKI, J. y PUMO D. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of atlantic coast striped bas. Heredoty. 78: 32-40.

BINOTTI, L; GIOVENCO. S., Giardina, B, ANTONINI, E., Branori, C and GIMAN, J. 1971. Studies on the functional properties of fish haemoglobins. The origin equilibrium of the isolated haemoglobin components from trout blood. Arch Biochem. Biophys. 141: 274-280.

BLACK, W. C. IV: 1995. Statistical analysis of arbitrarily primed PCR patterns in molecular taxonomic studies. Pp. 39-55. In: Methods in Molecular Biology, Vol. 50: Species Diagnostics Protocols: PCR and Other Nucleic Acid Methods. J. P. Clapp (Ed) Humana Press Inc. Totowa, N. J.

CAGIGAS M. E., VAZQUEZ E., BLANCO G. & SANCHEZ J. A. 1999. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites and RAPD markers; Mar. Biotechnol. 1: 286-296.

CALA, P. 1987. La íctiofauna dulceacuícola de Colombia. Una visión histórica y su estado actual. Revista de La Academia Colombiana De Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 16 (62): 69 – 84.

CAVALLI-SFORZA, L. L. & A. W. F. EDWARDS. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. Evolution 21:550-570.

CHEVASSUS, B. 1983. Hybridization in fish. Aquaculture, 33: 245-262.

CIAT & SMITHSONIAN INSTITUTION, LABORATORY OF MOLECULAR SYSTEMATICS. Mayo 31 a junio 12 de 1999. Palmira, CIAT, Colombia. III Curso en técnicas de la genética molecular para el inventario y la caracterización de la biodiversidad.

CONPES, 1997. Documento marco sobre pesca y acuicultura. Departamento Nacional de Planeación de Colombia. 20 pp.

CONPES, 1997. Documento. Política para el desarrollo Rural. NDP. UDA. Pp. 16

CROOIJMANS RPMA, Bierbooms VAF, Komen J, Van Der Poel JJ, Groenen MAM (1997) Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) Anim Genet 28: 129-134.

CVC-CEID, 1983. Estudio e impacto ambiental. Proyecto de regulación del Río Cauca. Cali. 155p.

DAHL, G. 1971. Los peces del Norte de Colombia. INDERENA Bogotá: V-XVII. 391 pp.

DAVID L., RAJASEKARAN P., FANG J., LAVI U., HILLEL J. (2001) Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers. *Mol Genet Genomics*. 266: 353-362.

EDWARDS YJK., Elgar G, Clark MS, Bishop MJ (1998) The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *J mol Biol* 278: 843-854.

EXCOFFIER, L. 1992, 1993 AMOVA (Analysis of Molecular Variance) 1.55. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPACENARGEN, Brasilia D.F.

FYHN, V. & 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, D. & GAMOCL, R, 1979 Hemoglobin heterogeneity in amazonian fishes. *Camp. Biochem Physiol*. 62 A: 67-72.

GARCIA, F. 2000. Biología molecular y bacteriología en medicina. Editorial Catorce. Cali. Colombia. 336pp.

GARCIA, D. CHAR, A. & ALCIVAR, W. 1996. Molecular analysis of a RAPD marker (B₂O) reveals two microsatellites and differential mRNA in *Penacus vannamei*.

GIBCO BRL, 2001. AFLP Analysis Sistem I. AFLP Starter Primer Kit. Life Technologies. 18pp.

GJEDREM T. 1976. Possibilities for genetic improvements in salmonids. *J. Fish. Res. Board Can.*, 33: 1094-1099.

GJEDREM, T. 1983. Genetic variation in quantitative traits and selective breeding in fish and shellfish. *Aquaculture*, 33: 51-72.

GLO, K., IVANOFF, S., YOURINEN, J. PIRONEN, J. 1997. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and atlantic salmon. *Aquaculture*. 152: 55-65.

GOLD, J. RICHARDSON, R., FURMAN, C. & SUN, F. 1994. Mitochondrial DNA diversity and population structure in marine fish species from the Gulf of Mexico. *Symposium on genetics of sabartic fish and shellfish*. 1: 203-212.

GONZALEZ, D. O. N. Palacios, G. Gallego & J. Tohme. 1995. Protocolos para marcadores moleculares. Unidad de investigación en Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.

HAIK, S.M. 1998. Molecular contributions to conservation *ECOLOGY* 79: 413 – 425.

HARLEY, S. & DAVIDSON, W. 1994. Distribution of satellite DNA sequences isolated from Arctic char (*Salvelinus alpinus*). Symposium on genetics of subarctic fish and shellfish. 1: 277-283.

HERNÁNDEZ, J 1971. Aspectos sobre introducción de especies exóticas. Primer seminario de piscicultura en Colombia . Inderena. 62 pp.

HOELZEL, A.R. & DOVER, G.A. 1991. Molecular genetic ecology. Oxford university press, New York.

HOYOS, H. 2001. Estructura y composición de los peces del río Chanco en la U.M.C. El Aguila – Ansermanuevo. Departamento del Valle del Cauca. Colombia. Tesis de pregrado. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Programa Académico de Biología. 67pp.

KARP, A. & INGRAM, D.S.S. 1995. Biotechnology, biodiversity and conservation. *Biotechnology* 13: 522.

KAZIANIS, S., MORISON, D., McENTIRE, B. NAIRN, R. & BOROWSKY, R. 1996. Genetic mapping in *Xiphophorus* hybrid fish.

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 11-120.

KIMURA, M. 1991. Recent developments of the neutral theory viewed from the Wrightian tradition of theoretical population genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5969-5973.

KINCAID, H. L. 1983. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture*, 33:215-227.

KLINBUNGA S., AMPAYUP P., TASSANAKAJON A., JARAYABHAND P. & YOOSUKH W. 2000. Development of species – specific markers of the tropical oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand; *Mar. Biotechnol.* 2: 476-478.

KNAPIK EW., Goodman A., Ekker M., Chevrette M., Delgado J., Neuhauss S., Shimoda N., Driever W., Fishman MC., Jacob J & HJ (1998). A microsatellite genetic linkage map for zebrafish. *Nat. Genet* 18: 338-343.

KNORR C., Cheng HH, Dodgson JB (1999). Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Anim Genet.* 30: 28-35.

KOCHER TD., Lee WJ., Sobolewska H., Penman D., Mc Andrew B. (1998). A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics.* 148: 1225-1232.

KOEHN, R. K. 1983. Biochemical genetics and adaptation in Molluscs. En *The Mollusca*, vol. 2. Environmental Biochemistry and Physiology. Academic Press.

KOEHN, R. K., y IMMERMANN, F. W. 1981. Biochemical studies of aminopeptidase polymorphism in *Mytilus edulis*. I. Dependence of enzyme activity on season, tissue, and genotype. *Biochem. Genet.*,19: 1115-1142.

LEHMANN D. Hettewer H. & TARASCHEWSKI H, 2000. RAPD-PCR investigations of systematic relationships among four species of eels (Teleostei: Anguillidae), particularly *Anguilla anguilla* and *A. rostrata*; *Mar. Biol.* 137: 195-204.

LERNER, I. M. 1954. *Genetic Homeostasis*. Dover Publications. Nueva York.

LEUNG, F. WEET, M. QUESENBERRY, R. & SHEN, X. 1994. Fingerprinting and cloning of hypervariable minisatellite repeats in salmonids. *Symposium on genetics of subarctic fish and shellfish.* 1: 258-266.

LIU Z., LI P., ARGUE B. J. & DUNHAM R. A. 1998. Inheritance of rapid markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. Furcatus*) and their F1, F2 and backcross hybrids; *anim. Genet.* 29: 58-62

LIU Z., Nichols A, Li P., Dunham RA (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.

LIU Z., Tan G., Kucuktas H., Li P., Karsi A., Yant DR., Dunham RA. (1999) High levels of conservation at microsatellite loci among Ictalurid catfish. *J Hered.* 90: 307-311.

LÓPEZ, J & RUBIO, E. Vulnerabilidad de las especies ícticas de la cuenca alta del río Cauca en el departamento del Valle del Cauca. *Zootecnia.* 6:42 – 53.

LUDWIG, J. A & J, F. REYNOLDS. 1988. *Statistical Ecology: a primer on methods and computing.* A Wiley-Interscience publication. United States of America.

LYNCH, M. & B. G. MILLIGAN. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.

MAZUERA, O 1992. La C.V.C y el desarrollo integral de la cuenca del alto Cauca. 21pp.

MENZEL, R. W. 1971. Selective breeding of oysters. Conference on Artificial Propagation of Commercially Valuable Shellfish (1969), p. 81-92.

MILES, C 1973. Estudio económico y ecológico de los peces de agua dulce del valle del Cauca. *Cespedesia* 2(5): 9 – 59.

MILLER, M.P. 1998 AMOVA – PREP 1.01. A program for the preparation of AMOVA input files from dominant-marker raw data. Department of Biological sciences, Northern Arizona university, Flagstaff, AZ.

MOAV R., Hulata G., Wohlfarth GW. (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., OSAKI A., IWAI K., SAKAMOTO F., AKUTSA T. (2001). Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. 265: 687 – 693.

NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283 – 292.

NEI, M. 1975. *Molecular population genetics and evolution* North-Holland publ. Amsterdam.

NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583 – 590.

NEI, M. & W. H. LI. 1985. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273.

NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university Press, New York.

NEWKIRK, G. F. 1980. Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. *Aquaculture*, 19: 209-228.

ORTEGA, A., MURILLO, O., PIMIENTA, M & STERLING, J. 1999. Los peces del alto Cauca. Corporación Autónoma del Valle del Cauca. 122pp.

ORTEGA, A., MURILLO, O., PIMIENTA, M & STERLING, J. 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. 83pp.

ORTEGA, A., MURILLO, O., PIMIENTA, M & STERLING, J. 2000. Peces de la cuenca alta del Río Cauca. Riqueza ictiológica del Valle Cauca. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC. 68pp.

PEREZ, J; RYLANDER, K. & NIRCHIO, M. 1985. The evolution of múltiple haemoglobins in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 5: 304-319.

PEREZ, J. Hemoglobin 1986 Polymorphism in the toadfish *Thalassphyrne maculosa*. *J. Exp. Mar Biol. Ecol.* 100: 287 – 294.

PEREZ, J. 1996. Mejoramiento genético en acuicultura. Editoria Universitaria de la Universidad de Oriente. Cumaná. Venezuela. 178 p.

PONNIAH, A. 1989. Functional relationship between biochemical genetic polymorphism and physiological variation in aquatic animals. *Fish genetics in India*. 15: 101-114.

PURDOM, C.E. 1972. Induced polyploidy in plaice (*Pleutonectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity*, 29: 1088-1093.

RYMAN, N. 1983. Patterns of didtrihution of biochemical genetic variation in salmonids: differences between species. *Aquaculture*, 33: 1-21.

REFSTIE, T. 1983. Hybrids between salmonid species. Growth rate and survival seawater. *Aquaculture*, 33: 281-285.

REFSTIE, T. Y GJEDREM, T. 1975. Hybrids between salmonidae species. Hatchability and growth rate in the fresh water period. *Aquaculture*, 33: 1-21.

SAMBROOK, J., C. R. FRITSCH & T. MANIATAS. 1989. Molecular cloning: A Laboratory manual. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.

SCHENEIDER, S. KUEFFER, J.M. ROESSLI, D. & LAURENT EXCOFFIER. 1997. Arlequin versión 1,1: A software for population genetic data analysis. Genetic and Biometry laboratory . University of Geneva Switzerland.

SHIKANOT, T.& TANIGUCHI, N. 2002. Using microsatelite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Pecilia reticulata*) asa fish. *Aquaculture*. 204: 271-281.

SKIBINSKI, D. O. F., Ahmad, M., y Beardmore, J. A. 1978. Genetic evidence for naturally occurring hybrids between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Evolution*, 32: 354-364.

SLATKIN, M. 1977. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinction. *Theoretical population Biology* 12: 253-262.

SLATKIN, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393-430.

SLETAN A., Olsaker i., Lie O. 1997. Segregation studies and linkage analysis of Atlantic salmon microsatellites using haploid genetics. *Heredity* 78: 620-627.

SPRUELL P., Pilgrim KL., Greene BA., Habicht C., Knudsen KL., Lindner KR., Olse JB., Sage GK., Seeb JE., Allendorf FW. 1999. Inheritance of nuclear DNA markers in gynogenetic haploid pink salmon. *J Hered.* 90: 289-296.

SUELTMAN, H., MAYER, W. FIGUEROA, F. & TICHY, H. 1995. Phylogenetic analysis of cichlid fishes using nuclear DNA markers.

TAGGART J. B. & FERGUSON A. 1990. Minsatellite DNA fingerprints of salmonid fishes; *Anim. Genet.* 21: 377-389.

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. 139pp.

VALDERRAMA, M., PETRERE. M, ZÁRATE, M Y VERA, G.1993. Parámetros poblacionales, (Mortalidad, rendimiento máximo sostenible) y estados de explotación del Bocachico (*Prochilodus magdalenae*) del bajo río Magdalena1:43 – 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 Research.* 23: 4407-4414.

WEIR, B. S. & C. C. COCKERHAM. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

WILSON, K., LI, Y., WHAN, V., LEHMER, S & BYRNE, K. 2001. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. *Aquaculture.* 204: 297-309.

WRIGHT, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*, Vol. 4. Variability within and among natural populations, University of Chicago Press, Chicago.

WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97-159.

YOON, J., & KIM, J. (2001). Random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction analysis of two afferent populations of cultured Korean cat fish *silurus asotus*. *J. Biosci.* 5: 641-647.