



UNAP



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE DONCELLA *Pseudoplatystoma punctifer*
(CASTELNAU, 1855) EN SIETE POBLACIONES NATURALES DE LA
AMAZONÍA PERUANA**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

JHON GREGORY ALVARADO REÁTEGUI

ASESORES:

Blgo. LUIS EXEQUIEL CAMPOS BACA, Dr.

Blga. CARMEN ROSA GARCÍA DÁVILA, Dra.

IQUITOS, PERÚ

2018

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dirección de Escuela de Formación
Profesional de Ciencias Biológicas

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 030

Iquitos, 25 de enero de 2018

En la ciudad de Iquitos, a los veinticinco días del mes de enero del 2018 y, siendo las 10.10 horas; se reunió en el auditorio de las Direcciones de Escuelas de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de la tesis que suscribe, designado con Resolución Directoral N° 063-2016-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por; Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr., (Presidente); Blga. ROSSANA CUBAS GUERRA, M.Sc., (Miembro) y Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr., (Miembro), para escuchar, examinar y calificar la sustentación de la tesis titulada: "VARIABILIDAD GENÉTICA DE DONCELLA *Pseudoplatystoma punctifer* (CASTELNAU, 1855) EN SIETE POBLACIONES NATURALES DE LA AMAZONÍA PERUANA", por el Br. JHON GREGORY ALVARADO REÁTEGUI.

La dirección de Formación Profesional de Ciencias Biológicas, mediante Resolución Directoral N° 001-2018-DEFP-B-FCB-UNAP, de fecha 11 de enero de 2018, declara expedita para SUSTENTAR LA TESIS del Br. JHON GREGORY ALVARADO REÁTEGUI, promoción 2011-II, graduado con R.R. N° 2570-2013-UNAP de fecha 21 de noviembre 2013. Se reconoce como ASESORES de la tesis a los profesionales: Blgo. LUIS EXEQUIEL CAMPOS BACA, Dr. y Blga. CARMEN ROSA GARCÍA DÁVILA, Dra.

Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño del bachiller, considerando los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el Bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dió como veredicto; APROBAR LA SUSTENTACIÓN DE TESIS, CALIFICADA COMO BUENA; quedando en consecuencia el candidato apto para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del título profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 11.30 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente acta de sustentación por septuplicado.

Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.
PRESIDENTE

Blga. ROSSANA CUBAS GUERRA, M.Sc.
MIEMBRO

Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.
MIEMBRO

Dirección: Plaza Serafín Filomeno S/N, Iquitos, Perú
Teléfono: 236121

www.unapiquitos.edu.pe
e – mail: fccbb@unapiquitos.edu.pe

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.
Presidente

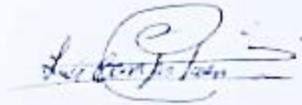


Blga. ROSSANA CUBAS GUERRA, M.Sc.
Miembro



Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.
Miembro

ASESORES



Biga. LUIS EXEQUIEL CAMPOS BACA, Dr.



Biga. CARMEN ROSA GARCÍA DÁVILA, Dra.

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD



Nombre del usuario:
Universidad Nacional de la Amazonia Peruana

ID de Comprobación:
78294034

Fecha de comprobación:
18.11.2022 14:49:57 -05

Tipo de comprobación:
Doc vs Internet

Fecha del Informe:
18.11.2022 14:55:38 -05

ID de Usuario:
Ocultado por Ajustes de Privacidad

Nombre de archivo: **TESIS RESUMEN JHON GREGORY ALVARADO REATEGUI**

Recuento de páginas: **38** Recuento de palabras: **6736** Recuento de caracteres: **43529** Tamaño de archivo: **896.00 KB** ID de archivo: **89370285**

25.2% de Coincidencias

La coincidencia más alta: **7.47%** con la fuente de Internet (<http://www.bioline.org.br/request?la05005>)

25.2% Fuentes de Internet

328

Página 40

No se llevó a cabo la búsqueda en la Biblioteca

31% de Citas

Citas

43

Página 41

No se han encontrado referencias

0% de Exclusiones

No hay exclusiones

Modifind

Modificaciones del texto detectadas. Busque más detalles en el informe en línea.

Caracteres sustituidos

2

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado especialmente a dos personas que significaron y significarán por siempre lo más valioso que pude y puedo tener en esta vida, mi padre Gregorio Florentino Alvarado Chaupes y mi madre Ana María Reátegui Angulo cuyo amor y fortaleza fue clave para poder sobrellevar las cosas buenas y complicadas de la vida.

AGRADECIMIENTO

Al instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana-IIAP, en especial al Laboratorio de Genética y Biología Molecular (LBGM) y al Programa de investigación del Agua y sus recursos (AQUAREC), por el financiamiento y la oportunidad de poder realizar la tesis de pregrado.

A la Dra. Carmen Rosa García Dávila, jefa del Laboratorio de Genética y Biología Molecular (LBGM-IIAP), por la orientación, confianza, amistad, oportunidades concedidas y por el apoyo incondicional durante toda mi estadía en el laboratorio.

A Diana Castro y Werner Chota, por el apoyo y conocimiento brindado a mi persona durante el proceso de adiestramiento en la tesis realizada en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular de IIAP

A mis amigos del Laboratorio de Biología y Genética Molecular del IIAP, Dixner, María, Carlos, Eduardo, Rosa Christian, Antonio, Hugo, David, Roxana, Lucero, Mayra y a todas aquellas personas de que de una forma u otra se involucraron para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

	Pág.
PORTADA.....	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	iii
ASESORES	iv
RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Bases Teóricas.....	3
1.1.1 Descripción Taxonómica de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	3
1.1.2 Ubicación sistemática de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	3
1.1.3 Distribución geográfica de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	5
1.1.4 Alimentación de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	6
1.2. Definición de términos.....	7
1.2.1. Marcadores Moleculares.....	7
1.2.2. Marcador molecular microsatélite.....	8
1.2.3. Aplicación de microsatélites en genética poblacional	9
CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	11
2.1. Formulación de la Hipótesis.....	11
2.2. Variables y su operacionalización.....	11
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	12

3.1. Tipo y diseño	12
3.2. Diseño muestral	12
3.3. Procedimiento y recolección de datos	12
3.3.1. Colecta del material biológico.....	12
3.3.2. Área de trabajo	13
3.3.3. Extracción del ADN de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	13
3.3.4. Concentración y pureza del ADN genómico	15
3.3.5. Verificación del ADN genómico	15
3.3.6. Amplificación de los microsatélites.....	15
3.3.7. Verificación de la amplificación de los microsatélites	16
3.3.8. Obtención y visualización del peso de los alelos microsatélites	16
3.4. Procesamiento y análisis de datos.....	17
3.4.1. Diversidad alélica por <i>locus</i> y poblaciones.....	17
3.4.2. Análisis Factorial de Correspondencia	17
3.4.3. Diferenciación genética y flujos genéticos entre poblaciones.....	17
3.4.4. Estructura genética.....	18
3.4.5. Relaciones interpopulacionales.....	19
3.4.6. Correlación entre distancia genética y distancia geográfica	19
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	20
4.1. Diversidad alélica por <i>locus</i> y por poblaciones	20
4.2. Análisis Factorial de Correspondencia.....	23
4.3. Diferenciación genética y flujos genéticos entre poblaciones	23
4.4. Estructuración genética de las poblaciones.....	26
4.5. Relaciones interpopulacionales.....	27
4.6. Correlación entre distancia genética y distancia geográfica.....	28
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	31
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	35
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES	36
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37
ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Lugares y georeferencias de las muestras colectadas de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	12
Tabla 2. Variabilidad genética multilocus de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> en siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.....	21
Tabla 3. Alelos privados (en pares de bases) y sus respectivas frecuencias (valores entre paréntesis) observados en ocho locus de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> en siete poblaciones naturales de la Amazonia peruana.....	22
Tabla 4. Índice de fijación (F_{st}) estimados a partir del análisis de ocho <i>loci</i> microsatélites para los individuos de doncella <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> provenientes de siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.....	24
Tabla 5. Número de migrantes por generación (N_m) estimado a través del análisis de ocho <i>loci</i> microsatélites para los individuos de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> provenientes de siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.....	24
Tabla 6. Distancia genética (Nei, 1978) entre siete poblaciones naturales de doncella <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> de la Amazonía peruana, estimada a través del análisis de ocho <i>loci</i> microsatélites.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Individuo de la especie <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	3
Figura 2. Distribución de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> en la Amazonía baja (círculo rojo), (adaptado de Buitrago – Suárez, 2007).....	6
Figura 3. Ubicación geográfica de los lugares de colecta de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	13
Figura 4. Proyección gráfica de los resultados del AFC para los ejes 1 y 2 obtenidos para los individuos de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> provenientes de siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.....	23
Figura 5. Distribución del genoma de cada individuo en los tres cluster inferidos (K = 3). Cada espécimen está representado por una barra vertical. La longitud del color de las barras en el eje vertical define la proporción de membresía (Q).....	27
Figura 6. Dendrograma construido a partir de las Distancias de Nei según el criterio de agrupamiento Vecino Próximo para <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> proveniente de siete poblaciones naturales de la Amazonia peruana.....	28
Figura 7. Representación gráfica del análisis de correlación lineal entre las distancias genéticas y las distancias geográficas fluviales de las poblaciones de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> en la Amazonía peruana: a) entre siete poblaciones (Nanay, madre de Dios, Ucayali, Marañón, Pastaza, Putumayo y Amazonas); b) entre seis poblaciones (sin Nanay).....	30

ÍNDICE DE ANEXOS

	Páginas
Anexo 1. Colecta, codificación y conservación de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	50
Anexo 2. Nombre del microsatélite, motivo de repetición, secuencia y rango del tamaño de los alelos de los siete marcadores microsatélites utilizados en este estudio.....	51
Anexo 3. Condiciones para la amplificación del ADN de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	52
Anexo 4. Condiciones de temperatura para la PCR	53
Anexo 5. Amplificación de marcadores microsatélites en gel de agarosa al 2%.....	53
Anexo 6. Tamaño de los alelos de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	54
Anexo 7. Número de alelos por <i>locus</i> encontrados en 203 individuos de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> analizados.....	54
Anexo 8. Heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o) e índice de endogamia (F_{is}) por <i>locus</i> en siete poblaciones naturales de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> en la Amazonía peruana.....	55
Anexo 9. Frecuencias alélicas observadas en 8 <i>locus</i> de <i>Pseudoplatytoma punctifer</i> analizados en siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.....	56
Anexo 10. Valores de ΔK como función de K. El pico con el valor máximo de ΔK corresponde al valor de K con mayor probabilidad (en este caso $K=3$).....	58

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo determinar la variabilidad genética de 203 especímenes de doncella *Pseudoplatystoma punctifer* de siete poblaciones naturales de la Amazonia peruana mediante el análisis de 8 *loci* microsatélites. Los resultados muestran una alta variabilidad genética en la especie (113 alelos encontrados, con una media de 13,14 alelos por locus). El análisis factorial de correspondencia mostró la existencia de diferenciación genética entre algunas poblaciones de esta especie, además, los resultados del índice de fijación (F_{ST}), Número de migrantes por generación (N_m) y distancia genética mostraron que las poblaciones de Madre de Dios y Nanay presentan las mayores diferencias genéticas entre ellas ($F_{ST} = 0,115$, $N_m = 1,93$; $D = 0,349$) y también con el resto de poblaciones (Madre de Dios: F_{ST} varía de $= 0,039$ a $0,057$; $N_m = 4,16$ a $6,24$; $D = 0,135$ a $0,174$; Nanay: F_{ST} varía de $= 0,060$ a $0,080$, $N_m = 2,88$ a $3,95$; $D = 0,165$ a $0,222$). Además fue observado que las poblaciones de los ríos Marañón y Ucayali no presentan estructuración genética entre ellas ($F_{ST} = 0,00$; $N_m =$ infinito; $D = 0,003$). Los resultados del análisis de estructuración genética corroboraron estos resultados, mostrando tres unidades evolutivas entre las siete poblaciones analizadas ($K = 3$). Las diferenciaciones encontradas entre estas poblaciones de peces podrían estar relacionadas al aislamiento por distancia geográfica en el caso de Madre de Dios o al aislamiento por la diferencia en el tipo de agua en el caso del Nanay.

Palabras claves: Variabilidad genética, marcadores moleculares microsatélites, diferenciación genética.

ABSTRACT

This study aimed to determine the genetic variability of 203 specimens of doncella *Pseudoplatystoma punctifer* from seven natural populations of the Peruvian Amazon through the analysis of 8 microsatellite loci. The results show a high genetic variability in the species (113 alleles found, with an average of 13.14 alleles per locus). The correspondence factor analysis showed the existence of genetic differentiation between some populations of this species, in addition, the results of the fixation index (F_{ST}), Number of migrants per generation (N_m) and genetic distance showed that the populations of Madre de Dios and Nanay present the greatest genetic differences between them ($F_{ST} = 0.115$, $N_m = 1.93$; $D = 0.349$) and also with the rest of the populations (Madre de Dios: F_{ST} varies from $= 0.039$ to 0.057 ; $N_m = 4.16$ to 6.24 ; $D = 0.135$ to 0.174 ; Nanay: F_{ST} varies from $= 0.060$ to 0.080 , $N_m = 2.88$ to 3.95 ; $D = 0.165$ to 0.222). It was also observed that the populations of the Marañón and Ucayali rivers do not show genetic structuring between them ($F_{ST} = 0.00$; $N_m = \text{infinity}$; $D = 0.003$). The results of the genetic structuring analysis corroborated these results, showing three evolutionary units among the seven populations analyzed ($K = 3$). The differences found among these fish populations could be related to isolation by geographic distance in the case of Madre de Dios or isolation by the difference in the type of water in the case of Nanay.

Keywords: Genetic variability, microsatellite molecular markers, genetic differentiation.

INTRODUCCIÓN

La cuenca amazónica abarca un área aproximada de 6.000.000 Km² ¹ y presenta la más rica ictiofauna de agua dulce del mundo ². Esta ictiofauna, está representada mayormente por peces del orden characiformes (43%) seguido de los Siluriformes (39%) ³. Dentro del orden Siluriformes la familia más representativa es Pimelodidae, con 30 géneros que engloban 93 especies que concurren en los principales ríos de América del Sur ⁴. Dentro de estas especies destaca *Pseudoplatystoma punctifer* por ser muy importante para la producción comercial en países como Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela, debido a que presenta una excelente calidad de carne con pocos huesos intramusculares y una alta tasa de crecimiento con un potencial de alcanzar los 50 Kg ⁵.

Sin embargo, actualmente la demanda comercial del mercado regional e internacional es cubierta casi íntegramente a través de la pesca comercial en ambientes naturales ⁶. Esto ha ocasionado en los últimos años un aumento en la presión de pesca, y la captura de individuos en tallas por debajo del tamaño de la primera madurez sexual, lo que estaría causando la disminución de sus poblaciones naturales y pérdidas económicas para el futuro del sector pesquero ⁶. La disminución del número de individuos y la ruptura de la continuidad de dichas poblaciones, pueden reducir el flujo genético existente entre ellas, lo que incrementa los procesos estocásticos de deriva genética⁷.

En este contexto, estudios genéticos con marcadores moleculares microsatélites son de considerable importancia debido a que son marcadores altamente

informativos que permiten identificar poblaciones con diversidad genética reducida, así como distinguir subpoblaciones genéticamente diferenciadas del resto, para dirigir los esfuerzos de conservación hacia ellas ⁸. En este sentido, el presente trabajo pretende contribuir a generar información sobre la variabilidad genética de *Pseudoplatystoma punctifer* en siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana, que sirva de base para la formulación de planes de manejo y conservación de poblaciones naturales de esta especie.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Bases Teóricas

1.1.1 Descripción Taxonómica de *Pseudoplatystoma punctifer*

El género *Pseudoplatystoma* está constituido por bagres rayados muy atractivos debido a la coloración y al diseño cromático que poseen, además las especies de este género presentan mucha semejanza entre sí, llevando muchas veces a confundirlos ⁹. La cabeza de *P. punctifer* presenta bordes laterales casi rectos; una fontanela (ranura que pasa entre los ojos) relativamente corta y superficial, no alcanzando la mitad de la distancia entre el ojo y el borde posterior del opérculo ¹⁰. Por otro lado, los patrones de bandas transversales y perpendiculares al cuerpo de *P. punctifer* son bien separadas entre sí, con presencia de bandas claras y oscuras sobre el tronco ⁹⁻¹².



Figura 1. Individuo de la especie *Pseudoplatystoma punctifer*

1.1.2 Ubicación sistemática de *Pseudoplatystoma punctifer*

Hasta el año 2006 se creía que el género *Pseudoplatystoma* se encontraba dividido en tres especies *P. corruscans*, *P. fasciatum* y *P. tigrinum*. A partir de la revisión sistemática publicada por Buitrago-Suárez

& Burr en el año 2007 se reorganizó la clasificación en ocho especies válidas: las tres ya existentes *P. corruscans*, suscrito a la cuenca del Paraná; *P. fasciatum*, que según Buitrago-Suárez & Burr (2007) esta restringido solamente a las cuencas del escudo de las Guayanas y *P. tigrinum* de amplia distribución en la Amazonía continental; dos especies validadas: *P. punctifer*, también de amplia distribución en la cuenca amazónica y *P. reticulatum* de la cuenca del Paraná; y tres especies nuevas, *P. orinocoense* y *P. metaense*, ambos de la cuenca del Orinoco; y finalmente *P. magdaleniatum*, de la cuenca del Magdalena. Posteriormente una revisión filogenética del género basada en las áreas de distribución geográfica sugeridas por Buitrago-Suárez & Burr (2007), mostró que no se puede distinguir a *P. fasciatum* de *P. punctifer* y a *P. orinocoense* de *P. metaense*, sugiriendo que en realidad serían especies sinónimas ¹³. Recientemente, una nueva revisión filogenética del género basada en marcadores mitocondriales (citocromo b) y nucleares (Rag1 intron 1, y S7 intron 1) sugieren el reconocimiento de solo cuatro especies dentro del género: *P. magdaleniatum*, *P. corruscans*, *P. tigrinum* y *P. fasciatum* ¹⁴.

De acuerdo a Buitrago-Suárez & Burr (2007) *P. punctifer* presenta la siguiente clasificación:

Superclase : Gnathostomata

Clase : Teleostomi

Subclase : Actinopterygii

Grupo : Teleostei

Superorden : Ostariophysi

Orden : Siluriformes

Familia : Pimelodidae

Género : *Pseudoplatystoma*¹⁵

Especie : *Pseudoplatystoma punctifer*¹⁶

1.1.3 Distribución geográfica de *Pseudoplatystoma punctifer*

Presenta una amplia distribución, abarcando la Amazonía continental (Guyanas, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela). Se encuentran muy extendidos desde el bajo Amazonas hasta las cabeceras de todos los tipos de ríos, pasando por los canales, los planos de inundación y también los arroyos de la selva lluviosa. También se encuentran tanto en aguas corrientes como tranquilas pero son raros o ausentes en los estuarios¹⁷⁻¹⁹.

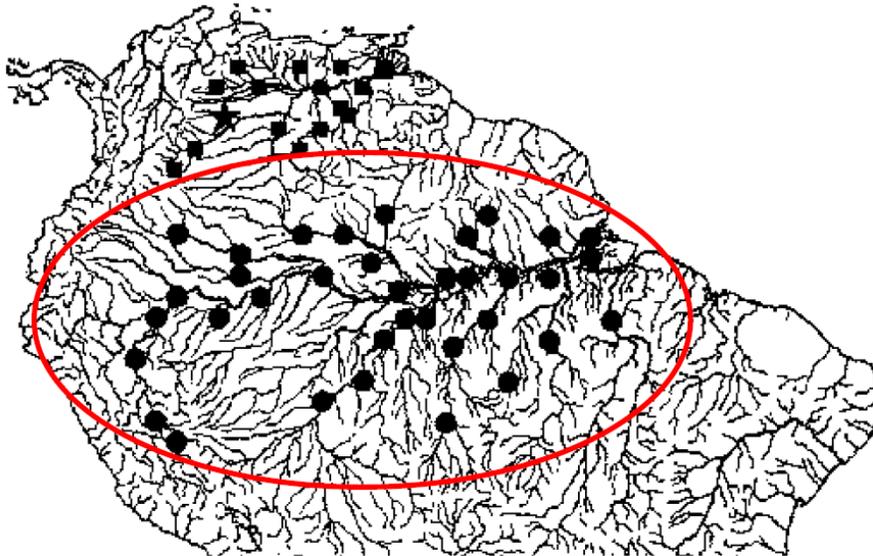


Figura 2. Distribucion de *Pseudoplatystoma punctifer* en la Amazonía baja (círculo rojo), (adaptado de Buitrago – Suárez, 2007).

1.1.4 Alimentación de *Pseudoplatystoma punctifer*

Tradicionalmente se considera que los miembros del género *Pseudoplatystoma* se alimentan durante la noche. Sin embargo, se ha demostrado que *P. punctifer* está activo y caza durante el día, especialmente en la mañana ¹⁸.

Su alimentación corresponde a niveles tróficos altos, siendo en su mayoría predadores, ictiófagos y omnívoros. Su dieta está compuesta principalmente por cardúmenes de Characiformes, como: Boquichico *Prochilodus nigricans* (Prochylodidae), llambina *Potarmorhina altamazonica*, ractacara *Psectrogaster amazonica*, chíó chíó *Psectrogaster rutiloides* y san pedro *Chalceus erythrurus* (Curimatidae), palometa *Mylossoma duriventrii*, paña roja *Pygocentrus nattereri* y paña

blanca *Serrasalmus rhombeus* (Serrasalminidae), sardina *Triportheus angulatus* y mojarra *Diplodus vulgaris* (Characidae) y Chambira *Rhaphiodon vulpinus* (Cynodontidae). Así como también se alimenta de cardúmenes del orden siluriformes como rego rego *Hemiodoras stenopeltis* (Doradidae), Shitari *Loricariichthys maculatus* (Loricariidae), shiruy *Hoplosternum littorale* (Callichthyidae) y del orden Perciformes como la corvina *Plagioscion squamosissimus* que pertenece a la familia Sciaenidae ²⁰. Sin embargo se conoce también que incorporan en su dieta a miembros de su propia clase, así como a crustáceos, y algunas frutas o semillas ¹⁸.

1.2. Definición de términos

1.2.1. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se relacionan con un rasgo genético, pero que poseen variaciones o polimorfismos suficientes para agrupar a ciertos organismos y funciona como un señalador de diferentes regiones del genoma ²¹. Los marcadores de ADN, y en especial los microsatélites, están rápidamente reemplazando o complementando a otros marcadores o metodologías genéticas en las aplicaciones evolutivas y la conservación de las especies. Dado su elevado nivel de polimorfismo, resultan útiles para definir un único genotipo multilocus, de particular interés en estudios donde se requiera una escala muy fina de resolución y en los cuáles otros tipos de marcadores podrían presentar algunas limitaciones, siendo especialmente estos estudios los referidos al análisis

de paternidades, parentescos, asignación de individuos a raza, planificación de apareamientos y otros aspectos de índole reproductiva ²².

Un buen marcador molecular debe reunir varias características para maximizar su utilidad, entre ellas, debe tener buena distribución a lo largo del genoma y alto grado de polimorfismo. La técnica para analizar el marcador debe ser rápida, práctica y debe repetirse con fiabilidad en otros laboratorios ²³.

1.2.2. Marcador molecular microsatélite

Los marcadores moleculares microsatélites son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos. Algunas de las características de estos marcadores *versus* otros (minisatélites, RFLPs, RAPDs, etc.), presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, tienen una confiabilidad del 100%, repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente ²⁴.

Dado que los microsatélites están más o menos distribuidos a lo largo de todo el genoma de los eucariotas, aunque con baja frecuencia en las regiones codificantes y, quizás también en los telómeros, su presencia en estas regiones se ha descrito asociada a enfermedades ²⁵⁻²⁷. Sin embargo, aún se desconoce el significado funcional de estas secuencias,

a pesar de que la hipótesis más aceptada apunta a que pueden estar relacionados con el empaquetamiento y la condensación del ADN en los cromosomas ²⁸. El análisis con microsatélites involucra la detección de fragmentos específicos de ADN y nos da la medida de los alelos (en pares de bases) en cada una de las regiones ²⁹.

1.2.3. Aplicación de microsatélites en genética poblacional

Representa una de las áreas donde los microsatélites fueron más ampliamente utilizados, debido a que permite estimar niveles de variabilidad genética intrapoblacional y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio es de gran importancia para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción ²⁹.

En los estudios de genética de poblaciones, los marcadores permiten la identificación de cada alelo por locus, la obtención de datos poblacionales, y el cálculo de las frecuencias alélicas. De esta manera podemos estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos ^{30, 31}; así como también realizar análisis de estructuración genética poblacional y estudios filogenéticos. La diversidad o variabilidad genética se puede definir como «la capacidad genética para variar», y por ende, la capacidad a responder tanto a variaciones de índole ambiental como a cambios en los objetivos de selección. Es así, como la variabilidad genética constituye la base del progreso genético ³².

Durante los últimos años se han realizado muchos estudios que han utilizado los microsatélites para análisis filogenéticos, concluyendo que, con un buen número de *loci* analizados y con apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una buena aproximación de la filogenia ³³⁻⁴³. Por ello, la aplicación del análisis de microsatélites en peces, ha permitido establecer la relación genética intra e inter específica entre poblaciones, mapeo genómico, pruebas de parentesco y realizar inferencias sobre un apropiado manejo de individuos en cautiverio dentro de los programas de selección artificial ⁴⁴.

CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Formulación de la Hipótesis

Existe una alta variabilidad genética de *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) en siete poblaciones naturales de la Amazonía Peruana

2.2. Variables y su operacionalización

Variables	Indicador	Índices
Variabilidad genética de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> en siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana	Variabilidad genética intrapoblación	Número de alelos, heterocigocidad observada y esperada
	Variabilidad genética interpoblación	Fst y Fis (Índice de fijación y desviación a la pmixia respectivamente)
	Distancia genética	Flujo de genes
	Relación filigenética	Grado de diferenciación

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño

El trabajo de investigación fue de tipo descriptivo.

3.2. Diseño muestral

Población

Estuvo constituido por 268 muestras de tejido muscular de *Pseudoplatystoma punctifer* obtenidas de las 7 cuencas mencionadas.

Muestra

Estuvo constituida por 203 muestras de tejido muscular de la especie *Pseudoplatystoma punctifer* obtenidas de las 7 cuencas mencionadas.

3.3. Procedimiento y recolección de datos

3.3.1. Colecta del material biológico

Se colectaron, codificaron y conservaron muestras biológicas (tejido muscular) de *P. punctifer* en alcohol de 96% provenientes de siete cuencas hidrológicas (Anexo 1).

Tabla 1. Lugares y georeferencias de las muestras colectadas de *Pseudoplatystoma punctifer*.

CUENCA	LUGAR DE COLECTA	GEOREFERENCIA
Ucayali	Jenaro Herrera	04°53' 19" S, 73°39'46" O
Madre de Dios	Puerto Maldonado	12°35' 09" S, 69°10'52" O
Marañón	Nauta	04°31' 21" S, 73°35'06" O
Pastaza	San Lorenzo	04°49' 49" S, 76°33'44" O
Amazonas	Pevas	03°20' 05" S, 71°51'15" O
Nanay	Nina Rumi	03°50' 30" S, 73°23'50" O
Putumayo	Estrecho	02°26' 40" S, 72°40'10" O

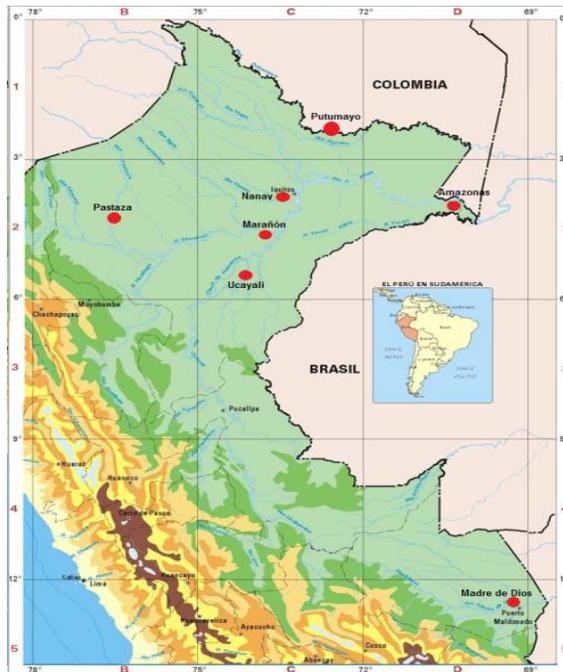


Figura 3: Ubicación geográfica de los lugares de colecta de *Pseudoplatystoma punctifer*

3.3.2. Área de trabajo

El trabajo de investigación se ejecutó en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), ubicada en el Centro de Investigaciones de Fernando Alcántara Bocanegra, carretera Iquitos-Nauta km 4.5, distrito de San Juan Bautista, región Loreto – Perú.

3.3.3. Extracción del ADN de *Pseudoplatystoma punctifer*

La extracción de ADN se realizó mediante el método de extracción CTAB de Doyle & Doyle, (1987) a partir de tejido muscular conservado en alcohol al 96%, mediante el siguiente protocolo:

- a. Se pesó 100 mg de tejido muscular, seguidamente fue colocado en un microtubo de 2 mL conteniendo 1 mL de buffer de extracción de ADN. El tejido fue triturado completamente, y se adicionó 10 μ L de Proteinasa K (10mg/mL).
- b. El microtubo con el tejido triturado fue incubado en baño María a 60°C por toda la noche.
- c. Se adicionó 1 mL de cloroformo y se mezcló suavemente durante 5 minutos. Seguidamente se centrifugó a 8000 rpm (590 rcf -g) durante 5 minutos.
- d. Se tomó 500 μ L del sobrenadante, el cual fue colocado en un nuevo microtubo de 1.5 mL. Posteriormente se agregó 750 μ L de isopropanol frío, se mezcló suavemente durante 2 minutos.
- e. Luego se sometió a congelación por 2 horas. Seguidamente fue centrifugado a 13000 rpm (15700 rcf-g) por 15 minutos.
- f. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente, evitando perder el pellet (ADN).
- g. Al pellet obtenido se le agregó 750 μ L de etanol al 70%, luego se centrifugó a 13000 rpm (15700 rcf-g) durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante.
- h. Luego se procedió a secar el precipitado de ADN en una centrifuga al vacío por 15 minutos a 45° C.
- i. Finalmente, se resuspendió el precipitado de ADN agregando 30 μ L de agua Mili Q. El ADN extraído fue almacenado a una temperatura de -20°C hasta su posterior análisis.

3.3.4. Concentración y pureza del ADN genómico

Se realizó mediante el método espectrofotométrico de Maniatis *et al.* (1989); utilizando un cuantificador de ADN (Biophotometer). La concentración de la muestra se determinó en base a la capacidad de absorbancia de la misma, utilizando las longitudes de ondas de 260nm y 280nm. La determinación de la pureza de la extracción, se realizó en un rango de aceptación entre: 1.7 – 2.0 (A260/A280).

3.3.5. Verificación del ADN genómico

La verificación de la calidad del ADN genómico, se realizó mediante la observación de las bandas de ADN en geles de agarosa 0.8% teñido con GelRed (10mg/mL) a razón de 1µL/50mL. La migración se realizó en una cámara electroforética horizontal a 100 voltios por un espacio de 30 minutos. La visualización de los geles y el registro de los mismos, fue realizado en un transluminador de rayos ultravioleta y en un sistema de imagen GEL LOGIE 100 (KODAK).

3.3.6. Amplificación de los microsatélites

La amplificación de las regiones microsatélites se realizó con ocho marcadores moleculares microsatélites (Anexo 2), dos de los cuales diseñados a partir de la especie *P. punctifer* (Ppu 02, Ppu 15) ⁴⁷ y los seis restantes diseñados a partir de la especie *P. corruscans* (Pcor 01, Pcor02, Pcor05, Pcor08, Pcor10 y Pcor21) ⁴⁸. La reacción de amplificación fue realizada en un sistema multiplex (varios primer por reacción de PCR) para 4 paneles (Anexo 3). Las condiciones de temperatura fueron: denaturación

inicial a 92°C durante 2 minutos; seguida de 30 ciclos de denaturación a 95°C de 1 minuto, hibridación a 55°C de 1 minuto, y extensión a 72°C de 1 minuto; seguida de una extensión final a 72°C de 30 minutos (Anexo 4).

3.3.7. Verificación de la amplificación de los microsatélites

La verificación de los productos amplificados se realizó en geles de agarosa al 2% (Anexo 5), usando tampón de siembra (Gel red 1µL, H2O Mili-Q 499 µL, Azul de bromofenol 1500 µL) y tampón de corrida TBE 1X, a 100V (voltios) por 15 minutos. El ADN fue visualizado en un transluminador de UVStar 312 nm (nanómetros) y foto documentado utilizando un sistema de imagen GEL LOGIC 100, KODAK.

3.3.8. Obtención y visualización del peso de los alelos microsatélites

Los segmentos amplificados fueron denaturados y separados mediante electroforesis capilar utilizando el analizador genético Applied Biosystems 3130XL, para lo cual se tomó 1µL del producto de PCR, junto con 8,7 µL de Formamida y 0,3 µL de GeneScan 500 ROX (marcador de peso molecular). Los pesos de los alelos de cada microsatélites fueron visualizados usando el software Peak Scanner versión 1.0 (Anexo 6).

3.4. Procesamiento y análisis de datos

3.4.1. Diversidad alélica por *locus* y poblaciones

Fueron calculados con ayuda del programa Genetix versión 4.05.2 ⁴⁹, para cada locus en cada población: el número de alelos (N), diversidad alélica (AT), riqueza alélica (AR), heterocigosidad promedio observada (H_o) y esperada (H_e), así como el coeficiente de endogamia (F_{is}) para medir la desviación de la panmixia.

El número de alelos exclusivos o privados (alelo presente sólo en una localidad) fue determinado mediante el programa GenAlex 6.4 ⁵⁰. Las significancias estadísticas fueron estimadas utilizando intervalos de confianza de 95%.

3.4.2. Análisis Factorial de Correspondencia

El análisis factorial de correspondencia analiza una matriz con ambos alelos por cada locus informativo, en donde el tratamiento de datos se realizó en el Software Genetix versión 4.05.2 ⁴⁹. El análisis factorial de correspondencia (AFC) fue utilizado como método exploratorio para visualizar si existían diferencias genéticas entre las poblaciones.

3.4.3. Diferenciación genética y flujos genéticos entre poblaciones

Con el apoyo del programa Genetix versión 4.05.2 ⁴⁹, se estimaron los valores del Índice de Fijación F_{ST} ⁵¹, así como la Distancia Genética de Nei ⁵² entre pares de localidades para medir la diferenciación entre poblaciones.

Las tasas de migración (flujo génico) fueron estimadas de forma lineal a partir de los valores del Índice de Fijación F_{ST} ⁵¹, expresada en número de migrantes por generación (Nm) donde $Nm = (1 - F_{st}) / 4 * F_{st}$ ⁵³

3.4.4. Estructura genética

La estructura genética fue evaluada mediante el análisis de asignación Bayesiana implementado en el programa STRUCTURE 2.3.4⁵⁴. Structure es un software libre desarrollado por Pritchard *et al.* (2000) que utiliza datos de genotipo multilocus (SNPs, SSR, AFLP y RFLP) para asignar los individuos a una población. En este análisis los individuos son asignados probabilísticamente a uno de los grupos genéticos (K), donde K puede tomar sucesivos valores desde K= 1 hasta un número definido por el usuario. Al final del análisis se determina el valor de K que tiene mayor probabilidad dados los datos⁵⁴. En este caso, se probaron valores desde K= 1 hasta K= 7 y se realizaron 10 corridas para cada valor de K. Se utilizó el modelo que permite mezcla entre los grupos genéticos y frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones. Se proporcionó al programa información previa sobre la población de origen de los individuos. Cada corrida tuvo un “burn-in” de 10000 pasos, seguidos de 100000 iteraciones. El número de grupos genéticos más probable se encontró determinando el valor máximo del estadístico ΔK , según el método de Evanno *et al.* (2005).

3.4.5. Relaciones interpoblacionales

Las relaciones entre poblaciones fueron estimadas por medio del programa NEIGHBOR del software PHYLIP versión 3.5 ⁵⁷. El dendrograma fue visualizado en el programa TREEVIEW ⁵⁸

3.4.6. Correlación entre distancia genética y distancia geográfica

Para verificar si las diferencias observadas se deben al distanciamiento geográfico entre las poblaciones estudiadas, se realizó una correlación entre las distancias genéticas. Con ayuda del programa Google Earth se midieron las distancias siguiendo el curso del río (fluvial) entre las siete poblaciones naturales (en Km). La correlación con cada una de estas medidas fueron estimadas a través del coeficiente de correlación, calculado en el software Microsoft Excel 2007. Fueron realizados dos análisis de correlación i) entre las siete poblaciones, ii) con la intención de comprobar si otros factores aparte de la distancia geográfica estaban interfiriendo en la diferenciación de las poblaciones, se realizó un segundo análisis entre las poblaciones excluyendo el Nanay.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Diversidad alélica por *locus* y por poblaciones

Fueron obtenidos un total de 113 alelos con ocho loci microsatélites en 203 especímenes *P. punctifer*. Los locus que presentaron el mayor número de alelos fueron Pcor 5 y Ppu 15 con 22 y 20 alelos respectivamente, en tanto que Pcor 21 presentó sólo seis alelos (Anexo 07). La media de alelos por locus fue de 14,13 ($\pm 5,11$)

La heterocigosidad esperada (H_e) varió entre 0,198 para el locus Pcor 21 en la población del Amazonas y 0,922 para el locus Ppu 15 en la población del Marañón. En tanto que la heterocigosidad observada (H_o) varió entre 0 para el locus Pcor 21 en la población del Amazonas a 1 para los locus microsatélites Pcor 1 y Ppu 2 en la población de Madre de Dios. Los valores del índice de endogamia (F_{is}) variaron de -0,547 en el locus Pcor 1 en la población del Nanay a 1 en el locus Pcor 21 de la población del Amazonas (Anexo 8).

El *locus* con frecuencias más homogéneas entre sus alelos en las poblaciones fueron Pcor 5 y Ppu 15. En tanto que el *locus* Pcor 21 presentó un alelo cuyas frecuencias fueron dominantes en todas las poblaciones (alelo 106) con frecuencias entre 0,800 a 1,000, es decir fue el menos diverso (Anexo 9).

En un análisis multilocus por población, la mayor cantidad de alelos y riqueza alélica (promedio total de alelos por población entre número total de

locus) fue presentada por la población del Marañón ($A_T = 82$; $A_R = 10,25$) en tanto que la menor por la del Nanay ($A_T = 54$, $A_R = 6,75$). La media de la heterocigosidad esperada fue siempre mayor a la observada en todas las poblaciones analizadas a excepción de la población del río Nanay, donde la heterocigosidad esperada fue ligeramente menor que la observada ($H_e = 0,658$, $H_o = 0,692$). El mayor valor del índice de endogamia (F_{is}) fue presentado por la población del río Pastaza (0,310), mientras que el menor valor estimado fue para la población del Nanay (-0,034). Solo en dos poblaciones no se pudo rechazar la panmixia (Madre de Dios y Nanay), las demás poblaciones mostraron una diferencia a la panmixia (Tabla 2).

Tabla 2: Variabilidad genética multilocus de *Pseudoplatystoma punctifer* en siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.

Poblaciones	N	A_T	A_R	Media		F_{is}
				H_e	H_o	
Madre de Dios	19	63	7,88	0,7083	0,6842	0,061
Marañón	35	82	10,25	0,7474	0,6643	0,125*
Putumayo	39	81	10,13	0,7231	0,6218	0,152*
Ucayali	30	80	10,00	0,7542	0,6375	0,171*
Pastaza	25	79	9,88	0,7548	0,5350	0,310*
Amazonas	27	70	8,75	0,7133	0,6435	0,117*
Nanay	28	54	6,75	0,6579	0,6920	-0,034

Número de individuos (N), número total de alelos (A_T), media de número de alelos o riqueza alélica (A_R), media de heterocigosidad observada (H_o), esperada (H_e) y coeficiente de endogamia (F_{is}) por población, *= poblaciones que mostraron una diferencia a la panmixia.

Si bien todas las poblaciones analizadas presentaron alelos propios o privados (Tabla 3), las frecuencias de estos alelos fueron bajas en relación a otros alelos comunes entre las poblaciones. Los alelos privados que presentaron las frecuencias más altas fueron el alelo 248 del *locus* Ppu 2 (0,158) y el alelo 214 del *locus* Pcor 2 (0,105) de la población de Madre de Dios. La población con mayor número de alelos privados fue Pastaza con seis alelos (Tabla 3).

Tabla 3: Alelos privados (en pares de bases) y sus respectivas frecuencias (valores entre paréntesis) observados en ocho *locus* de *Pseudoplatystoma punctifer* en siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.

Población	Locus	Alelo privado	Frecuencia	Población	Locus	Alelo privado	Frecuencia
Madre de Dios	Pcor5	131	0,026	Pastaza	Pcor5	155	0,040
	Pcor2	214	0,105		Pcor5	168	0,020
	Pcor10	174	0,026		Pcor10	142	0,020
	Ppu2	248	0,158		Pcor10	157	0,020
Marañón	Pcor2	210	0,014		Pcor21	100	0,020
	Pcor21	105	0,057		Ppu2	228	0,020
	Ppu15	343	0,014	Nanay	Pcor10	161	0,018
Putumayo	Pcor1	102	0,013		Pcor10	162	0,054
	Pcor2	234	0,013				
	Pcor10	150	0,013				
Ucayali	Pcor5	133	0,017				
	Pcor5	137	0,017				
	Pcor2	236	0,033				
	Pcor10	186	0,033				

4.2. Análisis Factorial de Correspondencia

El resultado del análisis factorial de correspondencia (Figura 4) muestran que algunas poblaciones de doncella *Pseudoplatystoma punctifer* muestran cierta estructuración genética (diferenciación genética) con las otras poblaciones analizadas. Las poblaciones provenientes de los ríos Nanay, Pastaza y Madre de Dios parecen presentar una mayor diferenciación del resto de poblaciones (Putumayo, Amazonas, Marañón y Ucayali).

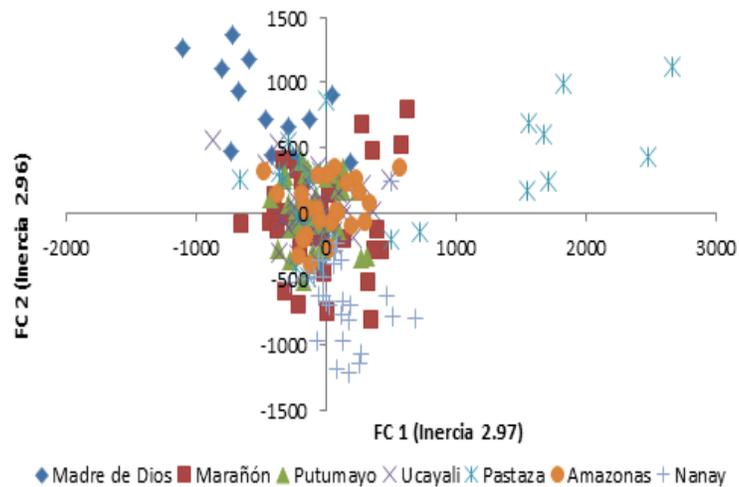


Figura 4: Proyección gráfica de los resultados del AFC para los ejes 1 y 2 obtenidos para los individuos de *Pseudoplatystoma punctifer* provenientes de siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.

4.3. Diferenciación genética y flujos genéticos entre poblaciones

Las poblaciones provenientes de los ríos Madre de Dios y Nanay fueron las que presentaron los mayores valores de diferenciación genética con

respecto a las otras cinco poblaciones analizadas (valores de F_{st} de Madre de Dios variaron entre 0,039 a 0,057 y de Nanay entre 0,060 a 0,080), siendo que la diferenciación genética entre estas dos poblaciones fue la más alta (F_{st} Madre de Dios y Nanay = 0,115), estos valores fueron significativamente diferentes de cero ($P \leq 0,01\%$). La diferenciación genética entre las poblaciones procedentes de los ríos Marañón, Putumayo, Ucayali, Pastaza y Amazonas fueron mucho más bajas, siendo que las poblaciones menos diferenciadas según el índice de fijación (F_{st}) fueron Marañón y Ucayali ($F_{st} = 0,000$), este valor no presento diferencias significativas de cero ($p > 0,05\%$).

Tabla 4: Índice de fijación (F_{ST}) estimados a partir del análisis de ocho *loci* microsatélites para los individuos de doncella *Pseudoplatystoma punctifer* provenientes de siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.

	M.Dio	Marañón	Putuma	Ucayali	Pastaz	Amazon	Nana
M. Dios	-	0,045**	0,045**	0,039**	0,047**	0,057**	0,115
Marañón		-	0,006n.s	0,000n.	0,014*	0,014**	0,060
Putumay			-	0,007*	0,011**	0,020**	0,075
Ucayali				-	0,006n.	0,008*	0,060
Pastaza					-	0,011*	0,075
Amazon						-	0,080
Nanay							-

n.s.: no significativo, *: significativo para $p = \leq 0,05\%$, **: significativo para $p = \leq 0,01\%$

significativo para $p = \leq 0,01\%$

El flujo genético, determinado por el número de migrantes por generación (Nm), calculado en base a los valores de F_{st} varió de 1,93 entre las poblaciones del Nanay y Madre de Dios, mostrando un bajo flujo genético entre dichas poblaciones. Al contrario, las poblaciones del Marañón y Ucayali presentaron un elevado intercambio de genes entre ellas, valor de Nm infinito ($Nm = \infty$).

Tabla 5: Número de migrantes por generación (Nm) estimado a través del análisis de ocho *loci* microsatélites para los individuos de *Pseudoplatystoma punctifer* provenientes de siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.

	M.Dio	Marañó	Putumay	Ucaya	Pastaz	Amazona	Nana
M. Dios		5,32	5,36	6,24	5,1	4,16	1,93
Marañón			38,74	∞	17,24	17,09	3,95
Putumay				36,96	22,3	12,53	3,08
Ucayali					41,26	32,47	3,89
Pastaza						23,32	3,1
Amazona							2,88
Nanay							

Leyenda: ∞ = valor infinito

Los resultados de la Distancia Genética entre poblaciones (estimado según el modelo de distancia de Nei, 1978) muestran que las poblaciones más relacionadas genéticamente son el Marañón y el Ucayali (0,003), en tanto que las poblaciones de Madre de Dios y Nanay presentan la mayor distancia genética entre ellas (0,349) y con las demás poblaciones (todas las distancias genéticas de estas poblaciones son superiores a 0,1).

Tabla 6: Distancia genética (Nei, 1978) entre siete poblaciones naturales de doncella *Pseudoplatystoma punctifer* de la Amazonía peruana, estimada a través del análisis de ocho *loci* microsatélites.

	M.	Marañó	Putumay	Ucaya	Pastaz	Amazona	Nana
M. Dios		0,153	0,143		0,174	0,182	
Marañón			0,023		0,060	0,048	
Putumay					0,042	0,062	
Ucayali					0,035	0,028	
Pastaza						0,042	
Amazona							
Nanay							

4.4. Estructuración genética de las poblaciones

Los resultados del Análisis bayesiano de estructuración, analizados mediante el estadístico ΔK (delta K), muestra que las poblaciones analizadas se dividen preferentemente en tres grandes grupos genéticos o *cluster* ($K = 3$). Muestran además que los individuos de la población del río Nanay presentan una membresía (Q) igual o mayor al 0.80 del *cluster* representado aquí en verde claro (figura 9). Mientras que la población de Madre de Dios presenta un Q igual o relativamente mayor a 0,4 del *cluster* representado aquí en azul (figura 9). En tanto que las demás poblaciones presentan proporciones casi semejantes de los *cluster* representados en rojo y azul con una proporción relativamente baja del grupo genético verde.

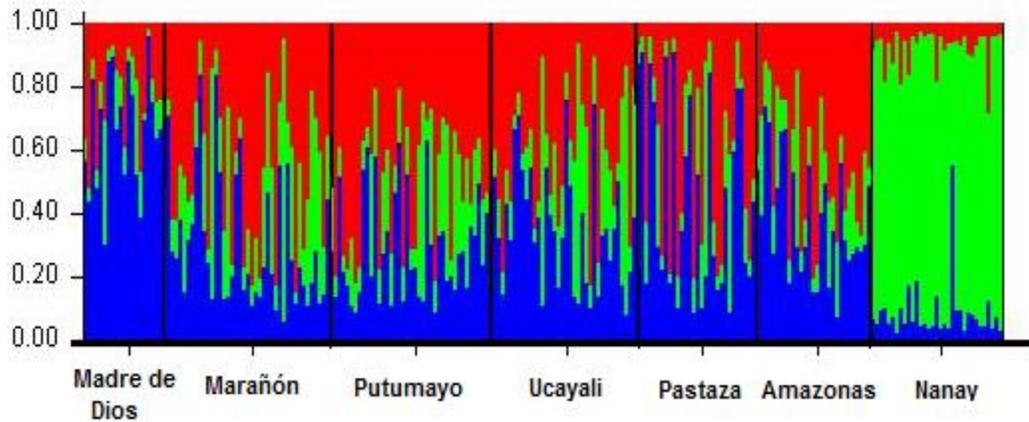


Figura 5: Distribución del genoma de cada individuo en los tres cluster inferidos ($K = 3$). Cada espécimen está representado por una barra vertical. La longitud del color de las barras en el eje vertical define la proporción de membresía (Q).

4.5. Relaciones interpoblacionales

El dendograma obtenido de las siete poblaciones naturales elaborado según el criterio de agrupamiento del Vecino Próximo (Neighbor joining) y en base a la distancia genética de Nei ⁵⁷ muestra las poblaciones más relacionadas son Maraón y Ucayali (Bootstrap= 67%) y que las más distantes genéticamente del resto de poblaciones son Madre de Dios y Nanay (bootstrap = 100%), el cual muestra una concordancia con la localización geográfica de las poblaciones confirmando de este modo la solidez de los resultados obtenidos en los análisis anteriores.

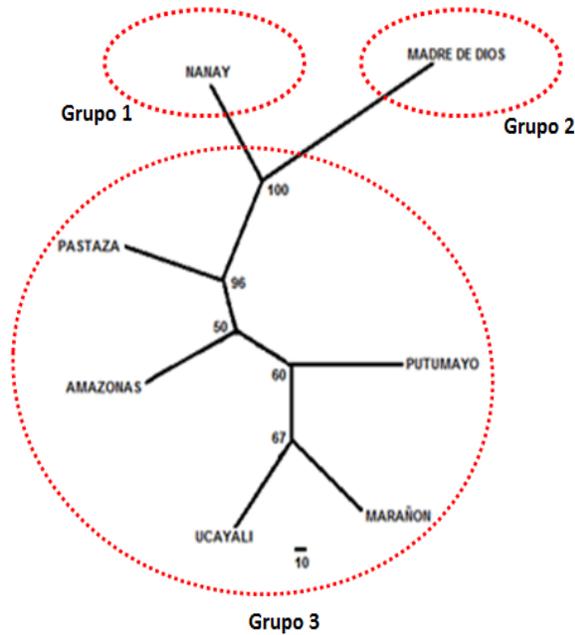


Figura 6: Dendrograma construido a partir de las Distancias genética de Nei según el criterio de agrupamiento Vecino Próximo para la *Pseudoplatystoma punctifer* proveniente de siete poblaciones naturales de la Amazonia peruana.

4.6. Correlación entre distancia genética y distancia geográfica

Las localidades con mayor distancia geográfica fluvial fueron Madre de Dios y Pastaza (4966,62 km) y las más cercanas fueron Marañón y Ucayali (108,50 km). Los valores de la distancia genética (Rousset, 1997) variaron entre 0 (Marañón-Ucayali) a 0,12942 (Madre de Dios-Nanay). El análisis de correlación evidenció que la distancias genéticas observadas entre las siete poblaciones de doncella *Pseudoplatystoma punctifer* estudiadas, tienen una muy baja dependencia de la distancia geográfica fluvial siguiendo un modelo de distribución exponencial ($r = -0,29 \%$; $gl = 19$, $p = 0,5632$,

determinados según el coeficiente de Spearman), es decir que la distancia geográfica explica muy poco de las distancias genéticas encontradas entre las poblaciones estudiadas (Figura 7A). Haciendo un análisis excluyendo la población de Nanay (indicadas con puntos rojos en la Figura 7A), observamos un incremento en la relación entre las seis poblaciones restantes, obteniéndose un valor cercano a uno ($r = -0,89 \%$; $gl = 13$, $p < 0.0001$, determinados según el coeficiente de Pearson), indicando la existencia de una correlación fuerte entre las poblaciones de Amazonas, Pastaza, Ucayali, Madre de Dios, Marañón y Putumayo (Figura 7B).

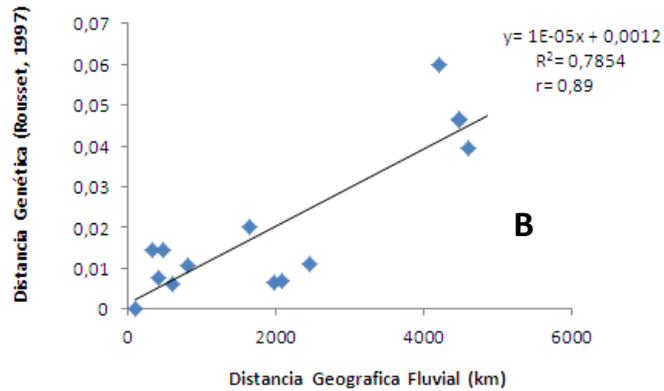
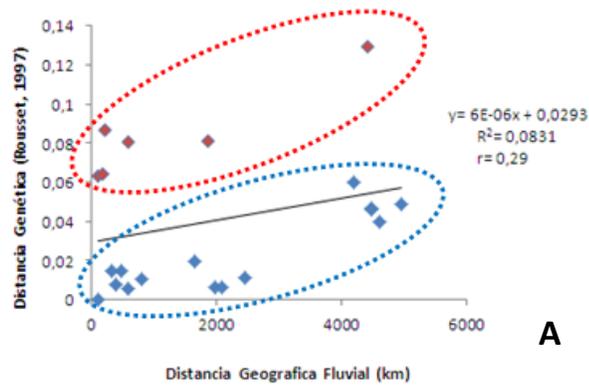


Figura 7: Representación gráfica del análisis de correlación lineal entre las distancias genéticas y las distancias geográficas fluviales de las poblaciones de *Pseudoplatystoma punctifer* en la Amazonía peruana: A) entre siete poblaciones (Nanay, madre de Dios, Ucayali, Marañón, Pastaza, Putumayo y Amazonas); B) entre seis poblaciones (sin Nanay).

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran un elevado polimorfismo entre los individuos de *Pseudoplatystoma punctifer* analizados (un total de 113 alelos y una media de 14,13 alelos por *locus*, heterocigosidad observada multilocus promedio = 0,6398), mostrando una diversidad genética mucho mayor a la encontrada para la misma especie utilizando la técnica EPIC-RFLP (un intron polimórfico de tres intrones analizados)⁷⁰. Esto demuestra que los microsatélites son marcadores altamente informativos a nivel poblacional, en peces la variación observada en *loci* microsatélites es en general por encima de 10 alelos/*locus* con valores de heterocigosis superiores a 0.7 ⁷¹.

Los altos valores de diversidad genética reportados en este estudio para *P. punctifer*, son semejantes a los reportados para otras especies de peces migradores como *P. corruscans* y *Brachyplatystoma rousseauxii*, para el primero fueron reportaron 107 alelos, una media de 15,29 alelos por *locus* y una heterocigosidad = 0,57 ⁷²; y para el segundo 129 alelos, una media de 14,3 alelos por *locus* ⁷³. Llevando en consideración que valores altos de diversidad genética son encontrados solo especies con grandes poblaciones estables ⁷⁴, los valores reportados para *P. punctifer*, muestran que a pesar que esta especie está sujeta a una fuerte presión de pesca sus poblaciones parecen ser saludables (grandes y estables).

Los resultados del AFC muestran que *P. punctifer* presenta diferenciación genética (estructuración poblacional) entre algunas de sus poblaciones. Esto fue corroborado por los valores encontrados en el índice de fijación (F_{st}), Distancia

genética (D) y número de migrantes por generación (Nm) que muestran un mayor relacionamiento genético entre las poblaciones provenientes de las cuencas bajas de los ríos Marañón y Ucayali ($F_{st} = 0,000$; $D = 0,003$; $Nm = \text{infinito}$). En contraste, las mayores diferenciaciones fueron presentadas entre las poblaciones de los ríos Madre de Dios y Nanay con el resto de poblaciones analizadas (Putumayo, Marañón, Ucayali, Pastaza y Amazonas). Los resultados del análisis de la correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética, además de mostrar la existencia de una muy baja dependencia entre la distancia geográfica y la distancia genética, muestra la existencia dos nubes de datos independientes entre sí (Figuras 8). Cuando identificados los puntos, observamos que son las correlaciones de la población del río Nanay con las demás poblaciones. Un segundo análisis sin la población del río Nanay, muestra correlaciones muy fuerte entre las seis poblaciones restantes, esto constituye una evidencia de que probablemente sean dos eventos o factores los que estarían influenciado en la estructuración de las poblaciones, es decir aparte del aislamiento por distancia geográfica, el tipo de agua podría también estar influenciando en la diferenciación genética entre las poblaciones analizadas.

En el caso de las diferenciaciones por distancia geográfica, las mayores distancia y diferenciaciones genéticas encontradas entre el río Madre de Dios y las demás poblaciones pueden estar relacionadas a la mayor distancia geográfica y a la falta de un vínculo físico directo entre estos ríos en la Amazonía peruana (El Madre de Dios forma parte de la cuenca del río Beni (Bolivia), que a su vez es tributario del río Madera (Brasil), el cual desemboca en la cuenca media del río Amazonas

(Amazonía brasilera), lo cual estaría dificultando el flujo de genes entre estas poblaciones. En contraste las poblaciones más cercanas geográficamente como son Ucayali y Maraón, son también las poblaciones más cercanas genéticamente. Estructuración genética no significativa fueron también reportados para *P. punctifer* entre la población del río Madre de Dios y las poblaciones de los ríos Amazonas y Ucayali determinados mediante marcadores EPIC, donde los autores concluyeron que la falta de significancia de los valores de F_{st} podrían estar relacionados al menor número de especímenes analizados, que sumados a la baja poder de resolución del marcador no fue capaz de establecer un mayor grado de diferenciación entre estas poblaciones⁷⁰.

La diferenciación genética encontrada entre la población del Nanay con las poblaciones del Ucayali, Maraón, Pastaza, Putumayo y Amazonas posiblemente no parecen estar relacionadas a un aislamiento por distancia geográfica, tal como se puede apreciar por ejemplo entre las poblaciones del Nanay y Amazonas que a pesar de estar geográficamente cerca, el índice de fijación y la distancia genética son mayores ($F_{st}= 0,080$ y $D= 0,222$) en comparación a otros pares de poblaciones cercanas (por ejemplo Maraón y Ucayali, $F_{st} = 0$, Distancia = 0,003 y $Nm = \text{infinito}$), por lo que posiblemente esta diferenciación tenga un sustento ecológico, ya que es el único río en relación a las seis restantes cuyas aguas son negras, es decir la diferenciación de las aguas podría estar actuando como una barrera entre estas poblaciones. Este comportamiento ya fue registrado en otras especies de peces, como la arahuana asiática *Scleropages formosus*, donde utilizando secuenciamiento de una porción

del citocromo b y apoyado en datos morfológicos, pudieron confirmar la estructuración y diferenciación genética entre diferentes variedades de color, lo que les permitió describir tres especies nuevas de arahuanas. Estas conclusiones fueron reforzadas con un análisis de las características ecológicas y geográficas de las zonas donde habitaban estas especies, encontrando una fuerte relación con el tipo de agua. Observando que algunas poblaciones habitaban en zonas de aguas negras con bajo pH (< 5,5), en cambio otras habitaban en aguas blancas o claras con pH elevados (6,0)⁷⁵. Estas conclusiones son apoyadas por otros trabajos donde mencionan que las dos arahuanas sudamericanas, *O. bicirrhosum* y *O. ferreirai* (restringido a la cuenca del río Negro) tienen una distribución alopatrica, y que la diferencia está asociada con el tipo de agua. *O. bicirrhosum* ocurre en aguas de neutro a ligeramente alcalinas, mientras *O. ferreirai* habita en aguas negras altamente ácidas ^{75,76}. Este hecho hace suponer que esta característica podría estar influenciando en la diferencia observada entre la población del Nanay con el resto de las poblaciones.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Los elevados valores obtenidos para la variabilidad genética intra e interpoblacional muestran que las poblaciones estudiadas presentan óptimas condiciones de adaptación, importante para mitigar los impactos generados por la presión de pesca y los cambios ambientales.

Los resultados filogeográfico muestran que las poblaciones más relacionadas son Ucayali y Marañón, en tanto que las más diferenciadas de las demás poblaciones son Nanay y Madre de Dios.

La doncella *Pseudoplatystoma punctifer* al contrario de lo esperado es una especie medianamente migradora que presenta diferenciación genética entre algunas de sus poblaciones (estructuración poblacional), la cual podría estar influenciada por la distancia geográfica en el caso de la población del río madre de Dios y por el tipo de agua en el caso de la población del río Nanay.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

Ampliar el número poblacional y los puntos de muestreo, incorporando dentro de ellos cuerpos de aguas negras con el fin de brindar un mayor soporte a los resultados.

Considerar la estructura genética poblacional de *P. punctifer* dentro de los planes de manejo para evitar la pérdida de variabilidad genética.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Villar J. C. E., Guyot J. L., Ronchail J., Cochonneau G., Filizola N., Fraizy P. & Labat D. Contrasting regional discharge evolutions in the Amazon basin (1974–2004) *Journal of Hydrology*. 2009; 375 (3-4): 297-311.
2. Lévêque C., Oberdorff T., Paugy D., Stiassny M. L. J. & Tedesco P. A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* 2008; (595): 545 - 567.
3. Lowe-McConnell R. H. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press. 1987; 382.
4. Carl J. & Ferraris C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes, Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 2007; 1418:1- 628.
5. Sato Y., Cardoso E. L. & Sallum W. B. Reprodução induzida do surubim da Bacia do São Francisco. *Encontro Anual de Aqüicultura*. Belo Horizonte. 1998; 1 pp.
6. Tello S. & García A. La pesquería de grandes bagres en la región Loreto. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. 2009; 28p.
7. Young A.G., Boyle T. & Brown A.H.D. The population genetic consequences of hábitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol*. 1996; 11, 413-418

8. González E.G. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. 2003; 59(2-3): 377-388.
9. Agudelo E., Salinas Y., Sánchez C., Muñoz D., Alonso J., Arteaga M., Rodríguez O., Anzola N., Acosta L., Núñez M. & Valdés H. Bagres de la Amazonía Colombiana: Un Recurso sin Fronteras. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – SINCHI. 2000. 254pp.
10. Ramírez H., & Ajjaco R. El bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1776) y *Pseudoplatystoma tigrinum* Valenciennes 1840, aspectos biológico-pesqueros en el alto río Meta. En: Boletín Científico. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Santa Fé. 1995; 157- 167.
11. Sánchez H. Contribución al conocimiento sistemático de la ictiofauna amazónica de consumo; bajo río Ucayali. (Dpto. de Loreto – Perú). Tesis para optar el título profesional de Biólogo. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. 1989.
12. Buitrago-Suárez U. & Burr B. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. Zootaxa. 2007; 1512: 1- 38.
13. Torrico J-P., Hubert N., Desmarais E., Duponchelle F., Nuñez Rodriguez J., Montoya-Burgos J., Garcia-Davila C., Carvajal F., Grajales AA., Bonhomme F. & Renno J-F Molecular phylogeny of the *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. Mol Phylogenet Evol. 2009; 51: 588–594.

14. Carvalho-Costa LF, Piorski NM, Willis SC & Galetti PM Jr, Orti G. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (1862) based on nuclear and mtDNA markers. *Mol Phylogenet Evol.* 2011; 59:177–194.
15. Bleeker, P. P. Atlas ichthyologique des indes orientales néerlandais, Publié sous les Auspices du Gouvernement Colonial Néerlandais. Tome II. Siluroïdes Chacoïdes et Ilétérobrancoïdes. J. Smith, Amsterdam. 1982; 1-112, pls. 49 – 101.
16. Castelnau, F. L. Poissons. In: Animaux nouveaux or rares recueillis pendant l'expédition dans les parties centrales de l'Amérique du sud de Rio de Janeiro a Lima, et de Lima au para; Exécutée par ordre du gouvernement Français Pendant les Années 1843 a 1847. Part 7, Zoology 2. 1855; i-xii + 1-112, 50pls.
17. Burgess W. E. An Atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes. T. F. H Publications, Inc., Neptune City, N. Jersey. 1989.
18. Reid S. La biología de los bagres rayados *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma. tigrinum* en la cuenca del río Apure, Venezuela. *Revista UNELLEZ de Ciencia y Tecnología.* 1983; 1: 13- 41.
19. Barthem R. & Goulding, M. Os Bagres Balizadotes: Ecología, Migração e Conservação de Peixes Amazonicos. Sociedade Civil Mamirauá/TCA/GEP/PNUD. Brasilia. 1997; 140 pp.

20. Deza T. S. A., Bazan A. R. S. & Culqichicon M.Z.G. Bioecología y pesquería de *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766; pisces), doncella, en la región Ucayali. *Folia Amazónica*. 2005; 14(2): 5-18.
21. Picca A., Helguera M., Salomón N. & Carrera A. Marcadores Moleculares. *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal*. 2004; 61- 68.
22. Jones A. G., Östlund-Nilsson S. & Avise J. C. A microsatellite assessment of sneaked fertilizations and eggs thievery in the fifteen spines stick elback. *Evolution*. 1998; 52: 848- 858.
23. Cheng H. H. & L. B. Crittenden. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*.1994; 73: 539- 546.
24. Goldstein B. D. & Schlotterer C. Microsatellites evolution and applications. Oxford University Press, New York, 1999; 352 pp.
25. Armour J. A., Neumann R., Gobert S. & Jeffreys A. J. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*.1994; 3: 599-605.
26. Hancock J. Microsatellites and other simple sequence: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D., Schlotterer C. (eds.). *Microsatellites evolution and applications*, Oxford University Press, New York. 1999; 1- 10.
27. Tautz D. & Schlotterer C. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development*.1994; 4: 832-837.

28. Vanhala T., Tuiskula-Haavisto M., Elo K., Vilkki J. & Maki- Tanila A. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science*.1998; 77: 783-790.
29. Aranguren-Méndez J. A., Román-Bravo R., Isea W., Villasmil Y. & Jordana J. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 2005; 13(1): 30- 42.
30. Bowcock A. M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minc E., Kidd J. R. & Cavalli-Sforza L. L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*.1994; 368: 455- 457.
31. Ponsuksili S., Wimmers K., Schmoll F., Horst P., & Schellander, K. Comparison of Multilocus DNA fingerprints and Microsatellites in an Estimate of Genetic Distance in Chicken. *J. Hered.* 1999; 90(6): 656-659.
32. Rochambeau H., Fournet-Hanocq F. & Vu TienKhang J. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech.* 2000; 49: 77- 93.
33. Aranguren-Méndez J. A., Jordana J. & Gomez M. Genetic diversity in Spanish donkey breed susing microsatellite DNA markers.*Genetics Selection and Evolution.* 2001; 33: 433- 442.
34. Aranguren-Méndez J. A., Jordana J., Avellanet R. & Torrens M. Estudio de la variabilidad genética en la raza bovina Mallorquina para propósitos de conservación. *Revista Científica, FCV-LUZ.* XII (5). 2002(a); 358- 366.

35. Aranguren-Méndez J. A., Gómez M. & Jordana J. Potencial de los Microsatélites para la asignación de individuos dentro de raza en poblaciones a ser conservadas. V Congreso de la Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales y III Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales. (SERGA&SPREGA). *El Arca*. 2002(b); 5: 37.
36. Aranguren-Méndez J. A., Jordana J. & Gómez M. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN 41 Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 2002(c); 119: 256- 263.
37. Aranguren-Méndez J. A., Gómez M. & Jordana J. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. *Heredity*. 2002(d); 89: 207- 211.
38. Farid, A., O'really E., Dollard C. & Kelsey Jr C. R. Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. *Canadian Journal of Animal Science*. 2000; 80: 9-17.
39. Ishida N., Hasegawa T., Takeda K., Sakagami M., Onishi A., Inumaru S., Komatsu M. & H. Mukoyama. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics*. 1994; 25: 215-221.
40. Loftus R. T., Machugh D. E., Bradley D. G., Sharp P. M. & Cunningham P. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1994; 91: 2757-2761.

41. Peelman L. J., Mortiaux F., Van Zeveren A., Dansercoer A., Mommens G., Coopman F., Bouquet Y., Burny A., Renaville R. & Portetelle D. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Animal Genetics*. 1998; 29: 161- 167.
42. Saitbekova N., Gaillard C., Obexer-Ruff G. & Dolf G. Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics*. 1999; 30: 36 - 41.
43. Takezaki N. & Nei M. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. 1996; 144: 389- 399.
44. Pineda S. H., Olivera A., Urquiqui A. S., Trujillo B. E & Builes G. J. J. Evaluación del polimorfismo por microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* (Characidae, Serrasalminae) provenientes del río Meta, Colombia. *Rev. Col. CiencPec*. 2006; 19:1
45. Doyle J. J. & Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull*. 1987; 19:11-15.
46. Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook A. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory. Second Edition. New York. 1989; 6-60.
47. Machado C. A. S., Formiga K. M., Ortiz M. F., Sousa B. A. C, Alves G. J. A. & Batista, J. Isolamento e caracterização de locos microssatélites para *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) Siluriformes: Pimelodidae. *Jornada de Iniciação Científica PIBICINPA - CNPq/FAPEAM*. 2010; 6 pp.

48. Revaldaves E., Pereira L. H., Foresti F. & Oliveira C. Isolation and characterization of microsatelliteloci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology*. 2005; 5: 463- 465.
49. Belkhir K., Borsa P., Chichi I., Raufast N. & Bonhomme F. GENETIX 4.05.2, logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France. 2004.
50. Peakall R. & Smouse P. E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra. 2006. Disponible via <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenALEX>.
51. Weir B. S. & Cockerham C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 1984; 38:1358- 1370.
52. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978; 89: 583- 590.
53. Wright S. *Evolution and the genetics of populations. The theory of gene frequencies*. Chicago: University of Chicago Press. Vol. 2. 1969.
54. Falush D., Stephens M. & Pritchard J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003; 164:1567-1587.

55. Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000; 155: 945–959.
56. Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005; 14:2611-2620.
57. Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny inference package) versión 3.05 general information manual. University of Washington, Seattle, Washington. 1993; 132 pp.
58. Page R. D. M. TREEVIEW. Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows. Division of Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow. Glasgow, Scotland, UK. 1996.
59. Kossowski C. Perspective de L'élevage des poissons-chats (Siluroidei) en Amérique du Sud. *Aquatic Living Resources*. 1996; 9: 189-195.
60. Goulding, M. *The Fishes and the Forest, Explorations in Amazonian Natural History*. University of California Press, Berkeley, USA. 1980.
61. Moncada, G, T. & Ríos, G. J. Análisis socioeconómico de la pesquería de grandes bagres en Iquitos, Perú. Tesis para optar el título de profesional de Biólogo. Universidad nacional de la Amazonía Peruana. 2002; 70p.
62. García A., Tello S., Vargas G. & Duponchelle F. Pattern of commercial fish landings in the Loreto region, Peruvian Amazon between 1984 and 2006. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2008.

63. Montreuil V. Situación regional del manejo de las pesquerías de los grandes bagres migratorios amazónicos, Informe técnico. Iquitos – Perú. 2000; 14 pp.
64. Garcia D. C., Duponchelle F., Castro R. D., Villacorta J., Quérouil S., Chota M. W., Nuñez J., Romer U., Carvajal V. F. & Renno J. F. Molecular identification of a cryptic species in the Amazonian predatory catfish genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1962) from Peru. *Genética*. 2013; 12pp.
65. Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayad W.G. & Hodgkin T. Molecular tools in plant genetic resources: A guide to the technologies. IPGRI. Rome-Italy. 1997.
66. Azofeifa-Delgado A. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. 2006; 17(2): 221-242
67. Selkoe K.A. & Toonen R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett*. 2006; 9(5):615-29
68. McNeely.JA, Miller KR, Reid WV, Mittmeier RA & Werner TB.. Conserving the world biological diversity. Switzerland: World Conservation Union. Publication services. 1990.
69. Orozco-Berdugo G. Evaluación de la estructura genética de la población de bocachico *Prochilodus magdalenae* (characiformes, prochilodontidae) en la cuenca del río Magdalena y sus principales tributarios - Colombia. Tesis de maestría. Universidad del Magdalena. 2013.

70. Rodríguez-Bravo J. A., Iglesias-Vásquez A., Renno J-F., Alcántara F., García-Dávila C. R. Variabilidad Genética de *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) y *Pseudoplatystoma tigrinum* (Valenciennes, 1840) en la Amazonía Peruana. *Folia Amazónica*. 2007; 16(1-2): 145-152.
71. Castro, J., C. Bouza, P. Presa, A. Pino-Querido, A. Riaza, I. Ferreiro, L. Sánchez & P. Martínez. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture*. 2004; 242: 119-135.
72. Pereira LHG., Foresti F. & Oliveira C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. *Ecology of Freshwater Fish*. 2009; 11pp.
73. Carvajal-Vallejos F. M., Duponchelle F., Desmarais E., Cerqueira F., Querouil, S., Nuñez J., García C. & Renno J.-F. Genetic structure in the Amazonian catfish *Brachyplatystoma rousseauxii*: influence of life history strategies. *Genetics and Evolution*. 2014; 142,14
74. Frankham R.; Ballou J. D. & Briscoe D. A. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Sociedade Brasileira de Genética. 2008; 280pp.
75. Pouyaud L. & Sudarto Teugels G. G. The different colour varieties of the Asian arowana *Scleropages formosus* (Osteoglossidae) are distinct species: morphologic and genetic evidences. *Cybium*. 2003; 27(4): 287-305.

76. Saint-Paul U., Zuanon J., Villacorta M. A., Garcia M., & Fabre N. N. Fish communities in central Amazonian white- and black water flood plains. *Environmental Biology of Fishes*. 2000; 57: 235-250.
77. Cala, P. Presencia de *Osteoglossum* em los Llanos (Orinoquia). *Acta Zoológica Colombiana*. 1973; 18, 8.

ANEXOS

Anexo 1. Colecta, codificación y conservación de *Pseudoplatystoma punctifer*



Anexo 2. Nombre del microsatélite, motivo de repetición, secuencia y rango del tamaño de los alelos de los siete marcadores microsatélites utilizados en este estudio.

N°	Microsatélites	Motivo de repetición	Secuencia de primers	Rango (pb)
01	Ppu2	(GT) ₁₄	F ^{FAM} : CAGAACCAGATCCAACGTCA R: CTCCCTAGACTTCCCATTTC	239– 267
02	Ppu15	(AG) ₁₂	F ^{HEX} : GGCCAAAGTAACAGGCCA R: GAGCGCCCAAGGTTTAC	322– 360
03	Pcor1	(TC) ₉ GC(TC) ₉	F ^{FAM} : AAACCCGAGGATAACCAGTC R: CAGCGTGCTACTAACACAAAC	105
04	Pcor2	(AG) ₁₉	F ^{HEX} : GATATGCAAATAAGAAGGTC R: TCTTCTGGCTTTTCCTCCTCT	199
05	Pcor5	(TC) ₈ CC(TC) ₁₅	F ^{HEX} : GACTAAGATTACACAGAGATTC R: CTTGGTGGGGAAACAGGC	155
06	Pcor8	(AC) ₁₂	F ^{HEX} : ACACCATACGCACACACTCG R: TGAGGTCTGGGTGATAAGGTC	171
07	Pcor10	(GTCTG) ₁₅ (GT) ₉ CC	F ^{HEX} : TTTAAGACAGCACAGCCTGTGGGG R: AAGACAGCGCCATAGAGTTCTGCC	173
08	Pcor21	(GT) ₁₃	F ^{FAM} : TCACCGAGAGGTCTGACCATGA R: CTGTGGTTAACCAGCTAGCAC	117

anexo 3. Condiciones para la amplificación del ADN de *Pseudoplatystoma punctifer*

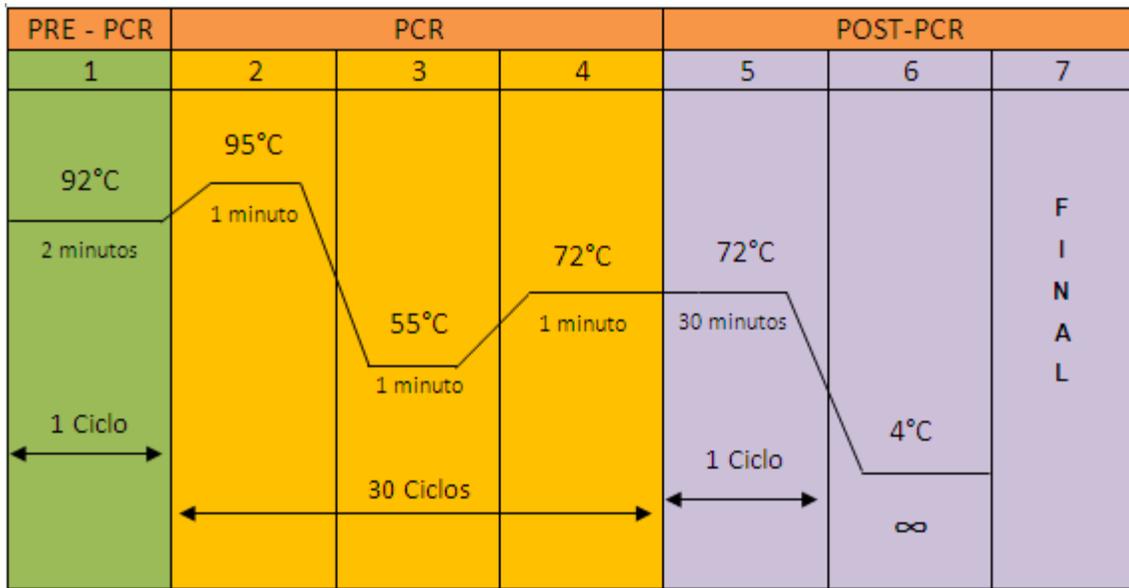
PANEL 1			
Premix	[] Inicial	[] Final	Cantidad unitaria
Buffer	10X	1X	1µL
dNTPs	2mM	0,2mM	1µL
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	0,6µL
Pcor 1F	10 µM	0,09µM	0,09µL
Pcor 1R	10 µM	0,09µM	0,09µL
Pcor 5F	10 µM	0,25µM	0,25µL
Pcor 5R	10 µM	0,25µM	0,25µL
Taq polimerasa	5 U/ µL	0,04 U/ µL	0,08µL
ADN	100ng/µL	10ng/ µL	1µL
Agua Mili-Q	-	-	5,64µL
TOTAL	-	-	10,00µL

PANEL 2			
Premix	[] Inicial	[] Final	Cantidad unitaria
Buffer	10X	1X	1µL
dNTPs	2mM	0,2mM	1µL
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	0,6µL
Pcor 2F	10 µM	0,25µM	0,25µL
Pcor 2R	10 µM	0,25µM	0,25µL
Pcor 10F	10 µM	0,08µM	0,08µL
Pcor 10R	10 µM	0,08µM	0,08µL
Taq polimerasa	5 U/µL	0,04 U/µL	0,08µL
ADN	100ng/µL	10ng/µL	1µL
Agua Mili-Q	-	-	5,66µL
TOTAL	-	-	10,00µL

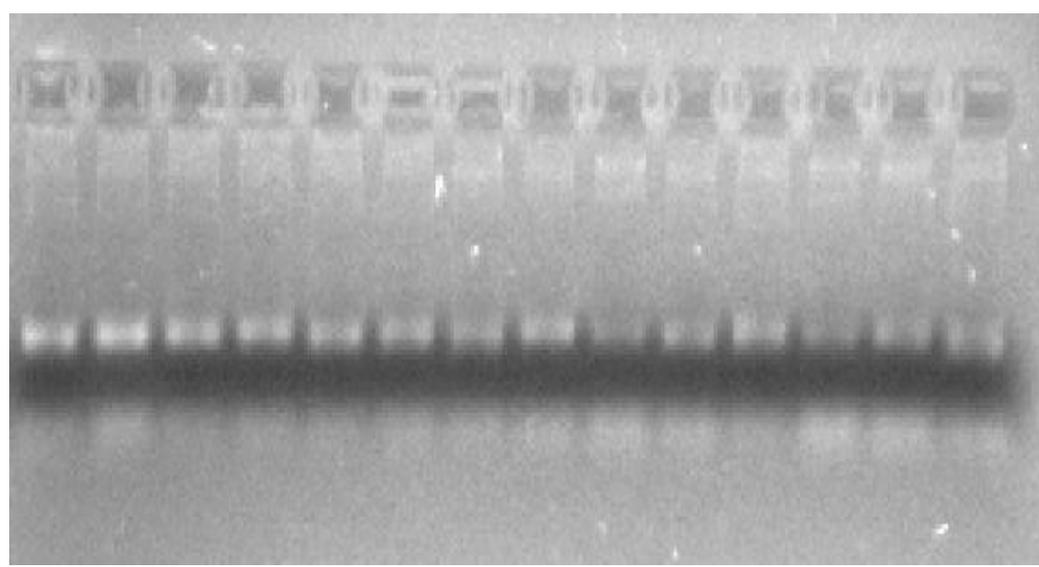
PANEL 3			
Premix	[] Inicial	[] Final	Cantidad unitaria
Buffer	10X	1X	1µL
dNTPs	2mM	0,2mM	1µL
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	0,6µL
Pcor 8F	10 µM	0,08µM	0,08µL
Pcor 8R	10 µM	0,08µM	0,08µL
Pcor 21F	10 µM	0,09µM	0,09µL
Pcor 21R	10 µM	0,09µM	0,09µL
Taq polimerasa	5 U/µL	0,04 U/µL	0,08µL
ADN	100ng/µL	10ng/µL	1µL
Agua Mili-Q	-	-	5,98µL
TOTAL	-	-	10,00µL

PANEL 4			
Premix	[] Inicial	[] Final	Cantidad unitaria
Buffer	10X	1X	1µL
dNTPs	2mM	0,2mM	1µL
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	0,6µL
Ppu 2F	10 µM	0,8µM	0,8µL
Ppu 2R	10 µM	0,8µM	0,8µL
Ppu 15F	10 µM	0,8µM	0,8µL
Ppu 15R	10 µM	0,8µM	0,8µL
Taq polimerasa	5 U/µL	0,04 U/µL	0,08µL
ADN	100ng/µL	10ng/µL	1µL
Agua Mili-Q	-	-	3,12µL
TOTAL	-	-	10,00µL

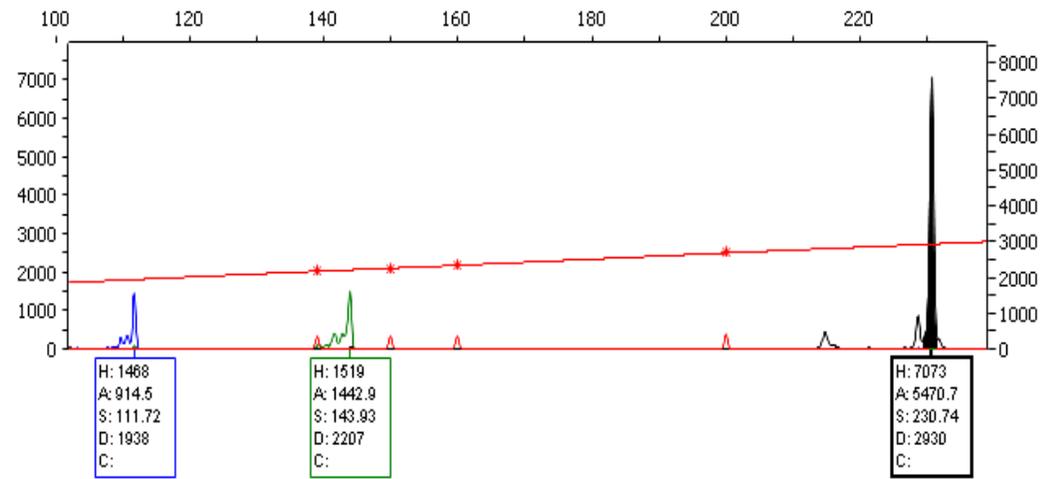
Anexo 4. Condiciones de temperatura para la PCR



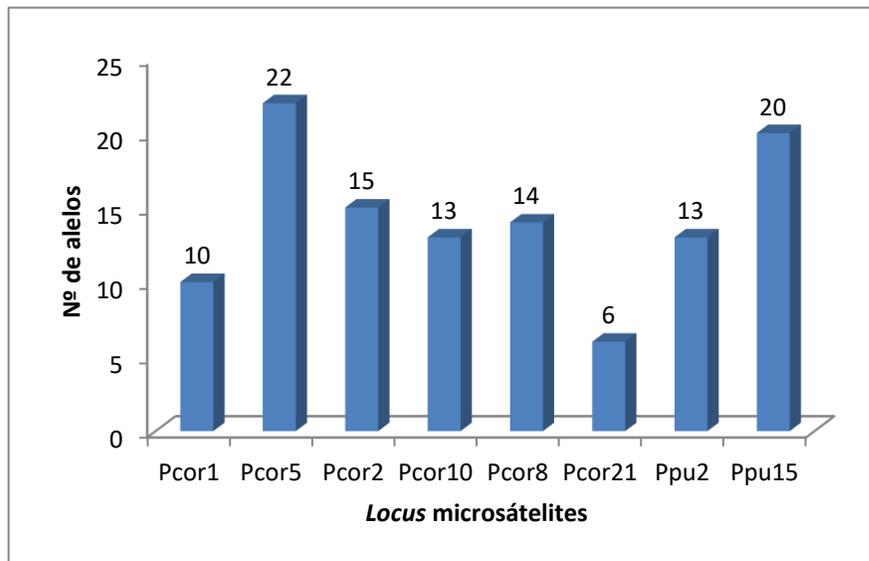
Anexo 5. Amplificación de marcadores microsatélites en gel de agarosa al 2%



Anexo 6. Tamaño de los alelos de *Pseudoplatystoma punctifer*.



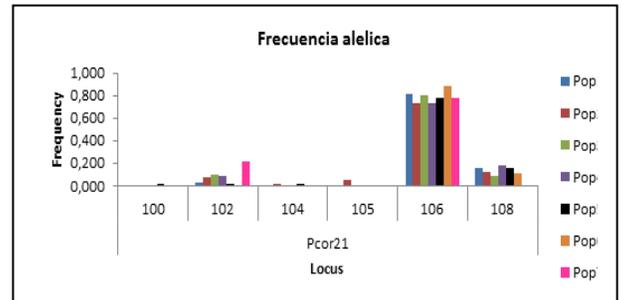
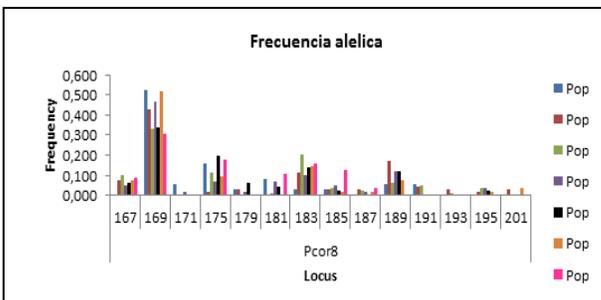
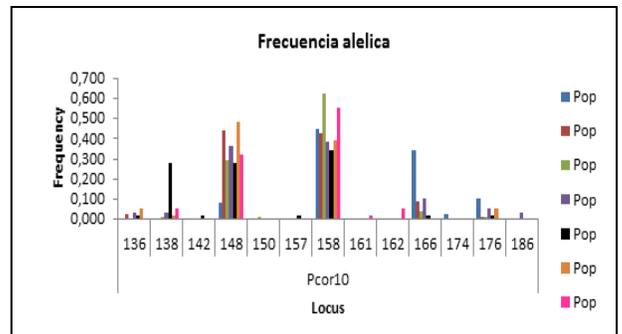
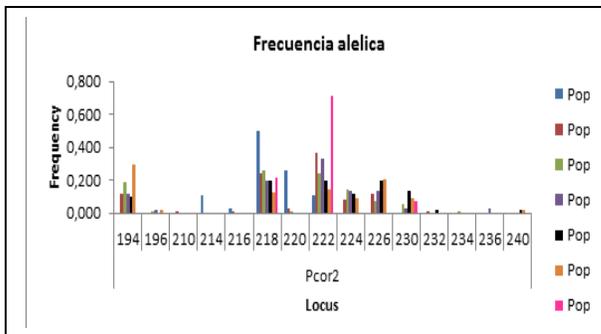
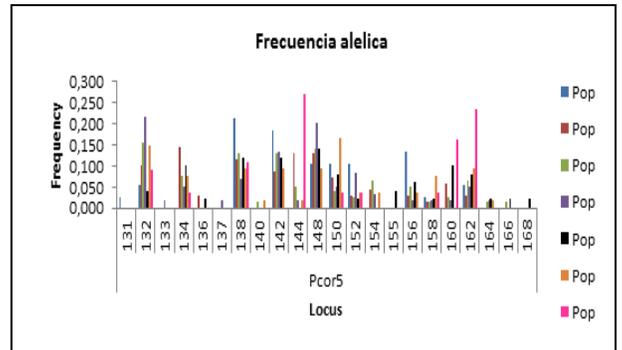
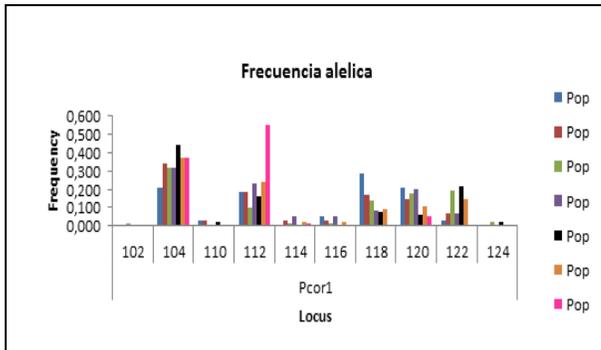
Anexo 7. Número de alelos por locus encontrado en los 203 especímenes de *Pseudoplatystoma punctifer* analizados.

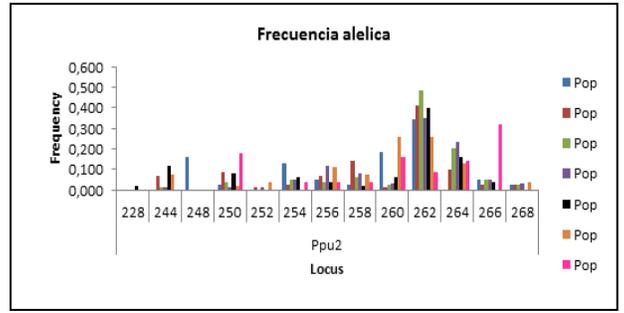
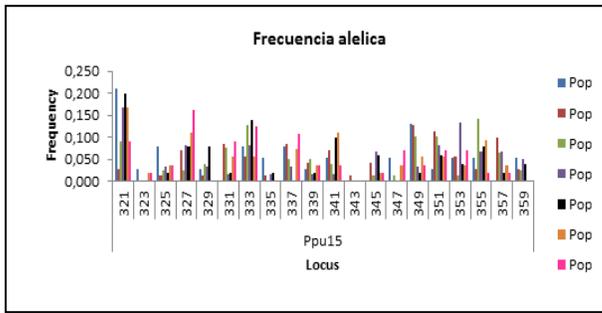


Anexo 8. Heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o) e Índice de endogamia (F_{is}) por locus en siete poblaciones naturales de *Pseudoplatystoma punctifer* en la Amazonía peruana.

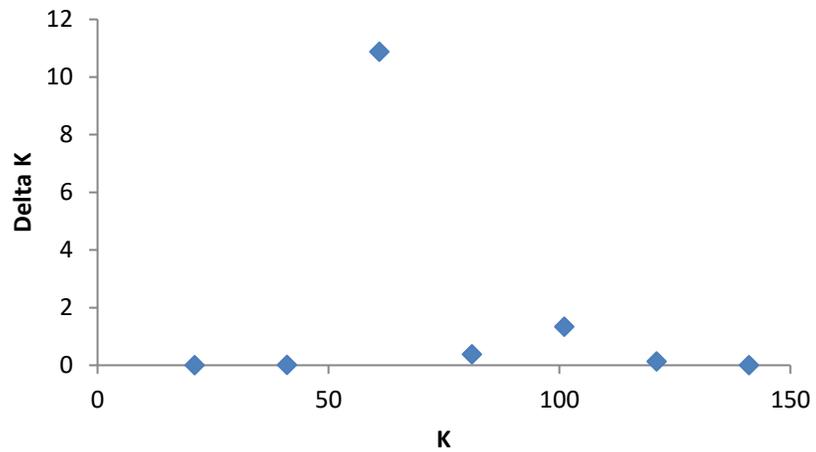
	Pcor1	Pcor2	Pcor5	Pcor8	Pcor10	Pcor21	Ppu2	Ppu15
Madre de Dios								
H_e	0,790	0,658	0,864	0,681	0,665	0,309	0,799	0,900
H_o	1,000	0,316	0,657	0,684	0,684	0,263	1,000	0,842
F_{is}	-0,24	0,539	0,232	0,023	-0,002	0,174	-0,226	0,091
Marañón								
H_e	0,791	0,768	0,902	0,762	0,612	0,444	0,778	0,922
H_o	0,857	0,771	0,857	0,657	0,657	0,286	0,514	0,714
F_{is}	-	0,010	0,065	0,152	-0,060	0,369	0,351	0,239
Putumayo								
H_e	0,797	0,809	0,901	0,812	0,516	0,329	0,707	0,914
H_o	0,615	0,846	0,846	0,667	0,615	0,231	0,385	0,763
F_{is}	0,240	-	0,074	0,192	-0,179	0,310	0,466	0,171
Ucayali								
H_e	0,789	0,797	0,873	0,743	0,703	0,426	0,794	0,912
H_o	0,600	0,700	0,833	0,667	0,733	0,167	0,567	0,833
F_{is}	0,255	0,139	0,061	0,119	-0,027	0,615	0,302	0,103
Pastaza								
H_e	0,722	0,835	0,910	0,801	0,726	0,365	0,782	0,898
H_o	0,440	0,640	0,840	0,560	0,360	0,080	0,520	0,840
F_{is}	0,407	0,253	0,097	0,319	0,519	0,789	0,353	0,085
Amazonas								
H_e	0,761	0,814	0,900	0,687	0,610	0,198	0,822	0,914
H_o	0,667	0,704	0,740	0,593	0,741	0,000	0,815	0,889
F_{is}	0,143	0,154	0,195	0,156	-0,195	1,000	0,028	0,046
Nanay								
H_e	0,550	0,439	0,824	0,814	0,584	0,337	0,8068	0,909
H_o	0,857	0,429	0,857	0,750	0,643	0,429	0,7143	0,857
F_{is}	-	0,041	-	0,096	-0,082	-0,256	0,133	0,076

Anexo 9: Frecuencias alélicas observadas en ocho locus microsatélites de *Pseudoplatystoma punctifer* analizados en siete poblaciones naturales de la Amazonía peruana.





Anexo 10: Valores de ΔK como función de K. El pico con el valor máximo de ΔK corresponde al valor de K con mayor probabilidad (en este caso K= 3).



PANEL 1			
Premix	[] Inicial	[] Final	Cantidad unitaria
Buffer	10X	1X	1 μ L
dNTPs	2mM	0,2mM	1 μ L
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	0,6 μ L
Pcor 1F	10 μ M	0,09 μ M	0,09 μ L
Pcor 1R	10 μ M	0,09 μ M	0,09 μ L
Pcor 5F	10 μ M	0,25 μ M	0,25 μ L
Pcor 5R	10 μ M	0,25 μ M	0,25 μ L
Taq polimerasa	5 U/ μ L	0,04 U/ μ L	0,08 μ L
ADN	100ng/ μ L	10ng/ μ L	1 μ L
Agua Mili-Q	-	-	5,64 μ L
TOTAL	-	-	10,00 μ L

PANEL 2			
Premix	[] Inicial	[] Final	Cantidad unitaria
Buffer	10X	1X	1 μ L
dNTPs	2mM	0,2mM	1 μ L
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	0,6 μ L
Pcor 2F	10 μ M	0,25 μ M	0,25 μ L
Pcor 2R	10 μ M	0,25 μ M	0,25 μ L
Pcor 10F	10 μ M	0,08 μ M	0,08 μ L
Pcor 10R	10 μ M	0,08 μ M	0,08 μ L
Taq polimerasa	5 U/ μ L	0,04 U/ μ L	0,08 μ L
ADN	100ng/ μ L	10ng/ μ L	1 μ L
Agua Mili-Q	-	-	5,66 μ L
TOTAL	-	-	10,00 μ L