



## Primer programa de genética de la conservación para peces en Colombia

**Autor:** Juan Carlos Narváez Barandica

**Institución:** Universidad del Magdalena

**Otros autores:** Juan Carlos Aguirre Pabón (Univerisdad del Magdalena); Gilberto Orozco Berdugo (Univerisdad del Magdalena); Daniel Castañeda V. (Univerisdad del Magdalena), Eider Muñoz (Univerisdad del Magdalena), Yuris Julio (Univerisdad del Magdalena), Ana Torregroza E. (Univerisdad del Magdalena); C. Burbano M. (Universidad de Colombia, Bogotá y Medellín); N.J. Mancera (Universidad de Colombia, Bogotá y Medellín); P.Eslava E. (Univerisdad del Magdalena); N. Chaparro (Univerisdad del Magdalena); P.J. Contreras (Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca-AUNAP); M.P. Dorado (Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca-AUNAP); A. Daza (SENA Agropecuario del Magdalena)

## Resumen

Colombia cuenta con 1435 especies nativas de peces dulceacuícolas, que representan casi el 5% de todos los peces del mundo y el 29% de Centro y Sur América. De ese total, 311 son endémicas, pero 42 están amenazadas y extintas. Diferentes factores antropogénicos amenazan la conservación de estas especies debido al deterioro ambiental y a la sobrepesca. Lo crítico es que la gran mayoría de los peces amenazados hacen parte de la composición de especies pesqueras de las principales cuencas hidrográficas, ya que miles de familias dependen directamente de ellas. Entre estas especies está el "bocachico" *Prochilodus magdalenae*, con un importante valor ecológico, social, económico y cultural en la cuenca del río Magdalena. Sin embargo, esta importancia contrasta con el descenso de sus capturas comerciales y el riesgo de estar perdiendo variabilidad genética. Para mitigar el impacto sobre sus poblaciones se han propuesto medidas tradicionales como la veda, tallas reglamentarias, prohibición de artes de pesca y los repoblamientos. Esta última medida busca minimizar los riesgos de extinción, tratando de aumentar sus abundancias en el medio natural. Lo crítico es que los repoblamientos en Colombia no están oficialmente regulados y se desarrollan de manera arbitraria porque no cuentan con los criterios técnicos y científicos. Con el propósito de mejorarlos, en este trabajo se documenta por primera vez un programa de genética de la conservación para el pez más popular de Colombia, el "bocachico". Utilizando ocho marcadores moleculares microsatélites, se identificó el riesgo que corren sus poblaciones naturales debido a la baja variabilidad genética ( $H_o0.90$ ). A pesar de esto, hoy Colombia conoce cuáles son los sectores naturales donde el bocachico es vulnerable y cuenta con los dos primeros sistemas de reproductores seleccionados genéticamente para producir las mejores crías a liberar al medio natural, de manera que se pueda minimizar el riesgo de su extinción. Aunque este programa podrá ser utilizado como modelo para los demás peces amenazados, se suministran varias recomendaciones para que sean exitosos.

**Palabras claves:** conservación; Colombia; bocachico; endogamia; variabilidad genética;

## Introducción

Colombia es reconocida por la abundancia de recursos hídricos y por su gran diversidad biológica. Sin embargo, estas propiedades biológicas se encuentran amenazadas por el deterioro ambiental, la sobreexplotación de los recursos naturales y las prácticas productivas inapropiadas (Mojica et al., 2002). El bocachico (*Prochilodus magdalenae*) es una de las especies endémica de la cuenca de los ríos Magdalena, Sinú y Atrato (Mojica et al., 2002). Su importancia no sólo está en su papel ecológico, sino el que representa para las comunidades ribereñas de estas cuencas, dado que cientos de familias derivan su sustento directamente de ella. Así mismo, es una especie que despierta intereses de aprovechamiento y conservación (Mojica et al., 2002, Santacruz, 2005) que están muy arraigados culturalmente.

Sin embargo su abundancia se ha reducido drásticamente en los últimos años hasta el punto de ser una de las especies que se encuentran en peligro de extinción (Mojica et al., 2002). En los últimos años se ha registrado que sus desembarcos han disminuido, pasando de 24.870 toneladas en 1992 a 2.818 toneladas para el 2010, representando el 30% de las capturas en la cuenca del río Magdalena (CCI, 2010). Por otro lado, se ha reportado que menos del 50% de los ejemplares capturados no logran madurar sexualmente (Martínez et al., 2006; CCI, 2007) magnificándose la problemática cuando inician las migraciones, durante la cual se intensifica la pesca (Atencio, 1997; Martínez et al., 2006; CCI, 2007). Esta disminución está relacionada con los impactos causados por las acciones humanas, tales como la contaminación, sedimentación de los ríos, la construcción de hidroeléctricas y sobre todo la pesca excesiva e introducción de especies foráneas las cuales han sido puntualizadas como las principales causas de agotamiento de las comunidades de peces migratorios que podría estar limitando su capacidad de supervivencia (Agostinho et al., 2005; Hatanaka et al., 2006).

Siendo evidente la degradación de los ambientes acuáticos naturales, para mitigar los efectos negativos a la cual está siendo sometida la población de *P. magdalenae* se han utilizado medidas de control tales como la veda, tallas reglamentarias, prohibición de artes de pesca y los repoblamiento. Este último es una de las estrategias más utilizadas para la rehabilitación pesquera del *P. magdalenae*, actuando como una medida mitigadora a corto plazo, que se fundamenta en el aumento de la abundancia en medio natural. Sin embargo involucra riesgos relativos en la eficiencia de los programa de repoblamiento en cuanto a sus resultados, ya que se realizan sin criterios científicos (entre ellos los genéticos) que respalden dicha acción. Este hecho puede magnificar la problemática de su conservación llevando a una pérdida de variabilidad genética de las poblaciones receptoras, debido al inadecuado manejo que se le dan a los reproductores provenientes de las estaciones piscícolas.

A pesar de los esfuerzos realizados, estos no han sido suficientes para lograr una recuperación de la población en el medio natural, lo que hace necesario implementar

medidas preventivas que deben ser tomadas en cuanto al banco genético *in situ* del bocachico en la cuenca del río Magdalena. En este sentido, el componente genético se convierte en una herramienta importante que permitiría dar un nuevo enfoque más acorde a la situación actual para el manejo y conservación de esta población.

Diferentes análisis genéticos se han desarrollado utilizando marcadores moleculares en lotes de reproductores destinados para repoblamiento en muchas estaciones piscícolas, los cuales han representado informaciones de mucha importancia para lograr resultados expresivos en la producción y la conservación de peces (Lopera-Barrero, 2007). Estos estudios han sido desarrollados debido a la necesidad de evidenciar el hecho que la pérdida de variabilidad genética en los reproductores de las estaciones piscícolas se debe al inadecuado manejo reproductivo y/o por seleccionar un número insuficiente de individuos (Aho et al., 2006), los cuales pueden ocasionar graves problemas de adaptabilidad, endogamia y supervivencia de las progenies utilizadas en programas de conservación (Povh et al., 2008). Esos problemas pueden consecuentemente afectar las poblaciones naturales de peces y el ecosistema en general, pudiendo llevar así la extinción de una especie.

En este sentido, comprender como se distribuyen las frecuencias alélicas en un área geográfica determinada, nos permitiría conocer si la población está conformada por un solo *stock* o no, identificando de esta manera poblaciones locales las cuales son una herramienta esencial para guiar los programas de manejo y conservación en una especie. En general, es evidente la necesidad de suministrar pautas que permitan corregir los planteamientos de manejo y conservación para los bocachicos en Colombia. Para contribuir, en este trabajo se investigó la condición genética de poblaciones salvajes y cautivas destinadas a la producción de semillas de bocachico para conocer su estado genético, lo que aportara datos importantes para los programas de conservación que impliquen los repoblamientos en la cuenca del río Magdalena y sus tributarios, de modo que no solo se conserve una especie de importancia comercial, sino que también se conserve y se mantenga el patrimonio genético de esta especie en la cuenca.

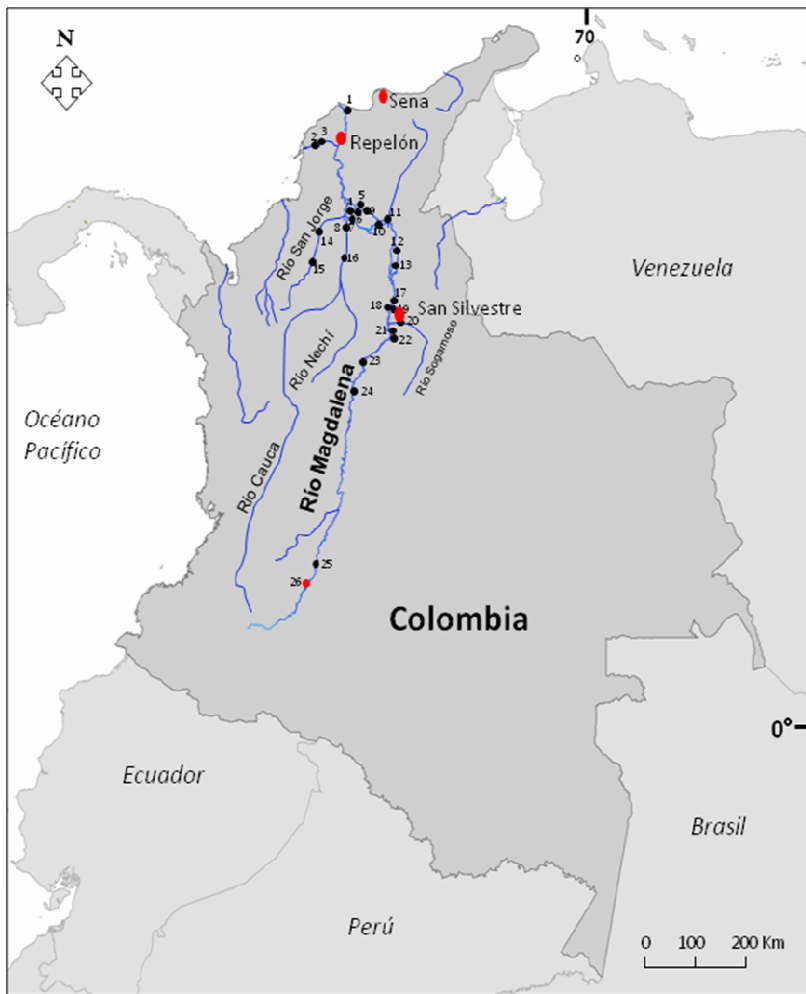
## **Materiales y Métodos**

### **Localidades de recolecta, obtención y preservación del material biológico**

Las muestras de tejido muscular de 788 individuos de bocachico (*P. magdalenae*) fueron recolectadas entre los meses de abril y noviembre de 2010 (a excepción de las muestras tomadas en la localidad de Neiva y Represa de Betania) y preservados en alcohol etílico al 96%. Entre 16 y 47 individuos fueron muestreados en 26 localidades a lo largo de la cuenca del río Magdalena y sus tributarios. Las muestras fueron obtenidas en 21 localidades ubicadas en el canal principal y ciénagas adyacentes (incluyendo muestras tomadas en la represa de Betania), y cinco localidades distribuidas en tres tributarios (Figura 1; Tabla 1).

También se seleccionaron tres centros piscícolas para el estudio, los cuales fueron: Estación Piscícola de Repelón-AUNAP, Centro Acuícola y Agroindustrial de Gaira y la estación

Piscícola de San Silvestre. La primera está bajo la coordinación de la Regional de la AUNAP y se encuentra ubicada en el municipio de Repelón, departamento del Atlántico. Esta estación posee 101 estanques que varían desde 18 m<sup>2</sup> hasta 5000 m<sup>2</sup>. La segunda es coordinada por el SENA Regional Magdalena y está ubicada en la ciudad de Santa Marta. La estación cuenta con más de 25 estanques, donde mantiene reproductores de bocachico. La tercera estación, hace parte de una asociación privada que se encuentra ubicada en el departamento de Santander y cuenta con alrededor de 47 estanques para el levante de alevines de bocachico y otras especies nativas de la región. Se marcaron y obtuvieron muestras de aleta de 688 peces de *P. magdalenae* que hacen parte de los actuales sistemas de reproductores en cada estación piscícola (433 Repelón y 255 SENA) a excepción de la piscícola San Silvestre en la cual solo se obtuvieron muestras de aleta caudal de 24 animales. Las muestras de aleta caudal del sistema de reproductores de bocachico de cada estación fueron fijadas en alcohol etílico a 96% para su posterior uso en laboratorio.



**Figura 1.** Localización de los puntos de recolecta de muestras de tejido en individuos de *Prochilodus magdalenae*. Los números representan las localidades (Tabla 1) en que las muestras fueron tomadas.

**Tabla 1.** Localidades de recolección de muestras, río y número de individuos capturados de *Prochilodus magdalenae* en el río Magdalena y sus principales tributarios.

N	Sigla	Localidad	Río	Coordenadas Geográficas	Fecha de Recolecta	NI
1	Km13	CGSM*	<i>Magdalena</i>	11°0'20.3" N - 74°39'17.6" W	Sep- 2010	20
2	CDG	Gambote		10°10'07.1" N - 75°18'01.9" W	Nov- 2010	16
3	CDM	Mahates		10°14'31.7" N - 75°12'20.5" W	Nov- 2010	25
4	PAJ	Cga Pajarales		09°16'38.7" N - 74°38'44.5" W	Jun- 2010	25
5	PIJ	Cga Pijiño		09°19'45.6" N - 74°27'15.6" W	Jun- 2010	47
6	GUAC	Cga Guacamayal		09°16'38.7" N - 74°38'44.5" W	Jun- 2010	29
7	PAL	Palomino		08°55'09.2" N - 74°26'21.5" W	Oct- 2010	30
8	SP	Santa Paula	<i>Cauca</i>	08°51'17.1" N - 74°28'05.4" W	Oct- 2010	25
9	MOMP	Mompós	<i>Magdalena</i>	09°14'12.0" N - 74°27'11.3" W	Oct- 2010	43
10	BL	Barranco de Loba		08°57'05.2" N - 74°06'34.7" W	Ago- 2010	39
11	ZAP	Cga Zapatosa		09°04'50.7" N - 73°54'31.8" W	Jul- 2010	22
12	LG	La Gloria		08°36'54.9" N - 73°48'09.2" W	Abr- 2010	45
13	GAM	Gamarra		08°19'11.8" N - 73°44'43.0" W	Jul- 2010	46
14	SBA	San Benito de Abad	<i>San Jorge</i>	08°55'40.9" N - 75°01'30.3" W	Oct- 2010	45
15	SM	San Marcos		08°39'46.5" N - 75°08'07.0" W	Oct- 2010	39
16	CAU	Cauca	<i>Cauca</i>	Sector -bajo		25
17	PW	Puerto Wilches	<i>Magdalena</i>	07°20'52.6" N - 73°54'51.3" W	Abr- 2010	33
18	PWCG	Cga Canta Gallo		07°22'44.3" N - 73°55'09.1" W	Oct- 2010	16
19	PWCP	Cga de Paredes		07°20'55.5" N - 73°54'21.9" W	Oct- 2010	30
20	SOG	Sogamoso	<i>Sogamoso</i>	07°10'17.4" N - 73°33'31.2" W	Mar- 2010	20
21	LLANITO	Cga Llanito	<i>Magdalena</i>	07°10'14.3" N - 73°51'03.5" W	Mar- 2010	20
22	CHAVA	Cga San Silvestre		07°05'37.5" N - 73°50'24.5" W	Mar- 2010	20
23	PB	Puerto Boyacá		05°58'48.3" N - 74°35'45.7" W	Abr- 2010	40
24	DC	La Dorada		05°27'18.3" N - 74°39'42.5" W	Abr- 2010	40
25	N	Neiva		02°10'03.3" N - 75°52'04.5" W	Dic- 2011	19
26	BET	Represa de Betania		02°41'39" N - 75°32'47" W	Nov- 2011	29

\*CGSM= Ciénaga Grande de Santa Marta

## Fase de Laboratorio

A cada muestra de tejido muscular/aleta se le extrajo ADN, mediante el kit comercial de extracción MasterPure™ de Epicentre Biotechnologies®. Una vez realizada la extracción de ADN, se verificó la obtención y calidad del mismo en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio y corrido en una cámara de electroforesis horizontal a 80 voltios durante 40 minutos. La visualización del gel se realizó en un fotodocumentador *Biodoc UVP LLC* con transiluminador de luz ultravioleta.

Para el estudio se amplificaron siete loci microsatélites específicos de *Prochilodus lineatus* propuestos por Rueda et al. (2011), cuya amplificación cruzada fue probada exitosamente en *P. magdalenae*. Se seleccionaron los más polimórficos: PL3, PL14, PL23, PL28, PL34, PL64 y PL119. Para la amplificación de los loci microsatélites seleccionados, se siguieron las condiciones de PCR propuestas por el autor. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl, quedando las concentraciones finales del buffer de reacción en 1X; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM de dNTPs; 0.2 µM de cada primers; y 0.25 U de *Taq* polimerasa. Para todos los loci se utilizó una temperatura inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos; luego se aplicaron 30 ciclos con las siguientes condiciones: una temperatura de desnaturalización de 95°C por 30 s; la de anillaje para cada loci (Tabla 2) durante 30 s; la de extensión fue de 72°C por 30 s; y al final de los ciclos se aplicó una temperatura de extensión de 72°C por 10 minutos. Los amplicones fueron verificados en geles de agarosa al 2%.

La genotipificación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis capilar con el equipo QIAGEN QIAxel Advanced, utilizando el cartucho de alta resolución. El tamaño de cada amplificado se determinó con el programa computacional QIAxel ScreenGel versión 1.0, utilizando un marcador de alineamiento entre 15 y 1000 pb que migró con cada set de 95 muestras. Cada muestra se consideró heterocigota cuando la altura máxima del pico menor fue superior al 70% de la altura máxima del pico mayor, en caso contrario o cuando un sólo pico estuvo presente se consideró homocigota.

**Tabla 2.** Secuencia de primers, tamaño de los locus y condiciones de amplificaciones (T<sub>m</sub> temperatura de anillaje) de los microsatélites para *P. magdalenae*.

Locus	Secuencia de primers (5'-3')	Tamaño de los alelos (bp)	T <sub>m</sub>
PL 3	F: 5'- TCTGAGCTGTGAGGAATGGA -3' R: 5'- AGAGCGCTCAAGCACAAGAT -3'	161-214	50°C
PL 28	F: 5'- GAAGCTTGGGCTCTTGACAT -3' R: 5'- CGTTTGCCTCTAGCCTTTTG -3'	220-257	59°C
PL 23	F: 5'- TTGGCTACTTCCCCAAACAC -3' R: 5'- GGGGAAGTACTTTGACGATGC -3'	195-250	59°C

PL 14	F: 5'- TGCCCAACACTGAAACTGAG -3' R: 5'- CTCATCAACCTGCCTGGAAT -3'	103-164	61°C
PL 119	F: 5'- GAAAAAGGCTAGGGGACTGG- 3' R: 5'- GAGGAAAAT TGCCTT TTGTAGG- 3'	152-209	58°C
PL 34	F: 5'- GAGCGGATTCTCCACATGAT -3' R: 5'- TAATGTGCTCCCTCCCACAG -3'	160-211	56°C
PL 64	F: 5'- AGAGCAACACAGGGAGGAGT- 3' R: 5'- ACGCTCTGCTCAGCCATACT- 3'	152-187	62°C

## Análisis de la información

### Caracterización de la variabilidad genética intrapoblacional

Para cuantificar la variación genética de cada una de las localidades y centros piscícolas, se calculó el número de alelos por locus ( $N_a$ ), la heterocigosidad genética esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ), además del número de alelos privados para cada *locus* registrados en la población con el paquete computacional GenAEx 6.0 (Peakall & Smouse, 2006).

Para probar si los grupos de muestras (localidades de medio natural y en las estaciones piscícolas) están o no en Equilibrio Hardy-Weinberg (E-HW), se realizó el test de probabilidad de Guo y Thompson por locus y para cada localidad (Guo & Thompson, 1992). Con el fin de determinar si la desviación del E-HW fue por exceso o déficit de heterocigotos, se realizó una prueba de puntaje U (U-score). Estas pruebas se realizaron con ayuda del programa GENEPOP v4.0 (Raymond & Rousset, 1995). Las pruebas de desequilibrio de ligación fueron realizadas en este mismo programa, basándonos en la hipótesis nula que los genotipos de un locus determinado son independientes de otro locus, es decir, que no están ligados.

Para verificar la presencia de cuellos de botella en las localidades y los centros piscícolas, se realizaron diferentes pruebas utilizando el programa BOTTLENECK (Cornuet & Luikart, 1996). La primera prueba consistió en el método gráfico propuesto por Luikart & Cornuet (1998) y la segunda prueba consistió en la utilización del *test* de Wilcoxon que evalúa el exceso de heterocigotos en caso de un cuello de botella reciente (Cornuet & Luikart, 1996).

Para determinar la existencia de diferenciación significativa en cuanto a la distribución genética entre las localidades muestreadas en medio natural, se estimó el índice de fijación  $F_{ST}$  de Wright (1978), entre par a par utilizando el método de Weir & Cockerham (1984) con la ayuda del programa ARLEQUÍN 2000 (Schneider *et al*, 2000). Adicionalmente se hizo un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) para conocer cuáles de los componentes dentro de las comparaciones entre tipo de población explicó la variación genética. Para este análisis se usó el programa Arlequín 2000 (Schneider *et al*, 2000).



En cada estación piscícola se estableció un sistemas de cruces entre los reproductores de *P. magdalenae* que fueron previamente marcados (a excepción de la estación piscícola San Silvestre). El sistema de cruces consistió en simulaciones que tuvieron en cuenta el genotipo de cada reproductor con relación a cada locus. Se hallaron los gametos de cada reproductor (Machos y Hembras) generando un informe con las posibles parejas que se podrían formar de acuerdo a la cantidad de loci microsatélites en común. Este informe, proporciona un listado de los mejores machos y las mejores hembras para cada macho, además arroja los valores de los estadísticos indicadores de variabilidad ( $H_o$  y  $H_e$ ) y de endogamia ( $F_{is}$ ) para cada uno de los cruces simulados. Debido a la gran cantidad de cálculos que se requiere, decidimos desarrollar una aplicación a la medida, que aproveche el poder de procesamiento en paralelo que ofrecen los procesadores modernos. La tecnología empleada fue C# 5.0 usando PLINQ. En un computador Core I7 de segunda generación con 8 núcleos virtuales, la generación de los informes tomo entre 6 y 7 minutos.

Con base a los resultados encontrados se propusieron los individuos óptimos para establecer los nuevos sistemas de reproductores para las dos estaciones piscícolas (Repelon y SENA). Además se desarrolló una base de datos, en la cual se enlistaron los peces que clasificaron al sistema a partir de la información genética. La base de datos incluye la información concerniente al código de cada animal, sexo, la información genotípica de cada pez y los cruces de cada macho con las hembras que mejor demostraron los parámetros genéticos.

## Resultados

### Variabilidad genética intrapoblacional

#### ***Localidades de Medio Natural***

Una considerable variabilidad genética fue observada en la población de *P. magdalenae* distribuida en las 26 localidades muestreadas. Fueron observados 290 alelos entre los 788 individuos de bocachico para los siete locus microsatélites utilizados, variando de 33 a 59 para los locus PL64 y PL119, respectivamente (Tabla 3). El número promedio de alelos por locus en toda la población fue de  $41.4 \pm 9.6$  y el promedio de alelos en cada localidad de muestreo vario entre 9.57 (Ciénaga de Canta Gallo) y 18.42 (Ciénaga de Pijiño). La heterocigosidad esperada y observada promedio variaron entre 0.8289 (Ciénaga de Canta Gallo) a 0.9188 (Puerto Boyacá) y de 0.19 (Río Cauca) a 0.33 (Neiva), respectivamente. Con respecto al coeficiente de endocruzamiento, los valores promedio para este índice variaron entre 0.624 (Ciénaga San Silvestre) a 0.777 (Ciénaga de Pajarales).

**Tabla 3.** Numero de alelos (NA), heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho) e índice de endocruzamiento (Fis) obtenidos para los siete *loci* microsatélites en 788 individuos de *P. magdalenae* muestreados en 26 localidades en la cuenca del río Magdalena y sus tributarios.

Locus	NA	He	Ho	Fis
PL3	37	0,871	0,230	0,731
PL14	49	0,940	0,322	0,650
PL23	43	0,877	0,362	0,576
PL28	34	0,840	0,099	0,878
PL34	35	<b>0,784</b>	<b>0,070</b>	<b>0,910</b>
PL64	<b>33</b>	0,878	<b>0,481</b>	<b>0,442</b>
PL119	<b>59</b>	<b>0,953</b>	0,365	0,609
<b>Total</b>	290	0,87 ± 0,005	0,276 ± 0,013	0,685 ± 0,063

#### **Centros Piscícolas**

Entre las dos estaciones se observó un promedio  $32.5 \pm 0.7$  de alelos/locus, con presencia de 95 alelos únicos, de los cuales 54 correspondieron a la estación piscícola de Repelón y 41 a la del SENA. Para el caso de Ho, en ambas estaciones fue inferior a 0.5, siendo la estación piscícola de Repelón la que presentó el menor promedio con  $0.267 \pm 0.16$ , el cual osciló entre 0.04 (PL 28) y 0.435 (PL 119).

Con respecto a He, en ambas estaciones fue superior a 0.879, siendo la estación piscícola del SENA la que tuvo un promedio  $0.94 \pm 0.014$ , la cual estuvo entre 0.922 (PL 64) y 0.958 (PL 3). Con relación al (Fis) se observó que la mayor consanguinidad la presentó la estación piscícola de Repelón con un promedio de  $0.714 \pm 0.16$ , siendo el locus PL 28 el más endogámico con respecto a los demás locus (Tabla 4).

Para la estación piscícola San Silvestre, se observó que para los 24 animales caracterizados utilizando todos los loci, una heterocigosidad observada relativamente mayor en comparación con el SENA y Repelón, encontrando un valor promedio de  $0.306 \pm 0.041$ . Para la heterocigosidad esperada se registro un valor de  $0.937 \pm 0.0098$ .

**Tabla 4.** Parámetros de Variabilidad genética de los dos sistemas de reproductores de Bocachico (*P. magdalenae*) global y por estación piscícola.

Población		PL28	PL3	PL23	PL119	PL14	PL34	PL64	promedio	Desviación
Repelón	N	397	396	403	395	374	408	397	396	10,6
	Na	25 (2)	28(4)	32(3)	51(15)	49(22)	24(2)	25(6)	33(8)	11,6
	Ho	0,04	0,225	0,409	0,435	0,318	0,083	0,363	0,267	0,16

	He	0,892	0,902	0,948	0,965	0,964	0,879	0,914	0,923	0,04
	Fis	0,955	0,751	0,568	0,548	0,67	0,905	0,603	0,714	0,16
Sena	N	262	243	264	248	237	276	264	256	13,9
	Na	32(9)	35(11)	32(3)	39(3)	27	29(7)	27(8)	32(6)	4,4
	Ho	0,065	0,481	0,341	0,508	0,177	0,264	0,511	0,335	0,17
	He	0,943	0,958	0,939	0,956	0,926	0,942	0,922	0,94	0,014
	Fis	0,931	0,497	0,636	0,467	0,808	0,719	0,444	0,643	0,18
Global	N	659	639	667	643	611	684	661	652	23,4
	Na	34	39	35	54	49	31	34	39	8,7
	Ho	0,053	0,353	0,375	0,471	0,247	0,174	0,437	0,301	0,15
	He	0,918	0,93	0,944	0,961	0,945	0,911	0,918	0,932	0,018
	Fis	0,943	0,624	0,602	0,507	0,739	0,812	0,524	0,679	0,16

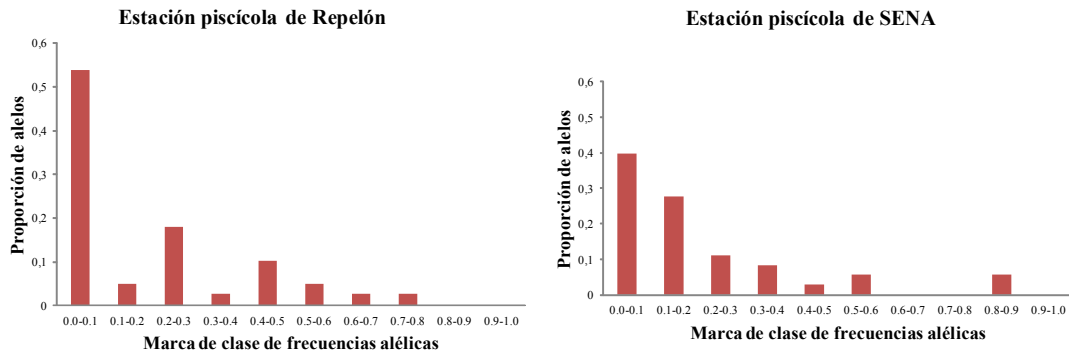
N: Número de individuos; Na: Número de alelos por locus; (): Numero de alelos únicos; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada; Fis: Índice de fijación; Desviación estándar.

Las 26 localidades muestreadas, así como los tres centros piscícolas se presentaron fuera de las proporciones esperadas para el equilibrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) para los siete locus microsatélites utilizados. Este resultado también fue evidenciado de acuerdo a los valores registrados en el índice de endocruzamiento (Fis), donde el valor positivo de este índice sugiere la existencia de un déficit de heterocigotos en las poblaciones.

Por otro lado, no fue encontrada evidencia de desequilibrio de ligación para las asociaciones no aleatorias entre los genotipos de los siete *loci* microsatélites utilizados en las 26 localidades muestreadas, sugiriendo que los análisis pueden ser ejecutados asumiendo independencia estadística entre los *loci*.

### Cuello de botella

De acuerdo a los métodos utilizados para la detección de cuellos de botella en las poblaciones muestreadas, se pudo verificar que a través del método grafico y la prueba de Wilcoxon, las poblaciones han atravesado recientemente por cuellos de botella que han dejado rastros en los valores de diversidad génica registrados para cada población. Este hecho fue más evidente en las estaciones piscícolas, destacando la estación de Repelón y SENA (Figura 2).



**Figura 2.** Prueba grafica de cuello de botella. Histogramas de distribución de frecuencias alélicas para la población de *p. magdaleneae* en las dos estaciones piscícolas.

### Diferenciación Genética

Los valores de  $F_{st}$  obtenidos para el bocachico entre cada par de las 26 localidades muestreadas vario entre -0.00038 observado entre la localidad de Mompós y Puerto Boyacá y 0.14713 entre la Ciénaga de Canta Gallo y el Río Sogamoso. De acuerdo a la escala propuesta por Wright (1951), valores entre 0 y 0.05 indican una baja diferenciación genética, entre 0.05 y 0.15 indican una moderada diferenciación, entre 0.15 y 0.20 indican una alta diferenciación y valores por encima de 0.25 indican una gran diferenciación genética; para las 26 localidades muestreadas para el bocachico en la cuenca del río Magdalena y sus principales tributarios, se pudo observar que la población presenta una baja a moderada diferenciación genética, considerando los siete locus microsatélites utilizados.

Con el análisis molecular de varianza (AMOVA) se pudo verificar los niveles de diferenciación genética entre las localidades. Fue observada una moderada diferenciación genética ( $F_{st}= 0.06511$ ;  $P= 0.000$ ) para todas las localidades, mostrando que el 6.51% de la variabilidad genética se encuentra entre la localidades muestreadas.

## Sistema de cruces en las estaciones piscícolas

Con base a los tres estadísticos indicadores de variabilidad genética ( $H_o$ ,  $H_e$ , y  $F_{is}$ ) mostrados por el programa computacional Sistema de Información de Reproductores (SIREP) se puede observar en las tablas 5 y 6 el número de cruces realizados con 4,5,6 y 7 loci microsatélites el número de machos y hembras que fueron apareadas mediante la simulación, así como también el número de gametos y cigotos esperados, los promedio de ( $H_o$ ,  $H_e$ , y  $F_{is}$ ) de todos los cruces posibles en cada estación piscícola.

**Tabla 5.** Resumen de Numero de cruces, Números de machos y Hembras cruzados, Gametos esperados, Cigotos esperados, heterocigosidad promedio observada y esperada ( $H_o$  y  $H_e$ ) Promedio de índice de endogamia ( $F_{is}$ ) teniendo en cuenta los numero de loci en la estación piscícola de Repelón.

N° loci	N° cruces	Número de individuos			Gametos esperados	Cigotos esperados	Ho promedio	He promedio	Fis promedio
		Total	♂	♀					
7	19418	279	146	133	128	16384	0,921± 0,096	0,530 ±0,057	-0,74
6	31842	257	183	174	64	4096	0,922± 0,103	0,528 ±0,060	-0,75
5	40257	402	213	189	32	1024	0,930± 0,108	0,532 ±0,065	-0,754
4	46530	433	235	198	16	256	0,929± 0,121	0,521± 0,072	-0,789

**Tabla 6.** Resumen de Numero de cruces, Números de machos y Hembras cruzados, Gametos esperados, Cigotos esperados, heterocigosidad promedio observada y esperada ( $H_o$  y  $H_e$ ) Promedio de índice de endogamia ( $F_{is}$ ) teniendo en cuenta los numero de loci en la estación piscícola de SENA.

N° loci	N° cruces	Número de individuos			Gametos esperados	Cigotos esperados	Ho promedio	He promedio	Fis promedio
		Total	♂	♀					
7	4640	128	80	58	128	16384	0,937± 0,084	0,560± 0,055	-0,679
6	7956	180	102	78	64	4096	0,948± 0,080	0,558± 0,053	-0,705
5	16000	253	128	125	32	1024	0,944± 0,093	0,553± 0,059	-0,714
4	23256	255	152	153	16	256	0,945± 0,103	0,555± 0,067	-0,71

### Selección de individuos para el nuevo sistema de reproductores

Con base a los resultados obtenidos por SIREP en la tabla 7 y 8 se puede observar un resume de las primeras 40 parejas utilizando 7 loci microsateles que obtuvieron progenies con valores óptimos de variabilidad genética para hacer parte del lote de reproductores caracterizado genéticamente en cada una de las estaciones piscícolas

**Tabla 7.** Resumen de las primeras 40 parejas utilizando 7 loci microsateles que obtienen los estadísticos indicadores de variabilidad genética óptimos en sus progenies para establecer el sistema de reproductores de *P. magdalenae* en la estación piscícola de Repelón.

♂	♀																							
2DD5	2D93			2B6A			2BAC			2B05			2DFC			2DA1			2838			2ABE		
	1	0,571	-0,75	1	0,589	-0,69	1	0,589	-0,7	1	0,57	-0,75	1	0,57	-0,75	1	0,59	-0,7	1	0,64	-0,56	1	0,61	-0,65
2C1F	2B55			2B6A			2C7B			2BAC			2B05			2DFC			2825			27BF		
	1	0,571	-0,75	1	0,554	-0,80	1	0,518	-0,93	1	0,55	-0,81	1	0,54	-0,87	1	0,54	-0,87	1	0,54	-0,87	1	0,57	-0,75
2BCF	2D93			2B6A			2C7B			2A93			27BF			2ABE			277D			2DE6		
	1	0,554	-0,806	1	0,571	-0,75	1	0,536	-0,87	1	0,59	-0,7	1	0,59	-0,7	1	0,59	-0,7	1	0,55	-0,81	1	0,57	-0,75
2B4E	2D93			2B55			2B6A			2C7B			2BAC			2B05			2A93			2DFC		
	1	0,536	-0,867	1	0,571	-0,75	1	0,554	-0,81	1	0,52	-0,93	1	0,55	-0,81	1	0,54	-0,87	1	0,57	-0,75	1	0,54	-0,87
2B89	2D93			2B55			2B6A			2C7B			2BAC			2B05			2DFC			2ABE		
	1	0,554	-0,806	1	0,589	-0,69	1	0,571	-0,75	1	0,54	-0,87	1	0,57	-0,75	1	0,55	-0,81	1	0,55	-0,81	1	0,59	-0,7

**Tabla 8.** Resumen de las primeras 40 parejas utilizando 7 loci microsateles que obtienen los estadísticos indicadores de variabilidad genética óptimos en sus progenies para establecer el sistema de reproductores de *P. magdalenae* en la estación piscícola del SENA.

♂	♀																							
2A33	2B01			284B			2CC9			2E0C			2EB0			2A60			2B09			2E33		
	1	0,571	-0,75	1	0,589	-0,69	1	0,589	-0,697	1	0,57	-0,75	1	0,57	-0,75	1	0,57	-0,75	1	0,64	-0,55	1	0,57	-0,75
2AF3	2B01			284B			2CC9			296D			2E0C			2A60			2B09			2E33		
	1	0,554	-0,80	1	0,571	-0,75	1	0,571	-0,75	1	0,58	-0,697	1	0,55	-0,80	1	0,55	-0,80	1	0,62	-0,6	1	0,55	-0,80
276C	2B01			284B			2AED			2CC9			296D			2E0C			2EB0			2A60		
	1	0,554	-0,80	1	0,571	-0,75	1	0,536	-0,867	1	0,57	-0,75	1	0,58	-0,69	1	0,55	-0,80	1	0,55	-0,80	1	0,55	-0,80
286D	284B			2AED			296D			2E0C			2EB0			2B09			2,00E+33			2947		
	1	0,554	-0,80	1	0,518	-0,93	1	0,571	-0,75	1	0,53	-0,86	1	0,53	-0,86	1	0,60	-0,64	1	0,53	-0,86	1	0,53	-0,86
2724	284B			2AED			296D			2E0C			2EB0			2947			2CF3			2A8F		
	1	0,554	-0,80	1	0,518	-0,93	1	0,571	-0,75	1	0,53	-0,86	1	0,53	-0,86	1	0,53	-0,86	1	0,53	-0,86	1	0,58	-0,69

## Discusión

En este estudio se documenta por primera vez el uso de siete loci microsatélites para evaluar el estado genético de la población de bocachico *P. magdalenae* asociada a la cuenca del río Magdalena y sus principales tributarios, así como también de tres estaciones piscícolas que comercializan semillas para su repoblamiento.

Con respecto a la variación genética, fue evidente que la población natural de bocachico y la criada en las estaciones piscícolas presentaron un potencial genético debido de la alta riqueza alélica y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ). Pero ese potencial contrastó con la situación actual del bocachico. Todas las localidades muestreadas son endogámicas ( $F_{is}$ ) y con una heterocigosidad observada ( $H_o$ ) muy baja. Según los análisis, esta última condición está asociada a un déficit de heterocigotos debido a recientes eventos de cuello de botella. Sin duda, la sobreexplotación pesquera que viene desde hace más de tres décadas (Atencio, 1997) y la pérdida y degradación de su hábitat (Atencio-García, 2000; Marrugo-Negrete et al., 2008), están causando una reducción drástica de su tamaño poblacional. Pero esta situación empeora cuando se analizó el estado genético de los reproductores de las estaciones piscícolas estudiadas, cuyos valores de  $H_o$  también fueron bajos. Lo crítico de esto, es que esta información genética es la que se está introduciendo a la población natural a través de los repetidos repoblamientos.

Es evidente que *P. magdalenae* es la especie de la familia Prochilodontidae con los niveles más bajo de variabilidad genética. Por lo tanto, los esfuerzos conjuntos por evitar que sigan bajando deben darse en el marco de las instituciones encargadas de la administración y conservación de los recursos naturales del país. Se debe ejercer mayor control y vigilancia sobre las medidas tradicionales pesqueras que ya están establecidas (vedas, tallas reglamentarias y prohibición de artes de pesca); y adicionarse más esfuerzos para que se implementen estrategias de conservación y manejo que permitan minimizar los riesgos de extinción de las poblaciones naturales. No hay que desconocer que parte de ese esfuerzo es mejorar las condiciones ambientales del río Magdalena, porque no tendría sentido pretender recuperar las condiciones biológicas y genéticas de *P. magdalenae* sino se mejora su hábitat. El análisis de subestructuración genética indicó que la población de *P. magdalenae* asociada a la cuenca del río Magdalena está subdividida genéticamente. Su explicación puede estar dada debido a la fuerte presión pesquera ejercida sobre este recurso a lo largo del cauce del río, ya que este representa la mayoría de las capturas realizadas en la cuenca del Magdalena.

En general, se demostró que para las poblaciones de *P. magdalenae* presentes en las estaciones piscícolas evidenciaron una variabilidad genética muy baja, sin embargo podrían recuperar su variabilidad ya que presentan un potencial genético debido a la alta riqueza alélica y heterocigosidad esperada.

En general, el criterio que determina cuáles son los cruces más favorables se tuvo en cuenta tres estimadores: la diversidad genética ( $H_e$ ), que debe ser alta ( $>0.50$ ); la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), que debe aumentar con respecto a las poblaciones originales ( $>0.80$ ) y el índice de endogamia ( $F_{is}$ ), que debe disminuir acercándose a cero. En este estudio se tuvo en cuenta la ( $H_o$ ) que en la mayoría de los cruces presentaron una ( $H_o > 0.9$ ), lo que significa que estas progenies probablemente pueden aumentar la variabilidad genética de las poblaciones de *P. magdalenae* en su medio natural.

## Bibliografía

Agostinho, A. A., S. M. Thomaz and L.C. Gomes, 2005. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conservation. Biol.*, 19 (3): 646-652.

Aho T., J. Rönn, J. Piironen y M. Björklund, 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture*, 253(1-4): 244-248.

Atencio, V., 1997. Identificación de áreas de desove de las principales especie reofílicas en el río Sinú. En: Resúmenes de conferencias y exposiciones del *IV Simposio Colombiano de Ictiología*, Santa Marta, 7-10/Ago/97.

Atencio-García, V. Impactos de la Hidroeléctrica Urrá en los peces migratorios del río Sinú. *Temas Agrarios* 2000; 5(9): 29-40.

CCI. Pesca y acuicultura: Colombia 2007. Corporación Colombia Internacional-INCODER, Bogotá. 2007. Pags 56.

CCI. Pesca y acuicultura: Colombia 2010. Corporación Colombia Internacional-INCODER, Bogotá. 2007. Pags 15.

Cornuet. J. & Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two test for detecting recent population bottlenecks from allelic frequency data. *Genetics*. v 144. Pags: 2001-2014.

Guo S.W. & Thompson E.A. 1992. Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* 48: 361-372

Hatanaka T, Silva FH & Galetti Jr PM. 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica* 126:153-159.

Lopera Barrero N.M, 2007. Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. Tesis PhD. Univ. Est. Maringá. Maringá, Brasil.

Martínez, H., J.C. Narvaez B., R. Rivera & O.D. Solano, 2006. Evaluación de la selectividad del trasmallo en la pesquería artesanal de la zona deltaica estuarina del río Sinú, Caribe colombiano. *Revista Intrópica* 3(1): 29-37

Marrugo-Negrete J, Benítez L, Olivero-Verbel J. Distribution of mercury in several environmental compartments in an aquatic ecosystem impacted by gold mining in northern Colombia. *Arch Environ Contam Toxicol* 2008; 55:305-316.



Mojica J, Castellanos C, Usma J, Álvarez R. (eds.). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia y Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia. 2002.

Peakall, R. & Smouse P. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. v 6. Pags. 288-295.

Povh J.A., N.M. Lopera Barrero, R.P. Ribeiro, E. Lupchinski Jr, P.C. Gomes y T.S. Lopes. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Cien. Inv. Agr.*, 35(1): 5-15.

Raymond M. & Rousset F. 1995. GENEPOP (v1.2.): Population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

Rueda, E; J. Sommer, P, Scarabotti, R, Markariani and G. Ortí, 2011. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae), *Conservation Genetics Resources*

Santacruz B. Evaluación de la variabilidad genética con marcadores microsatélites del bocachico *Prochilodus magdalenae* (Steindachner 1878) en el Río Sinú, Colombia. [Tesis de Biólogo], Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2005.

Schneider, S., D. Roessli & L. Excoffier, 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Suiza.

Weir. B & Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. v 38. n 6. pags: 1358-1370.