

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS (MCByB)
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA (IBMB)
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO (IRD)
UNIDAD DE LIMNOLOGÍA Y RECURSOS ACUÁTICOS (ULRA)



**VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Cichla aff. monoculus*
(Perciformes: Cichlidae) EN EL ALTO MADERA, BOLIVIA**

Tesis de grado para optar
al título de **Magister Scientiarum**
Mención: Ecología Acuática

Postulante: FERNANDO MARCELO CARVAJAL VALLEJOS
Tutor: Dr. Jean François Renno (IRD)
Co-Tutor: Dr. Fabrice Duponchelle (IRD)

La Paz, Bolivia
2004

A mi querida familia
con todo mi amor y admiración

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mis mejores agradecimientos al Dr. Jean François Renno y al Dr. Fabrice Duponchelle, por los conocimientos impartidos y sus sugerencias en la realización de este trabajo.

Un agradecimiento especial al Dr. Paul Van Damme, Dr. Melicio Siles y Dr. Gonzalo Ávila por su valiosa crítica al documento final.

A la Lic. Mabel Maldonado y Lic. Dylían Castellón, dos personas de la Unidad de Limnología y Recursos Acuáticos (ULRA), que me apoyaron desde los inicios de mi formación profesional y que lo siguen haciendo hasta los días presentes.

A la Dra. Celeste Rodríguez y al Dr. Alberto Giménez, como representantes del plantel docente y directivo de la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas, por los conocimientos transmitidos y la oportunidad que se me brindó para formar parte del programa.

A la Dra. Volga Iñiguez y al Lic. Nataniel Mamani del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (IBMB), por el apoyo logístico durante el desarrollo del presente trabajo.

A Rosario Rivera, Julia Barreta, Claudia Aliaga, Juan P. Torrico y Nicolas Hubert por compartir sus conocimientos durante mi trabajo de laboratorio.

A Milton, Marcelo, Carmen, Rosenka, Carla y Carmencinha, por su apoyo en esta etapa de mi vida profesional.

A todas aquellas personas anónimas que pertenecen a la UMSS, IBMB, IRD y UMSA, las cuales me cooperaron de alguna forma durante la realización de este trabajo y quienes no merecen ser olvidadas.

A Aurora, José, Javier, Patty, Maribel, Camilito, América y Daniela por haber estado siempre conmigo y haberme dado toda su ayuda a la distancia. Les quiero mucho!.

RESUMEN

Los peces del género *Cichla* están ampliamente distribuidos en Sud América y forman una parte importante de los recursos pesqueros potencialmente explotables a nivel comercial y de subsistencia. Desde aproximadamente 10 años atrás, se han comenzado a generar datos puntuales sobre sus características biológicas en ambientes naturales. Aquí se presenta la variabilidad genética encontrada en 6 grupos de *Cichla* aff. *monoculus* provenientes de los principales tributarios de la cuenca alta del río Madera en Bolivia. Los resultados fueron obtenidos al evaluar seis loci intrónicos mediante la técnica EPIC-PCR y PAGE. Dos hipótesis fueron planteadas para explicar la naturaleza de los resultados. La primera resalta la existencia de una sola especie fuertemente estructurada en relación a la distancia geográfica existente entre sus poblaciones. Cuatro poblaciones fueron identificadas como diferentes a nivel de la amazonía boliviana. De entre ellas, las poblaciones procedentes de los ríos Ichilo y Manuripi mostraron las distancias genéticas más alejadas respecto a los otros grupos considerados. La segunda hipótesis, sugiere alternativamente la existencia de dos especies putativas fuertemente estructuradas con poblaciones que corresponden a la zona geográfica de donde fueron obtenidas, basados solamente en el patrón de lectura de las bandas del locus *Aldo 1*. Ambas especies se encuentran habitando de forma conjunta la zona del río Sécore, Yata e Iténez. Sin embargo, en la cuenca del río Ichilo se encontró únicamente la especie 1 y en la cuenca del río Manuripi solamente la especie 2. Algunos modelos alopátricos y simpátricos de especiación son sugeridos como explicaciones probables para el origen de las dos especies putativas de *Cichla* en la amazonía boliviana. El suceso de dos efectos fundadores independientes hacia cuencas distintas (Ichilo y Manuripi), parecen ser la mejor explicación para la variabilidad genética encontrada, independientemente de la naturaleza taxonómica.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Índice General	iv
Índice de Cuadros	vi
Índice de Figuras	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 <i>Algunos antecedentes de la familia Cichlidae</i>	3
2.2 <i>Modos de especiación</i>	4
2.3.1 <i>Especiación alopátrica</i>	5
2.3.2 <i>La zona híbrida</i>	5
2.3.3 <i>Especiación parapátrica</i>	6
2.3.4 <i>Especiación simpátrica</i>	7
2.3 <i>Posibles causas del origen de la diversidad ictiológica en el Neotrópico</i>	8
2.4 <i>El concepto de especie en peces</i>	10
2.5 <i>El género Cichla</i>	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1 <i>Muestreo de peces</i>	13
3.2 <i>Extracción de ADN</i>	14
3.2.1 <i>Preparado de la solución de CTAB</i>	14
3.2.2 <i>Procedimiento de extracción</i>	15
3.3 <i>Técnica Exon-Primed Intron-Crossing Polymerase Chain reaction (EPIC-PCR)</i>	16
3.3.1 <i>Utilidad del EPIC-PCR en genética de poblaciones</i>	16
3.3.2 <i>Amplificación mediante EPIC-PCR</i>	17
3.3.3 <i>Revelación geles de poliacrilamida</i>	19

3.4 <i>Análisis de la variabilidad y estructura genética de las poblaciones</i>	22
3.4.1 <i>Panmixia y el equilibrio de Hardy-Weinberg</i>	22
3.4.2 <i>Niveles de estructuración de una población</i>	22
3.4.3 <i>Análisis de las poblaciones</i>	24
4. RESULTADOS	26
4.1 <i>Diferenciación genética de las poblaciones</i>	26
4.2 <i>Hipótesis 1: dos especies</i>	29
4.2.1 <i>Variabilidad genética de la especie 1 (Aldo 1, 320)</i>	29
4.2.2 <i>Variabilidad genética de la especie 2 (Aldo 1, 315)</i>	32
4.2.3 <i>Comparación del polimorfismo genético y distribución geográfica de las dos especies de Cichla aff. monoculus en Bolivia</i>	33
4.3 <i>Hipotesis 2: una especie</i>	40
4.3.1 <i>Análisis genético sin considerar el locus Aldo 1</i>	40
5. DISCUSIÓN	46
5.1 <i>Hipotesis de una especie de tucunaré y su estructuración en ríos bolivianos del alto Madera</i>	46
5.2 <i>Hipótesis de dos especies de tucunaré en Bolivia y su estructuración genética en los ríos amazónicos bolivianos</i>	48
5.2.1 <i>Especiación simpátrica hipotética</i>	49
5.2.2 <i>Especiación alopátrica y contacto secundario hipotético</i>	55
5.3 <i>Comparación entre especies putativas de tucunaré en Bolivia</i>	56
6. CONCLUSIONES	60
7. PERSPECTIVAS	62
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Detalle del número de individuos utilizados por muestra geográfica, extraídos de los sistemas fluviales más importantes en las tierras bajas de la amazonía boliviana	12
Cuadro 2. Variación de seis loci intrónicos en 10 muestras geográficas de <i>Cichla</i> aff. <i>monoculus</i> de la amazonía boliviana	27
Cuadro 3. Variación de seis loci intrónicos en dos especies putativas de <i>Cichla</i> aff. <i>monoculus</i> en los ríos amazónicos de Bolivia	29
Cuadro 4. Resumen de los parámetros de estructuración genética entre las poblaciones de la especie 1 de <i>Cichla</i> aff. <i>monoculus</i> , provenientes de los ríos amazónicos bolivianos	30
Cuadro 5. Parámetros poblacionales estimados para las muestras obtenidas de la especie dos de <i>Cichla</i> aff. <i>monoculus</i> , en los ríos amazónicos de Bolivia	32
Cuadro 6. Variación genética obtenida para las poblaciones de tucunaré provenientes de diferentes puntos de la amazonía boliviana, cuando se considera una sola especie	40
Cuadro 7. Parámetros que miden el nivel de estructuración entre las poblaciones de una sola especie de <i>Cichla</i> aff. <i>monoculus</i> , provenientes de los sistemas amazónicos de Bolivia	40

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa esquemático de los puntos de colecta en los diferentes ríos amazónicos de Bolivia 13
- Figura 2. Esquema de la amplificación de un segmento variable de ADN intrónico el cual se encuentra flanqueado por secuencias conservativas exonícas en el ADN nuclear de un eucariota 17
- Figura 3. Zona de lectura de los diferentes perfiles intrónicos encontrados en geles de poliacrilamida, para los tucunares que habitan los principales tributarios de la cuenca alta del río Madera en Bolivia 20
- Figura 4. Perfil representativo del polimorfismo de longitud en los productos de PCR encontrados al amplificar los intrones *Aldolasa B1*, *Mhc*, *Opsin* y *Actin* en *Cichla* aff. *monoculus* provenientes de la cuenca amazónica boliviana 25
- Figura 5. Representación de la correlación existente entre la distancia geográfica (por el curso natural de los ríos y a vuelo de ave) y la distancia genética obtenida 33
- Figura 6. Dendrograma de similitud (UPGMA), construido en base a las distancias genéticas obtenidas al considerar todos los loci en la especie 1 de *Cichla* aff. *monoculus* 34
- Figura 7. Distribución geográfica de *Cichla* aff. *monoculus* especie 1, en los diferentes sistemas fluviales amazónicos bolivianos 36
- Figura 8. Dendrograma de similitud (UPGMA), construido en base a las distancias genéticas derivadas del cálculo de F_{st} para las poblaciones de la especie dos de tucunaré 37
- Figura 9. Representación de la estructura genética de la especie 2 de tucunaré, a nivel de los distintos ríos amazónicos de Bolivia 38
- Figura 10. Descripción de la correlación existente entre la distancia geográfica (por el curso normal de los ríos y a vuelo de ave) y la distancia genética calculada al considerar una sola especie de tucunaré en Bolivia 41
- Figura 11. Dendrograma de similitud (UPGMA), construido según la distancia genética calculada entre todas las muestras poblacionales de tucunaré en Bolivia, sin considerar el locus *Aldo 1* 43

Figura 12. Distribución geográfica de las cuatro poblaciones de tucunaré correspondientes a una sola especie de <i>Cichla</i> aff. <i>monoculus</i> , en los ríos bolivianos que drenan a la cuenca amazónica	44
Figura 13. Representación del polimorfismo ancestral supuesto entre las especies putativas de tucunaré encontradas en los ríos de las tierras bajas amazónicas de Bolivia	48

1. INTRODUCCIÓN

Los cíclidos piscívoros de mayor tamaño en el Neotrópico son aquellos que pertenecen al género *Cichla*. En países como Brasil, Perú, Colombia y Bolivia son comunmente conocidos con el nombre de tucunaré, y en Venezuela como pavones. Su importancia en los ríos que drenan las tierras bajas de Sud América como fuente de proteínas y el símbolo que representa para la pesca deportiva ha sido motivo para su introducción en Centro América (Zaret & Paine, 1973), Hawaii (Winemiller *et al.*, 1997) y el sud-este de Brasil (Hoeinghaus *et al.*, 2003).

Hasta aproximadamente 10 años atrás, la información disponible sobre su ecología y sus rasgos de vida provenía de poblaciones introducidas o en cautiverio. Desde aquella fecha, varios trabajos sobre su ecología (Taphorn & Barbarino Duque, 1993; Winemiller *et al.*, 1997; Jepsen *et al.*, 1997; Winemiller, 2001) y sus rasgos de vida (Jepsen *et al.*, 1999) han sido llevados a cabo en ríos de Venezuela. Otros como los de Andrade *et al.* (2001) e Ibáñez (2002), proporcionaron información sobre la dinámica genética de las poblaciones en ríos brasileros y bolivianos, respectivamente.

En los ríos de Bolivia, al igual que en la mayor parte de la región Neotropical, estos peces son importantes en la pesca de subsistencia y comercial (Van Damme, 2001; Muñoz, 2002). Sin embargo, son pocos los trabajos que han sido elaborados hasta el momento con el fin de conocer sus preferencias ambientales, su explotación pesquera y el flujo genético de sus poblaciones. El conocimiento de la dinámica de las poblaciones es importante al momento de elaborar planes de manejo pesquero, acuicultura y conservación (recuperación y protección).

Ibáñez (2002), en un estudio preliminar, encontró una fuerte estructuración de poblaciones de tucunaré provenientes de tres cuencas importantes que convergen hacia el alto Madera. Motivados por aquellos resultados, el presente estudio fue realizado con el fin de generar mayor información sobre la dinámica genética de las poblaciones de *Cichla aff. monoculus*, en los principales ríos que se encuentran en la amazonía boliviana.

Bajo esta perspectiva el presente estudio pretende demostrar si:

- ❖ Los tucunares repartidos en las cuencas Ichilo-Mamoré, Orthon, Yata e Iténez representan poblaciones aisladas que corresponden a su situación geográfica.
- ❖ Cada población de tucunare considerada en las diferentes cuencas de Bolivia, posee alelos exclusivos de la zona.
- ❖ Todas las subpoblaciones individualmente se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg o panmixia.
- ❖ Existe una correlación entre la distancia genética obtenida para cada par de subpoblaciones y la distancia geográfica a vuelo de ave o por el curso normal de los ríos entre las misma subpoblaciones.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Algunos antecedentes de la familia Cichlidae*

La familia Cichlidae es uno de los mayores grupos de peces teleósteos (casi todos ellos de aguas continentales), que involucra alrededor de 2400 especies repartidas en Centro y Sud América, África, Madagascar y sud de Asia (Kullander, 1998; Farias *et al.*, 1999). Los cíclidos americanos comprenden cerca de 550 especies (30% de la familia según Farias *et al.*, 1999) y son generalmente de ambientes ribereños. A diferencia de ello, los cíclidos africanos habitan mayormente ambientes lacustres y solo 90-100 especies viven en los ríos (Greenwood, 1991). La mayor diversidad morfológica corporal de los cíclidos sud americanos contrasta con aquella de los famosos cíclidos del África, lo cual sugiere que la radiación neotropical requirió de mayor tiempo para tomar lugar que la radiación espectacular en los lagos del valle del Rift en África. Por lo tanto, no es sorprendente ver la gran variedad de formas existentes en la región del Neotrópico (Winberg *et al.*, 1998; Kullander, 1998).

Estudios morfológicos y moleculares demostraron la naturaleza monofilética de la familia (Stiassny, 1991; Farias *et al.*, 1999), ubicando a los taxa de la India y Madagascar en los grupos más primitivos, seguidos por los taxa africanos y neotropicales, los cuales forman un grupo hermano monofilético desde su separación en el Cretáceo (Farias *et al.*, 1999; Farias *et al.*, 2000; Chakrabarty, 2004). A pesar de aquello, los cíclidos de ambos continentes continuaron vías de evolución independientes. Los que permanecieron en África son ejemplo de fenómenos extraordinarios de especiación y diversificación dentro los vertebrados (Galis & Metz, 1998; Kornfield & Smith, 2000; Mayr, 2001), que posiblemente tomaron lugar durante la última era de hielo (Galis & Metz, 1998). Sin embargo, la variación genética del grupo africano es baja comparada al grupo neotropical, extremadamente variable a nivel genético molecular (Farias *et al.*, 1999; Farias *et al.*, 2000), pero considerablemente inferior en número de especies (Greenwood, 1991; Kullander, 1998; Farias *et al.*, 1999; Farias *et al.*, 2000).

La gran diferencia entre el número de especies presentes en los grandes lagos africanos y los ríos sud americanos, posiblemente se deba a historias climáticas radicalmente diferentes combinadas con factores bióticos (Farias *et al.*,1999). En la actualidad son pocos los estudios que enfocan sobre los sucesos de especiación ocurridos en cíclidos del Neotrópico, debido a que la mayoría de las investigaciones sud americanas realizadas en esta familia se caracterizaron por estar dirigidas a aproximaciones ecológicas (Wilson *et al.*, 2000). Al contrario de esto, los estudios en cíclidos africanos estuvieron más encaminados a resolver problemas filogenéticos y de especiación que a investigaciones ecológicas (Wilson *et al.*, 2000), generando en las últimas décadas varios modelos de especiación simpátrica (McElroy & Kornfield, 1990; Turner & Burrows, 1995; Stiassny & Meyer, 1999).

2.2 *Modos de especiación*

Las barreras genéticas para el entrecruzamiento o los mecanismos de aislamiento, pueden surgir de varias maneras, y la especiación puede ser clasificada convenientemente de varios modos. Dos clasificaciones enfatizan, respectivamente, la escala geográfica sobre la cual la especiación puede ocurrir, y los eventos genéticos involucrados en el origen del aislamiento reproductivo. Estos están en parte relacionados uno al otro, puesto que ciertos modelos genéticos de especiación requieren aislamiento geográfico, y otros no (Futuyma, 1986).

Los medios más fácilmente visualizado por los cuales el aislamiento reproductivo puede levantarse con una base poligénica, es por la interposición de una barrera externa entre dos poblaciones, de manera que en la ausencia de flujo genético, diferentes alelos pueden ser fijados en cada uno de los loci. Mayr (1942, 1963 en Futuyma, 1986), cuyas escrituras han tenido una gran influencia sobre la teoría de la especiación, ha argumentado que el aislamiento geográfico es casi invariablemente necesario para que ocurra la especiación.

2.2.1 *Especiación Alopátrica*

La evidencia de especiación alopátrica (especiación en organismos que viven en lugares diferentes) proviene mayormente de estudios que involucran variación geográfica. Las especies difieren geográficamente en muchas características que pueden detener el intercambio de genes entre especies simpátricas. Casi totalmente, las poblaciones más remotas geográficamente, están más fuertemente aisladas por esterilidad o diferencias etológicas (cuando son evaluadas experimentalmente), que poblaciones vecinas (Futuyma, 1986; Maynard, 1999). Aquellas poblaciones remotas no podrían entrecruzarse exitosamente si su contacto estaría ilustrado por casos de solapamiento circular, en los cuales se asume que una cadena de razas intercambian genes a lo largo de la curva circular misma, de manera que las formas altamente divergentes al límite de cada brazo del círculo, no se entrecruzan cuando llegan a estar en simpatría (Futuyma, 1986; Maynard, 1999).

Evidencia para especiación alopátrica es proveída por la correspondencia frecuente entre discontinuidades biológicas y topográficas. Por ejemplo, los animales de aguas continentales muestran la diversidad regional más grande en regiones montañosas donde hay muchos sistemas de ríos aislados (Futuyma, 1986; Maynard, 1999).

2.2.2 *La zona híbrida*

La zona híbrida, en la cual las poblaciones que difieren en varias o muchas características entrecruzan a un grado mayor o menor, son usualmente interpretadas como instancias de contacto secundario entre poblaciones diferenciadas en alopatría, pero que no alcanzaron el estatus completo de especie. En tal zona, cada uno de los varios o muchos loci (o cromosomas) exhiben una clina en la frecuencia de los alelos, el ancho de los cuales puede ser más grande para algunos loci que otros (Futuyma, 1986).

Clinas abruptas persistirán para los loci (o el arreglo cromosomal) que tienen baja aptitud en la condición de heterocigotos, y que por lo tanto contribuirán a la inferioridad del

híbrido. Si el heterocigoto en el locus A tiene una aptitud más baja que el homocigoto, ningún alelo podrá incrementar en la población donde fue introducido por hibridización. Pero a menos que AA' sea completamente estéril o inviable, el retrocruzamiento entre AA' y $A'A'$ (o AA) introducirá alelos en otros loci desde una población dentro de otra. De esta manera la esterilidad parcial o inviabilidad del híbrido es solo una barrera moderadamente efectiva al flujo de genes, excepto en loci que están muy cercanamente ligados a aquellos otros que reducen la aptitud del híbrido (Futuyma, 1986). Por consiguiente la hibridización de dos poblaciones permanecerá diferenciada a través del genoma solo si los cromosomas están densamente formados con loci que, como nuestro locus hipotético A , reducen la aptitud del híbrido. Por esto entonces, es que muchos genes estarán cercanamente ligados al locus que restringe el intercambio genético. La baja aptitud de híbridos en alguna zona híbrida estrecha parece, desde luego, ser causada por muchos loci (Futuyma, 1986).

2.2.3 Especiación parapátrica

Si la selección favorece alelos diferentes en dos poblaciones adyacentes o parapátricas (i.e. dos poblaciones de un pez que habitan río arriba y otra río abajo respectivamente, pero las cuales no se solapan), una clina en la frecuencia alélica es establecida. Con una selección suficientemente fuerte sobre los loci que contribuyen al aislamiento reproductivo, las poblaciones pueden diferenciarse en especies reproductivamente aisladas (Futuyma, 1986). Endler (1977, en Futuyma 1986), ha argumentado que muchas de las zonas híbridas que son usualmente atribuidas a un contacto secundario, actualmente pueden haber surgido *in situ* por la diferenciación de poblaciones parapátricas, y que a veces las especies pueden surgir parapátricamente.

Un argumento mayor contra la especiación parapátrica ha sido que los patrones espaciales de selección deben diferir para loci diferentes, de tal forma que sus clinas deben estar situadas en diferentes localizaciones, más que en la misma localización como es a veces observado en las zonas híbridas. Sin embargo, la reducción del flujo génico causado por la selección en contra de los heterocigotos en un locus puede establecer

clinas en la frecuencia alélica de loci cercanamente ligados, solo si ellos son débilmente seleccionados en su mismo sentido. Además, si la aptitud de los genotipos en un locus depende del genotipo en un otro locus que está sujeto a selección clinal (i.e., si hay epistasia), la variación geográfica en un locus dará lugar a variación paralela en el otro (Futuyma, 1986). Es dificultoso decir si las zonas híbridas multilocus son evidencia de especiación parapátrica incipiente.

2.2.4 *Especiación simpátrica*

La especiación sería simpátrica (simpatria significa vivir en el mismo lugar) si la barrera biológica para el entrecruzamiento se originaría dentro los confines de una población panmíctica, sin una segregación especial de especies incipientes (Futuyma, 1986; Maynard, 1999). La población puede ocupar el mismo hábitat (simpatria biótica) o diferentes hábitats (simpatria vecina) dentro de una misma área geográfica (Lincoln *et al.*, 1998). Tanto modelos graduales como instantáneos de especiación simpátrica han sido propuestos (Futuyma, 1986).

En los últimos años, algunos modelos de genética de poblaciones han mostrado que la selección sexual puede guiar a una rápida diversificación de las preferencias reproductivas (Turner & Rurrows, 1995; Rundle *et al.*, 2000; Wendrick, 2001). La selección sexual ha sido propuesta como un mecanismo facilitador de la especiación simpátrica, debido a que puede causar un cambio evolucionario rápido de las señales de apareamiento en machos y las preferencias femeninas (Turner & Rurrows, 1995; Rundle *et al.*, 2000; Wendrick, 2001). Pueden llegar a formarse especies reproductivamente aisladas en pocas generaciones sobre la base de una mutación simple en las preferencias femeninas de apareamiento, y en ausencia de selección natural disruptiva o ligamiento entre rasgos masculinos y preferencias femeninas para aquel rasgo (Turner & Burrows, 1995). Sin embargo, se ha mostrado para algunos cíclidos africanos que habitan ambientes lacustres, la formación de especies diferentes con una insignificante fragmentación de su hábitat (Schliewen *et al.*, 1994), y la existencia de diversos linajes de

formas que habitan las aguas más profundas y superficiales, las cuales no parecen estar restringidas por barreras del hábitat (Turner, 1994).

Muchos modelos de especiación simpátrica son altamente controversiales. Uno de aquellos que puede ser considerado una excepción, es la especiación instantánea por poliploidia, la cual ocurre mayormente en las plantas (Futuyma, 1986). Si el híbrido entre dos especies diploides llega a ser tetraploide, estará en gran parte aislado reproductivamente de sus parientes diploides porque la progenie resultante de la retrocruza tendrá una alta proporción de aneuploidía y por lo tanto, gametos inviables (Futuyma, 1986).

2.3 Posibles causas de la diversidad ictiológica en el Neotrópico

Algunas hipótesis han sido planteadas para explicar la gran diversidad de fauna y flora que se desarrolló en las tierras bajas tropicales de Sud América como las de la amazonía. Entre ellas, la Teoría del Refugio sostiene que durante el Cuaternario los bosques tropicales (y muy probablemente también los ríos), sufrieron contracciones y expansiones que estuvieron sujetas a las condiciones climáticas áridas y húmedas. Bajo este planteamiento las poblaciones se aislaron en zonas más o menos restringidas (refugios) durante las condiciones adversas, diferenciándose a un nivel taxonómico de sub-especies o especies antes de que llegaran a tener un contacto secundario con poblaciones de otros refugios durante una siguiente fase de expansión favorable (Haffer, 1982; Weitzman & Weitzman, 1982; Renno *et al.*, 1991).

Otra de las teorías, denominada la Teoría de los Ríos Barrera, sugiere que los grandes ríos amazónicos desarrollaron como zonas infranqueables durante el período temprano del Cuaternario. Las poblaciones aisladas en las bandas opuestas de las zonas más bajas, desviarían a niveles de sub-especies o especies al verse impedidas en atravesar los grandes caudales (Patton & da Silva, 1998; Junk *et al.*, 1997; Lovejoy & de Araujo, 2000). Sin embargo, aquellas podían encontrarse en las cabeceras al salvar la estrechura de ríos más pequeños (Haffer, 1982; Patton & da Silva, 1998). Por otro lado, los

paleoarcos formados hace 2-5 millones de años atrás durante el levantamiento de los Andes, fueron propuestos como barreras antiguas que cortaron perpendicularmente el curso de algunos ríos e impidieron el intercambio entre las poblaciones presentes río abajo y río arriba (Patton & Da Silva, 1998; Lovejoy & de Araujo, 2000).

Finalmente, autores como Eigenmann (1909), Eigenmann & Allen (1942) y Darlington (1957) sugirieron al levantamiento de los Andes como el mayor evento de especiación que dio lugar a la gran diversidad de peces en la amazonía. Aunque Vari (1988) y Lundberg (1998) concluyeron que los eventos históricos que sucedieron durante el Plioceno y Pleistoceno en Sud América no están involucrados en la separación de taxones superiores que engloban la fauna íctica neotropical.

En conjunto, todos los eventos mencionados involucran en su resolución de un modelo alopátrico de especiación el cual es claro y fácil de interpretar cuando se compara a la situación de los cíclidos africanos. Para estos últimos, varias explicaciones han sido planteadas en el intento de dar una respuesta al gran número de especies presentes en los grandes lagos del Este de Africa. Modelos que consideran no solo situaciones de alopatria (Greenwood, 1974; Greenwood, 1991; McKaye, 1991), si no también de simpatria (Turner & Burrows, 1995; Turner, 1996; Sturmbauer, 1998; Seehausen & van Alphen, 1998; Seehausen & van Alphen, 1999; Kornfield & Smith, 2000; Danley & Kocher, 2001), parecen estar involucrados en la reciente explosión de estas especies (Kornfield, 1978). A pesar de ello, trabajos recientes en poblaciones de *Amphilophus citrinellus* (Günther, 1864) en los lagos-crater de Nicaragua son un ejemplo potencial de especiación simpátrica incipiente, donde la diferenciación de colores entre poblaciones debido a la asociación entre parejas dentro los lagos Apoyo y Nicaragua, podría estar dirigiendo su diversificación y posiblemente su especiación (Wilson *et al.*, 2000). En muchos cíclidos del Neotrópico, las variaciones geográficas de color podrían ser de importancia central para el aislamiento reproductivo y generación de diversidad como es el caso para varios cíclidos del África (Kornfield & Smith, 2000).

2.4 El concepto de especie en peces

Varias definiciones han sido propuestas en las últimas décadas para aclarar con precisión el concepto de especie en peces. Algunas de ellas tuvieron mayor acogida que otras según la aproximación que tenían a la mayoría de los fenómenos naturales observados. Entre los conceptos más importantes, citaremos al propuesto por Darwin (1859, en Turner, 2000; Mallet, 1995), en el cual se indica que las especies son aquellas variedades bien marcadas que no son cualitativamente diferentes entre individuos. Si dos formas difieren muy poco en su forma y merística, ellas serán consideradas como variedades, incluso cuando se descubren formas intermedias emparentadas. Mayr (en Turner, 2000) por su parte, popularizó y cristalizó el Concepto Biológico de Especie (CBE) ya mencionado con anterioridad por Dobzhansky. Este concepto indica que una especie es una población (o grupo de ellas) dentro la cual existe un intercambio de genes, pero la cual no se entrecruza con otras poblaciones. En contraposición a este, Paterson (1985, 1993), propuso al Concepto de Reconocimiento de Especie (CRE), como el argumento principal en la distinción de dos especies. La idea central de este concepto, se basa en un Sistema de Reconocimiento Específico de Pareja (SREP), el cual involucra a una secuencia de señales y respuestas co-adaptadas que actúan entre los sexos opuestos de una misma especie durante su cortejo de apareamiento. De esta forma se asegura el encuentro y la fertilización de los gametos de una misma especie. Adicionalmente a lo citado, mencionaremos al trabajo de Turner (2000), donde se presenta un buen resumen de las definiciones, ventajas y desventajas sobre la aplicabilidad de otros criterios en especies de peces, tales como: el Concepto Filogenético de Especie, el Concepto Evolucionario, el Concepto Ecológico y el Concepto de Cohesión, entre otros.

De todos aquellos conceptos, el CBE (el cual está inmerso en la definición de Darwin), ha sido el más aceptado por ser una hipótesis que puede ser probada y por su amplia aplicabilidad al menos a los organismos sexuales (Turner, 2000). Muchas especies de peces son genéticamente y ecológicamente diferentes de otras con las que conviven, por lo tanto es bastante razonable que cada especie que mantiene su poza génica independiente, sea una entidad biológica aislada reproductivamente. De esta manera, a

pesar de que el CRE ha sido bastante enfatizado para los cíclidos de los lagos africanos (Kornfield & Smith, 2000), ya que este concepto no es aplicable a organismos asexuales y a organismos en situaciones de alopatria, también consideraremos al CBE como la mejor definición que delimita una especie, al menos para los cíclidos neotropicales.

2.5 El género *Cichla* Bloch & Schneider, 1801

Uno de los cíclidos neotropicales más apetecidos, tanto por el sabor y calidad de su carne, como por su tamaño, abundancia y la formidable lucha que ofrece a la pesca deportiva, es aquel perteneciente al género *Cichla* Bloch & Schneider, 1801. Este pez de amplia distribución en Sud América tropical (Lowe-McConnell, 1969) es comúnmente llamado como tucunaré en Bolivia (Lauzanne & Loubens, 1985; Van Damme, 2001), Brasil (Lowe-McConnell, 1969; Winemiller *et al.*, 1997) y Perú (Kullander, 1986), y como kounanni o toukounaré en Guyana Francesa (Kullander, 2003), a diferencia de Venezuela donde son mayormente conocidos como pavones, debido a los ocelos y colores contrastantes que presentan en estado adulto (Roman, 1985; Winemiller *et al.*, 1997).

De las 15 especies nominales referidas al género, cinco son reconocidas como válidas siguiendo la revisión de Kullander (1986, 2003): *C. ocellaris* Bloch & Schneider, 1801, *C. orinocensis* Humboldt, 1821, *C. temensis* Humboldt, 1821, *C. intermedia* Machado-Allison, 1971, y *C. monoculus* Spix & Agassiz, 1831. Casi todas ellas son conocidas en diferentes puntos de Venezuela (Winemiller, 2001), *C. orinocensis*, *C. temensis* y *C. intermedia* habitan en los llanos del sur de este país (Taphorn & Barbarino Duque, 1993), junto a *C. cf. monoculus* (Winemiller, 2001), mientras que *C. ocellaris* no es simpátrica con sus congeneres, y está restringida a la cuenca del río Essequibo y ríos de la costa este (Winemiller, 2001).

En lo que refiere a *C. monoculus*, su distribución alcanza desde el Ucayali y parte baja del Napo, Amazonas Central y sus grandes tributarios tales como el Madera, Negro, Tefé, Codajas, (Kullander, 1986), Tapajos y Tocantins (Andrade *et al.*, 2001), hasta el sistema del río Oyapock al noreste del Brasil (Kullander, 1986; Keith *et al.*, 2000). En algunos

ríos de Colombia y Brasil, esta especie puede cohabitar junto a *C. temensis* y *C. orinocensis* (Kullander, 2003).

En Bolivia, los primeros registros del taxa fueron identificados como *C. ocellaris* por Haseman (Fowler, 1940), Pearson (1924) y Lauzanne & Loubens (1985). Sin embargo, la taxonomía y distribución de los especímenes capturados en los diferentes ríos bolivianos, estaba más próxima a la descripción del *C. monoculus* (Kullander, 1986) encontrado en el sistema amazónico del Perú. Por esta razón, los tucunarés bolivianos fueron denominados más tarde con este nombre, a pesar de que recientemente Kullander (com. pers. a F. Duponchelle) indicaría que podría tratarse de una especie endémica de Bolivia. Según Ibáñez (2002), la misma sería presentada en un catálogo que se encuentra en preparación por el mismo autor.

La distribución de *C. aff. monoculus* en Bolivia, está restringida a las tierras bajas drenadas por los ríos de la cuenca amazónica que se dirigen hacia el norte del país, desde las planicies de inundación inmediatamente debajo del piedemonte de los Andes en la cuenca del río Ichilo (alto Mamoré) (Maldonado, 1996; Carvajal, 2002) hasta los grandes tributarios del río Madera en su parte alta, tales como el Mamoré (Lauzanne & Loubens, 1985), Iténez (Kullander, 1986; Van Damme, 2001), Madre de Díos (Kullander, 1986; Sarmiento *et al.*, 1999), Yata (Renno & Hubert com. pers.) y el río Beni en su parte más baja (Fowler, 1940).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Colecta de peces

Se analizaron 186 especímenes (Cuadro 1) de *Cichla* aff. *monoculus*, la mayoría de ellos colectados durante la época de aguas bajas desde el año 2001 hasta el año 2003, en 6 localidades (Figura 1) representativas para los principales ríos que corren a través de la amazonía boliviana. Los peces fueron capturados principalmente con anzuelos y lineada, en aguas poco profundas a orillas de lagunas de origen meándrico o tectónico y en ríos de corriente suave. Eventualmente se utilizaron redes agalleras con 70, 80, 90 y 100 mm de medida del rombo en zonas de mayor profundidad.

De cada individuo se extrajo aproximadamente $\frac{1}{2}$ cm³ de músculo de la parte anterior-superior del flanco derecho, el cual fue preservado en etanol al 96% en frascos opacos de 5 mL.

Cuadro 1. Detalle del número de individuos extraídos y analizados en el presente estudio. Todos los especímenes provienen de los sistemas fluviales más importantes en las tierras bajas de la amazonía boliviana.

CUENCA	RÍO	LUGAR	PUNTO	GEOREFERENCIA	No Ind.
Orthon	Manuripi	Lago Bay	Lago Bay	S 11°57'18,3" / W 68°39'35,5"	4
		Manchester	Manchester	S 11°28'28,3" / W 67°59'45,5"	1
		Hiroshima	Hiroshima	S 11°24'11,67" / W 67°51'15,47"	5
Yata	Yata	*	*	S 11°36'00" / W 65°39'00"	11
Iténez	San Martín	California	Laguna Sala	S 13°20'17,6" / W 63°27'26,9"	39
			Laguna Larga	S 13°18'30,8" / W 63°32'09,5"	37
			Laguna Redonda	S 13°18'31,7" / W 63°33'47,8"	10
	San Joaquín		Boca S. Martín	S 13°21'45,7" / W 63°32'50,5"	10
		Tres Bahías	Tres Bahías	S 13°40'69,8" / W 63°24'17,5"	12
		Cachuela	Cachuela	S 13°33'36,7" / W 63°24'17,5"	12
	Paraguá	Piso Firme	Piso Firme	S13°37'39,9" / W 61°44'11,1"	10
Iténez	Bella Vista	Bella Vista	S 13°31'15,5" / W 61°33'32,6"	11	
Mamoré	Sécore	Sicusa	Sicusa	S 15°46'20,7" / W 65°12'04,2"	11
Ichilo	Ichilo	*	*	S 17°01'03,2" / W 64°38'38,6"	13
TOTAL					186

* inexistente

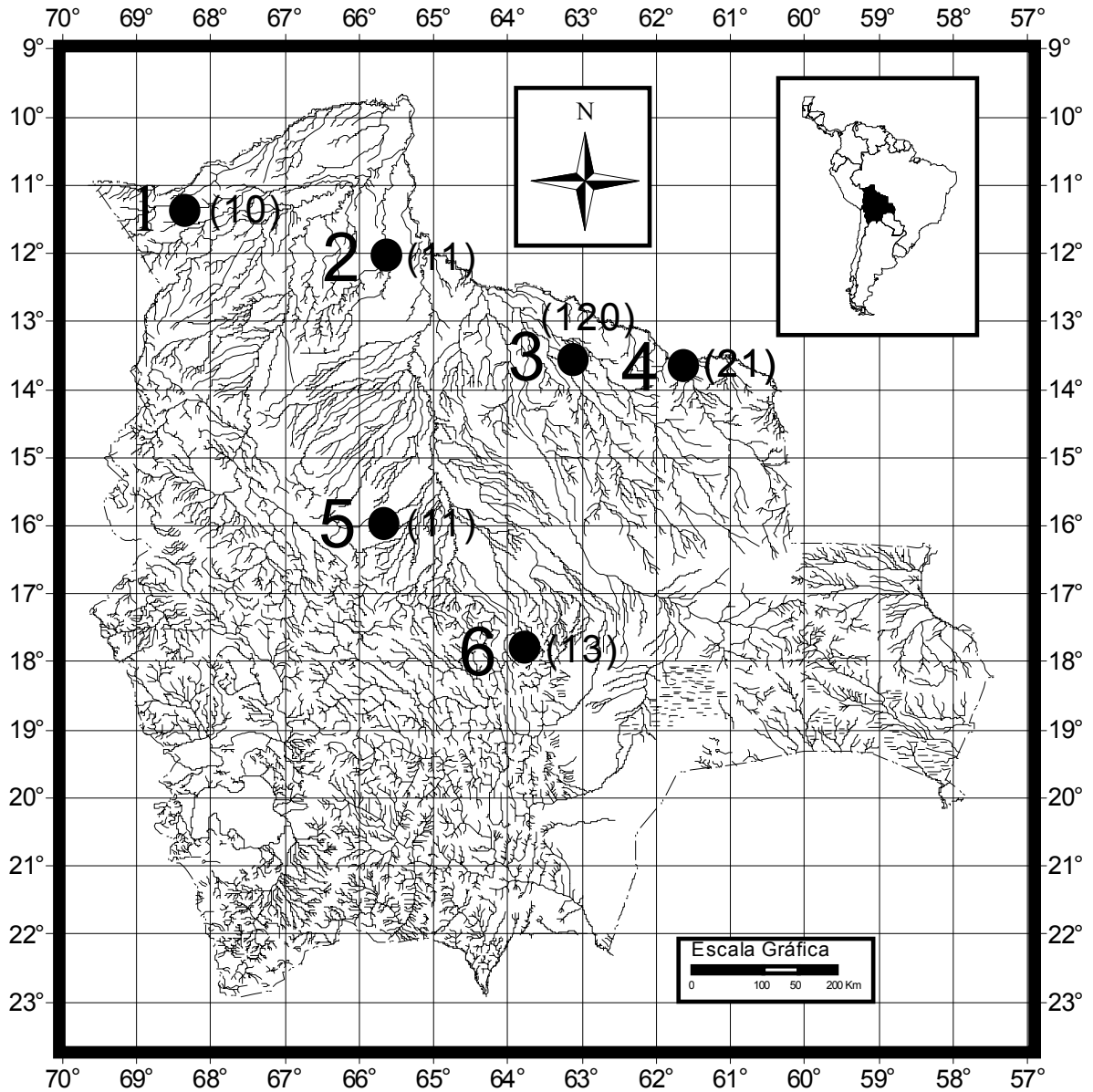


Figura 1. Mapa de distribución de los diferentes ríos de Bolivia. Los círculos indican los sitios de colecta, algunos de ellos representan más de una localidad. (1 = río Manuripi; 2 = río Yata; 3 = río San Martín y San Joaquín; 4 = río Paraguá e Iténez en su parte alta; 5 = río Sécore; 6 = río Ichilo). Diseño cartográfico de Milton Zapata (ULRA).

3.2 Extracción de ADN

3.2.1 Preparado de la solución de Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB)

Para 50 ml de la solución CTAB, se utilizó en la mezcla: 20 ml de hexadecil-trimetil bromuro de amonio (5%), 14 ml de NaCl 5M, 2 ml de ácido etilen-diamino-tetraacético

(EDTA) 0.5M (pH 8.0), 5 ml de TRIS 1M (pH 8.0), 100 μ l de β -mercapto-etanol y 9 ml de agua tridestilada. Cuando la solución estuvo lista, se la mantuvo refrigerada a 4° C.

3.2.2 *Procedimiento de extracción*

Un pedazo de músculo no sobrepasando los 100 mg, fue secado y cortado hasta casi quedar pulverizado sobre un trozo de papel aluminio. Los fragmentos obtenidos fueron colocados en un tubo eppendorff de 1.5 mL. Sobre ellos se añadió 750 uL de solución CTAB, la cual previamente reposó al menos 30 min a 60 °C, mas 1 uL de proteinasa K, La mezcla fue agitada vigorosamente (10 s) en vortex antes de ser depositada en una estufa por el lapso de 8 h. Una vez que se dejó reposar aquel tiempo, se agregó 750 uL de cloroformo y la mezcla resultante fue agitada suavemente por el tiempo de 5 minutos. Pronto se procedió con la centrifugación a 8000 rpm por el espacio de 5 minutos a 4 °C (centrifugadora Heraeus Sepatech GMBH, West Germany).

Inmediatamente después, se extrajo cuidadosamente la mayor cantidad de sobrenadante a un eppendorff nuevo y al cual se añadió 750 μ l de isopropanol almacenado a -20 °C. La mezcla obtenida fue nuevamente agitada con delicadeza por el lapso de 2 minutos y dejada a -20 °C el tiempo de 2 horas, hasta que ocurriese la precipitación de las moléculas de ADN en el fondo. Seguidamente, la mezcla fue sometida a 13000 rpm por el intervalo de 15 minutos a 4 °C y una pequeña pelotilla blanca en el fondo o a los lados del tubo se hizo visible. La solución que se encontraba sobre el precipitado blanco, debió ser removida cuidadosamente sin tocar la partícula. Una vez realizado aquello, se introdujo 750 μ l de etanol al 70% y se llevó a cabo una centrifugación final con las mismas condiciones de la última. La solución excedente se deshechó con prudencia y el tubo fue puesto a secar por dos horas en una estufa a 30 °C y otras 8 h a temperatura ambiente, con el fin de alcanzar una evaporación completa del etanol. Finalmente el precipitado se resuspendió en 60 ul de agua pura y fue conservado a -20 °C.

3.3 Técnica EPIC-PCR (*Exon-Primed Intron-Crossing Polymerase Chain reaction*)

3.3.1 Utilidad del EPIC-PCR en genética de poblaciones

En la actualidad el análisis de la molécula de ADN se considera una herramienta de gran potencialidad y resolución en taxonomía y filogenia. Los atributos moleculares son una medida directa de cambios en el genotipo, por lo tanto, su utilización evita los problemas asociados a la plasticidad fenotípica que, como se sabe, está influenciada por el ambiente. Desde hace más o menos una década, los sistemáticos han comenzado a incluir datos moleculares en sus estudios tradicionales. Los resultados obtenidos contribuyeron tanto a solucionar problemas sistemáticos irresolutos como a corregir algunos errores generados por la utilización de caracteres taxonómicos clásicos (Montoya *et al.*, 1996).

Las secuencias del genoma nuclear proveen información genética que complementa y extiende estudios intra e inter específicos utilizando ADN mitocondrial (Slade *et al.*, 1994). El análisis de este último no tiene el poder para hacer frente al intercambio poblacional ni puede verificar si una muestra local es de una población mendeliana simple (Chow & Takeyama, 1998).

Han sido desarrolladas varias formas de evaluar el genoma nuclear a nivel del ADN, y por la incorporación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), su utilidad está llegando a ser convencional. Una de ellas de reciente aplicabilidad, utiliza como blanco a las secuencias intrónicas flanqueadas por exones. Los intrones son secuencias muy variables no codificadoras que pueden alcanzar tamaños desde 80 a 10000 nucleótidos o más. A diferencia de los exones, su secuencia nucleotídica parece ser muy poca conservativa y a veces puede alterarse significativamente sin afectar considerablemente la función del gen (Hassan *et al.*, 2002). De esta manera, las mutaciones que pueden ocurrir, se acumulan rápidamente y a veces exhiben una alta variabilidad genética (mucho más que los exones), incluyendo polimorfismos a nivel de su longitud (Palumbi, 1995; Chow & Hazama, 1998; Daguin, 2000). Por este motivo, la posición de los iniciadores que

intervienen en la replicación de aquellos fragmentos están diseñados para operar desde secuencias conservadas sobre los exones. Todas estas características, hacen que sean provechosos como marcadores de variación, en poblaciones y sub-poblaciones dentro y entre especies (Lessa, 1992; Chow & Hazama, 1998).

Los marcadores moleculares para el estudio de las poblaciones son particularmente útiles si ellos cumplen los siguientes criterios: ellos deben exhibir una cantidad razonable de polimorfismo para evitar los problemas de homoplasia (convergencia evolutiva), ser selectivamente neutros para tener una divergencia genética en relación con el reloj molecular, ser codominantes para la cuenta directa de los genotipos diploides, ser heredados, por lo tanto, en una forma mendeliana para poder utilizar los parámetros de genética de poblaciones en relación con las variaciones de las frecuencias alélicas (flujo genético, diferencia al equilibrio de Hardy-Weinberg, deriva génica, etc); y desde un punto de vista práctico, ellos deben ser de bajo costo y efectivos a corto plazo (Ohresser *et al.*, 1997). Al respecto, varios trabajos han demostrado que la técnica Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) Polymerase Chain Reaction (PCR), permite utilizar el polimorfismo en longitud de los intrones como un marcador genético en el estudio de las poblaciones de varios vertebrados (Palumbi & Baker, 1994; Chow & Takeyama, 1998; Chow & Hazama, 1998; Ibáñez, 2002; Hasan *et al.*, 2002; Quatro *et al.*, 2001) e invertebrados (Ohresser *et al.*, 1997; Bierne *et al.*, 2000, Daguin, 2000). De esta manera, utilizaremos la variación generada por mutaciones grandes (inserción o delección), como la medida del polimorfismo en la longitud de los fragmentos intrónicos, y no así aquella producida por el efecto de las mutaciones puntuales que pueden ocurrir en ellos.

3.3.2 Amplificación mediante EPIC-PCR

Para la amplificación de intrones, fueron empleados los iniciadores diseñados por Bierne *et al.* (2000) y Hassan *et al.* (2002), los cuales se ubican en secuencias conservativas sobre los exones y el polimorfismo en estos sitios de inicio es probablemente raro (Chow & Takeyama, 1998) (Figura 2). Gracias a esta última característica, es posible utilizar

iniciadores diseñados para un taxa específico, en el análisis de otras especies que se encuentran dentro del grupo taxonómico al que corresponden (i. e., Clase).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue llevada a cabo en un volumen de 25 μ l de reacción (con agua estéril tridestilada), conteniendo 0,5 μ l de extracto total de ADN, 0.3 u de Taq polimerasa en su tampón (Promega, WI, Madison) para *Aldo B1* y *Mhc*, y 0.2 u de Taq para *Opsin* y *Actin*, 2.5 μ l de tampón 10X (Promega, WI, Madisson), 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 μ M de dNTP (Promega, WI, Madission) y 4 μ M de iniciadores para MHC y 0.4 μ M de los mismos para los demás loci (Promega, WI, Madisson). La temperatura de alineamiento fue de 54 °C para *Opsin* y 60 °C para los otros tres loci. Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Hybaid

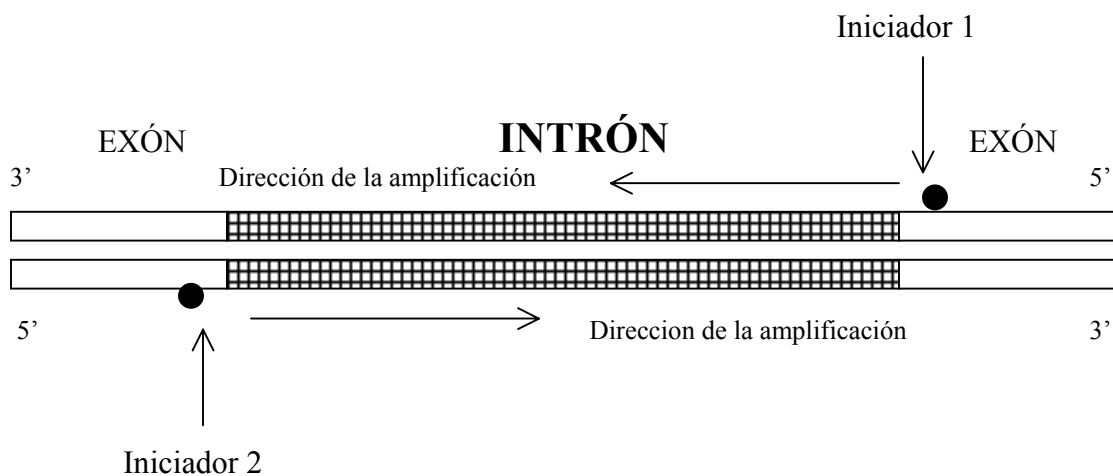


Figura 2. Esquema de la amplificación de un segmento variable de ADN intrónico el cual se encuentra flanqueado por secuencias conservativas exonicas en el ADN nuclear de un eucariota. Los círculos representan a los iniciadores que encuentran su punto de origen sobre los exones y corren en la dirección 5' \rightarrow 3' durante la replicación del ADN.

(Hybaid Instruments, UK) siguiendo la secuencia de desnaturalización a 92 °C por 2 min, luego 30 ciclos en el orden de 95 °C/1 min, 60 °C (54 °C)/1 min, 72 °C/1 min y extensión a 72 °C por 5 minutos. Para visualizar y fotografiar los fragmentos amplificados bajo luz ultravioleta, se preparó geles de agarosa al 1.5 % (Promega, WI, Madisson) teñidos con Bromuro de Etidio (0.5 μ g/ml) (Promega, WI, Madisson), los cuales fueron sometidos a

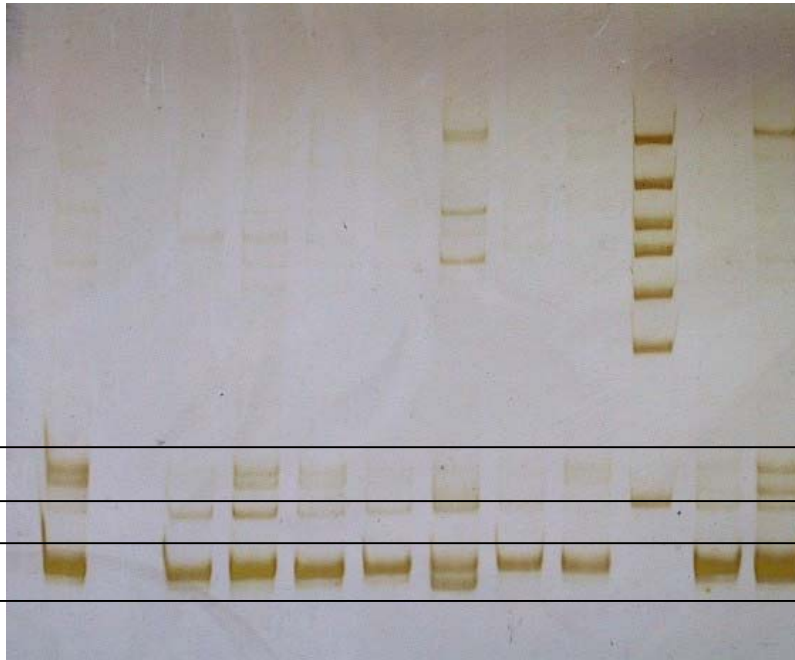
un campo eléctrico horizontal de 100 V cerca a 10 min, sumergidos en tampón TBE (50 mM Tris, 1 mM EDTA y 48.5 mM de ácido bórico).

3.3.3 Revelación de geles de poliacrilamida

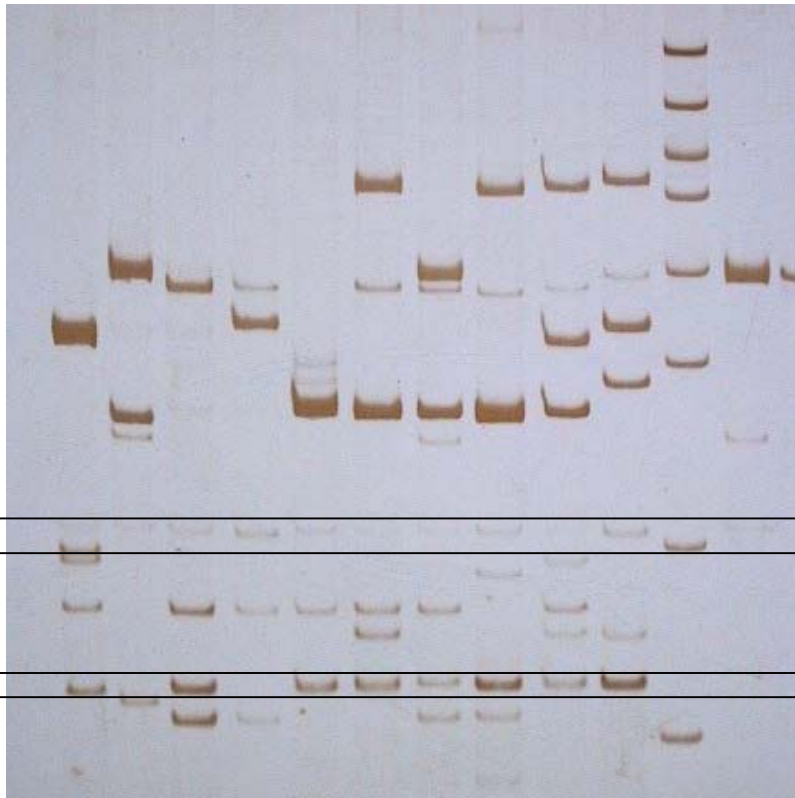
Una vez confirmada la amplificación de los fragmentos de ADN en agarosa, los productos de PCR fueron corridos en geles de poliacrilamida con tampón TBE 1X, para detectar el polimorfismo en la longitud de los intrones. El intrón *Mhc* fue corrido en geles al 8% de concentración por el lapso de 3-4 horas, con un campo eléctrico de 300 [V], 30 [W] y 13 [A] en promedio, mientras que los intrones restantes fueron pasados en geles al 12 % por el espacio de 4-5 horas con 350 [V], 40 [W] y 15 [A] aproximadamente. Todas las veces que se llevó a cabo una electroforesis, se colocó el marcador de peso molecular SmartLaeder (Eurogentec) para obtener la referencia cada 100 pares de bases y seguir el movimiento de las bandas.

Terminada la corrida electroforética, los geles se depositaron en cubetas de vidrio transparente donde fueron bañados con etanol al 70 % por el lapso de 10 min. Posteriormente, recibieron un lavado intermedio con agua destilada alrededor de 30 seg., para dejarlos después sumergidos en ácido nítrico al 1% durante 3 min. Pasado aquello, nuevamente se los volvió a enjuagar rápidamente para dejarlos reposar en nitrato de plata al 0.4% por el espacio de 2 min. Cumplido aquel tiempo, pasaron por un último lavado con agua destilada y finalmente se los dejó en una mezcla de carbonato de sodio (30 g/l) con formaldehído (0.02%) en una relación de 2:1. Las bandas que aparecieron varios minutos después de haber colocado la última mezcla reductora, fueron dibujadas esquemáticamente y fotografiadas con una cámara digital. Cada fotografía obtenida se analizó con el programa LabImage (ver. 2.7.0, Kapelan, Germany), para obtener el peso molecular más aproximado de cada banda visualizada y poder nombrar con aquel valor, a los diferentes alelos en cada locus. La zona de lectura para cada locus por intrón se indica en la Figura 3.

A



B



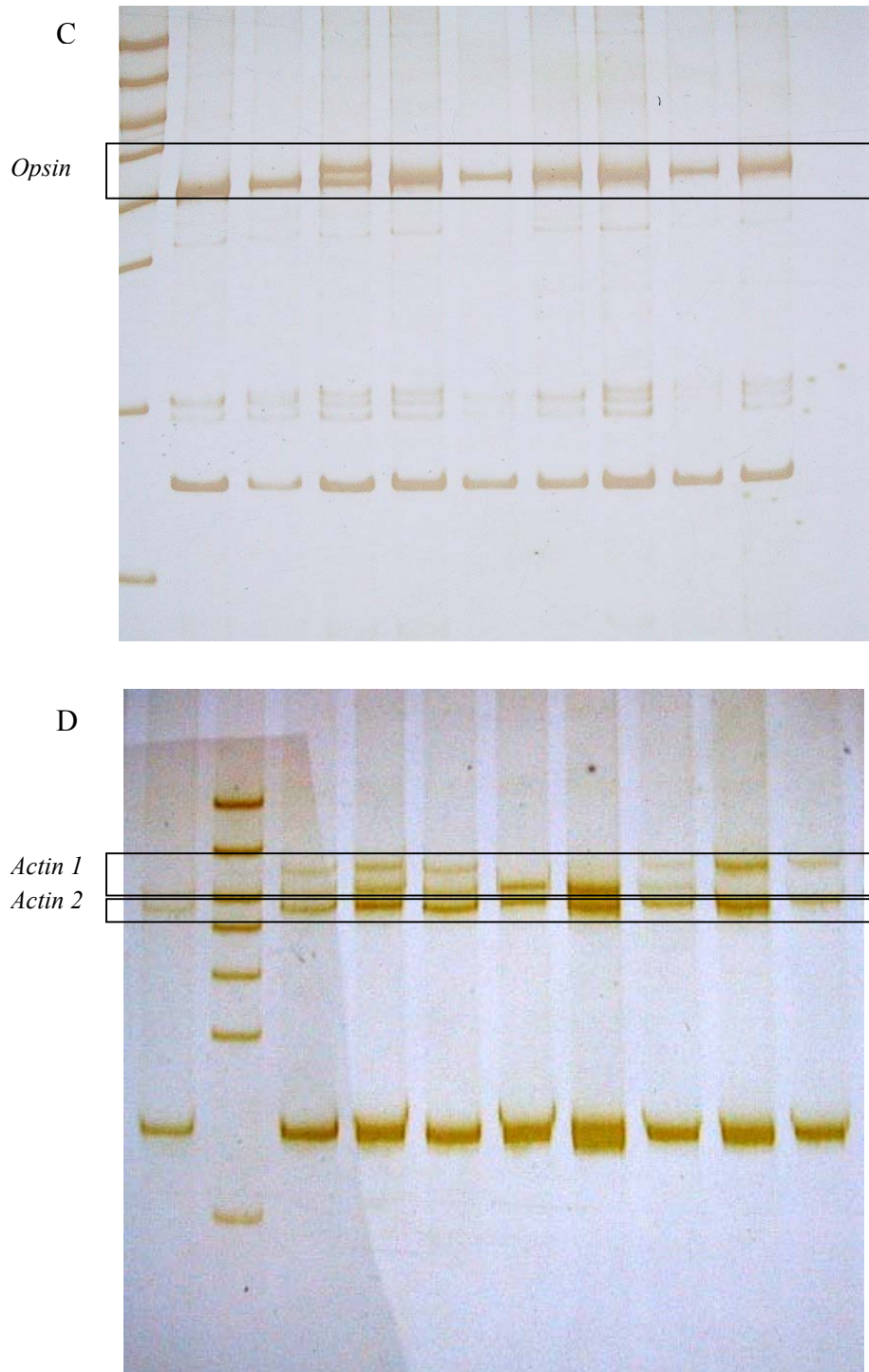


Figura 3. Visualización de los fragmentos intrónicos amplificados, después de una corrida electroforética en geles de poliacrilamida. El ADN empleado, pertenece a los tucunarés extraídos de las principales cuencas que atraviesan la amazonía boliviana (cuenca del alto Madera). Los intrones representados son Aldolasa B1 (*Aldo 1*, *Aldo 2*) (A), Mhc (*Mhc 1*, *Mhc 2*) (B), Opsin (*Opsin*) (C) y Actin (*Actin 1*, *Actin 2*) (D).

3.4 *Análisis de la variabilidad y estructura genética de las poblaciones*

3.4.1 *Panmixia y el equilibrio de Hardy-Weinberg*

Las frecuencias genotípicas en las poblaciones están determinadas en parte, por el modo de cruzamiento que existe entre sus individuos. Uno de ellos, el cual es el más simple y más importante, es la panmixia. Bajo esta forma de apareamiento, los cruzamientos entre los genotipos de una población se efectúan al azar y la probabilidad que un individuo se aparee con otro individuo de un genotipo dado, es igual a la frecuencia de ese genotipo en la población (Gardner, 1980; Hartl, 1994 & Solignac et al., 1995)

Un modelo de predicción de las frecuencias genotípicas en una población panmíctica, esta dado por la ley de Hardy-Weinberg, la cual afirma hipotéticamente que en una población equilibrada, tanto las frecuencias de los genes como de los genotipos permanecen constantes de una generación a otra si se trata de una gran población reproductiva en la que los apareamientos se efectúan al azar y en donde no opera la selección natural ni tampoco otros factores susceptibles a cambiar las frecuencias de los genes. La expresión matemática que generaliza este principio y define la relación binomial entre las frecuencias genotípicas y génicas, esta dada por:

$$[p + q]^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

donde p y q son las frecuencias de dos alelos en un mismo locus (Gardner, 1980; Hartl, 1994 & Solignac *et al.*, 1995).

3.4.2 *Niveles de estructuración de una población*

En las poblaciones divididas, tres niveles jerárquicos pueden ser observados: los individuos (I), las sub-poblaciones (S) y la población total (T). Para categorizar la heterocigosidad genética (proporción de heterocigotos en una población) de estos niveles, Wright considera locus dialélicos y define entonces los siguientes parámetros: H_i ,

heterocigosidad observada en promedio por individuo, bajo el conjunto de sub-poblaciones; H_s , la heterocigosidad esperada por individuo para cada sub-población, en el supuesto caso del equilibrio de Hardy-Weinberg; H_t , la heterocigosidad esperada por individuo, suponiendo que la población global está en equilibrio de Hardy-Weinberg (Hartl, 1994; Solignac *et al.*, 1995).

La primera medida de una población es el Índice de Endogamia (F_{is}), que mide la reducción eventual de individuos heterocigotos al interior de sus sub-poblaciones, y está definido por la relación:

$$F_{is} = (H_s - H_i)/H_s$$

En efecto, muchas veces en las poblaciones naturales, el análisis de las muestras podrá indicar un déficit en heterocigotos ($F_{is} > 0$), debido a la endogamia o a la homogamia. Por el contrario, si las sub-poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg el valor de F_{is} tendrá un valor de cero. Si este índice es negativo, las subpoblaciones presentaran al contrario un exceso de heterocigotos, debido por ejemplo, a un flujo migratorio importante que provoca un efecto de heterogamia (Hartl, 1994; Solignac *et al.*, 1995).

Entre las sub-poblaciones y la población total, el efecto de la sub-división se expresa por un índice similar al anterior, denominado Índice de Fijación (F_{st}). Este valor corresponde a la reducción de heterocigotos entre las subpoblaciones y está ligado a diferencias de frecuencias alélicas promedio. Su relación está definida por:

$$F_{st} = (H_t - H_s)/H_t$$

Si todas las sub-poblaciones tienen la misma frecuencia alélica y se encuentran en equilibrio, F_{st} es nulo. En el caso contrario, el grado de subdivisión de poblaciones en su conjunto, medido por la reducción en la frecuencia de los heterocigotos (efecto Wahlund), implica que H_t es más grande que H_s y F_{st} será positivo. Esto indica que las

subpoblaciones tienen las frecuencias alélicas promedio diferentes, generalmente inducidas por el efecto de la deriva génica (Hartl, 1994; Solignac *et al.*, 1995).

3.4.3 *Análisis de las poblaciones*

Se utilizó el índice de endogamia (*F_{is}*) como medida de la desviación a la panmixia (estimado según el estadístico *f* de Weir & Cockerham, 1984). El valor *P* asociado con el estimador observado de *F_{is}* es obtenido por la construcción de 1000 matrices generadas al azar derivadas de una matriz verdadera (los datos obtenidos), realizando permutaciones aleatorias de los alelos dentro de cada locus. Para cada matriz obtenida por las permutaciones se calcula un estimador de *F_{is}*. De esta manera, se genera la distribución del estimador de este parámetro (GENETIX 4.04, Belkhir *et al.*, 1996-2002) bajo la hipótesis nula que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias relativas de las estimaciones, las cuales son iguales o superiores a la verdadera estimación de *F_{is}*, dan el valor relevante de *P* para la prueba de una cola con 2.5 % de riesgo (=la probabilidad que el estimador de *F_{is}* sea tan extremo o más extremo que el valor observado, dado que el valor verdadero de *F_{is}* es cero) (Berrebi & Valiushok, 1998).

La diferencia genética entre las diferentes muestras geográficas obtenidas, fueron analizadas con el Índice de Fijación (*F_{st}*) de Weir & Cockerham (1984). La significancia de las estimaciones fueron evaluadas por el método de permutaciones explicado más arriba, con la diferencia de que los genotipos multilocus individuales fueron permutados entre muestras, pero ya no los alelos.

El cálculo estimativo del Flujo Genético (*N_m*) entre pares de poblaciones, estuvo dado por la relación:

$$N_m = (1 - F_{st}) / 4 * F_{st} \quad (\text{Wright, 1969}),$$

y el cálculo de la Distancia Genética (*D*) entre los mismos por:

$$D = -\ln(1 - F_{st}) \quad (\text{Reynolds } et al., 1983)$$

Los dendrogramas que representan las distancias genéticas existentes entre las distintas muestras geográficas de, fueron construidos según el criterio de asociación UPGMA, utilizando el subprograma NEIGHBOR del programa PHYLIP (Felsenstein, 1993) y visualizados con el programa TREEVIEW (Page, 1996).

4. RESULTADOS

4.1 Diferenciación genética de las poblaciones

De una forma general, la variabilidad que se obtuvo de la lectura de cada banda por locus, nos permitió una buena interpretación de los genotipos. Un caso especial se presentó con el locus *Mhc 2*, debido a que la lectura de sus bandas fue confusa y dificultó la interpretación. Por esta razón el locus *Mhc 2* no fue considerado dentro el análisis de este trabajo, y en consecuencia el locus *Mhc 1* fue denominado solamente como *Mhc*.

El número total de alelos observados por locus a nivel de la cuenca amazónica boliviana fue de: dos en *Aldo 1* (320, 315), *Aldo 2* (260, 250), *Mhc* (305, 300), *Opsin* (535, 500) y *Actin 2* (690, 660), y de 3 en *Actin 1* (740, 730, 700) (Figura 4).

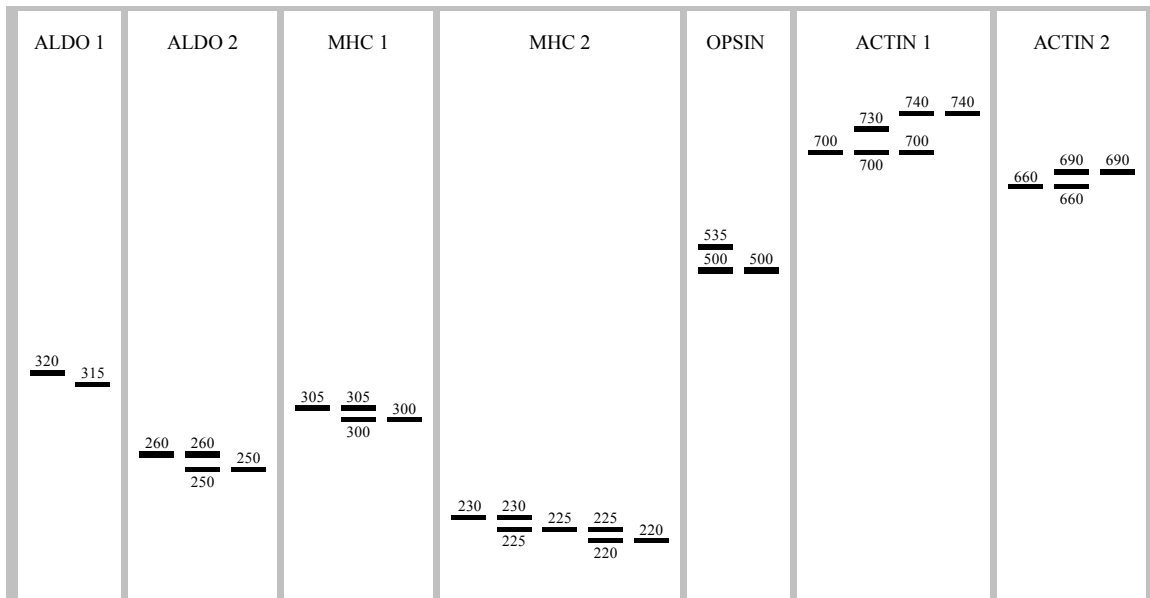


Figura 4. Perfil representativo del polimorfismo de longitud en los productos de PCR encontrados al amplificar los intrones *Aldolasa B1*, *Mhc*, *Opsin* y *Actin* en *Cichla* aff. *monoculus* provenientes de la cuenca amazónica boliviana. En la parte superior de la figura se encuentra el nombre asignado a cada locus por intrón. Los números cerca de las bandas indican la cantidad aproximada de pares de bases que poseen los alelos.

La mayor diversidad alélica (número de alelos por locus), fue encontrada en la parte del río San Martín y San Joaquín, los cuales se ubican aproximadamente en la parte media de

la cuenca del río Iténez. Este lugar es especial comparado al resto de los otros puntos considerados en Bolivia, debido a que se registraron solo 2 alelos (*Aldo 2* (250) y *Opsin* (535)) en esta zona. La presencia-ausencia de los restantes loci y alelos encontrados en los diferentes sistemas bolivianos, no mostró alguna exclusividad en particular y todos ellos fueron hallados en esta misma zona (Cuadro 2).

La muestra proveniente del río Manuripi, dió como resultado un grupo monomórfico en todos sus loci. Monomorfismo parecido se obtuvo de la muestra proveniente del río Ichilo, la cual hubiese sido similar en forma, de no haber sido por un individuo que llevaba el alelo 660 en el locus *Actin 2*. Todas las demás poblaciones, principalmente las de la zona del río San Martín-San Joaquín, presentaron un cierto grado de heterocigosidad en la mayoría de sus locus, particularmente en *Actin 1* y *Actin 2* (Cuadro 2).

Considerando todos los loci en conjunto, los grupos contemplados mostraron una diferencia significativa a la panmixia, excepto los del río Manuripi, río Ichilo y parte alta del río Iténez. En los dos primeros no fue posible obtener un estimador de Fis múltiple (Fis Mult.) debido a la naturaleza monomórfica de sus genotipos encontrados, y en el último porque los individuos no desviaron al equilibrio de Hardy-Weinberg. Este desequilibrio, es explicado casi en su totalidad para todas las muestras, por el locus *Aldo 1* y el locus *Actin 2*, aunque el último solo en la población proveniente del río San Joaquín cerca de su confluencia con el San Martín. De esta manera, si se observa con detalle la frecuencia del alelo 320 y 315 en el locus *Aldo 1*, notaremos que en todas las muestras geográficas no existe heterocigoto alguno. Debido a esto, se podría sospechar la presencia de dos especies genéticamente distintas habitando la cuenca del río Manuripi y el sistema del río Ichilo de forma separada, pero llegando a estar en simpatria dentro la cuenca de los ríos Iténez, Yata y Mamoré principalmente (Cuadro 2).

Si consideramos a todos aquellos individuos que poseen el alelo 320 del locus *Aldo 1*, como la especie putativa uno, podemos decir que esta entidad habita en todos los sistemas amazónicos de Bolivia estudiados aquí, excepto en la cuenca del río Manuripi.

Además de esto, todos los individuos de este grupo fueron monomórficos para el locus *Opsin* (Cuadro 3).

Cuadro 2. Variabilidad genética de seis loci intrónicos en 10 poblaciones de *Cichla aff. monoculus* de la amazonía boliviana. En la parte superior se encuentra la población considerada, Manu (Manuripi), Yata, Lag Sal (Laguna Sala), Lag Lar (Laguna Larga), Lag Red (Laguna Redonda), Bo SM (Boca San Martín), San Joa (San Joaquín), Al Ité (Alto Iténez), Sécore e Ichilo. En la columna izquierda se presenta por locus: el número de individuos involucrados (N), las frecuencias alélicas, la heterocigocidad esperada (H exp.), ajustada (H n.b.) y observada (H obs.), y por último el valor del índice de endogamia (Fis). Al final de la tabla se presenta el valor de Fis múltiple (Fis Mult.) para cada población considerada.

	Manu	Yata	Lag Sal	Lag Lar	Lag Red	Bo SM	San Joa	Al Ité	Secure	Ichilo
Aldo 1										
(N)	10	11	39	37	10	10	24	21	11	13
315	1.00	0.55	0.74	0.62	0.80	0.60	0.75	0.95	0.55	0.00
320	0.00	0.45	0.26	0.38	0.20	0.40	0.25	0.05	0.45	1.00
H esp.	0.00	0.50	0.38	0.47	0.32	0.48	0.38	0.09	0.50	0.00
H n.b.	0.00	0.52	0.39	0.48	0.34	0.51	0.38	0.09	0.52	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fis	-	1.00 **	1.00 **	1.00 **	1.00 **	1.00 **	1.00 **	1.00 **	1.00 **	-
Aldo 2										
(N)	10	11	39	37	10	10	24	21	11	13
250	0.00	0.00	0.04	0.08	0.05	0.05	0.02	0.00	0.00	0.00
260	1.00	1.00	0.96	0.92	0.95	0.95	0.98	1.00	1.00	1.00
H esp.	0.00	0.00	0.07	0.15	0.10	0.10	0.04	0.00	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00	0.07	0.15	0.10	0.10	0.04	0.00	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.08	0.11	0.10	0.10	0.04	0.00	0.00	0.00
Fis	-	-	-0.03 ns	0.29 ns	0.00	0.00	0.00	-	-	-
Mhc										
(N)	10	11	39	37	10	10	24	21	11	13
300	0.00	0.05	0.04	0.01	0.00	0.00	0.04	0.05	0.00	0.00
305	1.00	0.95	0.96	0.99	1.00	1.00	0.96	0.95	1.00	1.00
H esp.	0.00	0.09	0.07	0.03	0.00	0.00	0.08	0.09	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.09	0.07	0.03	0.00	0.00	0.08	0.09	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.09	0.03	0.03	0.00	0.00	0.08	0.10	0.00	0.00
Fis	-	0.00	0.66 ns	0.00	-	-	-0.02 ns	-0.03 ns	-	-
Opsin										
(N)	10	11	39	37	10	10	24	21	11	13
500	1.00	1.00	1.00	0.96	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00
535	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
H esp.	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00
Fis	-	-	-	-0.03 ns	-	-	0.00	-	-	-
Actin 1										
(N)	10	11	39	37	10	10	24	21	11	13
700	0.00	0.59	0.63	0.55	0.45	0.55	0.69	0.60	0.77	0.00
730	0.00	0.00	0.01	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00
740	1.00	0.41	0.36	0.45	0.50	0.45	0.31	0.40	0.14	1.00
H esp.	0.00	0.48	0.48	0.49	0.55	0.50	0.43	0.48	0.38	0.00
H n.b.	0.00	0.51	0.48	0.50	0.57	0.52	0.44	0.49	0.39	0.00
H obs.	0.00	0.64	0.44	0.41	0.50	0.10	0.54	0.62	0.45	0.00
Fis	-	-0.27 ns	0.10 ns	0.19 ns	0.14 ns	0.82 **	-0.24 ns	-0.26 ns	-0.16 ns	-
Actin 2										
(N)	10	11	39	37	10	10	24	21	11	13
660	1.00	0.91	0.95	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	0.32	0.04
690	0.00	0.09	0.05	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.68	0.96
H esp.	0.00	0.17	0.10	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00	0.43	0.07
H n.b.	0.00	0.17	0.10	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.45	0.08
H obs.	0.00	0.18	0.10	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.27	0.08
Fis	-	-0.05	-0.04	-	-0.06	-	-	-	0.41	0.00
Fis Mult.	-	0.51 **	0.51 **	0.56 **	0.54 **	0.86 **	0.35 **	0.24 ns	0.48 **	0.00

ns = no significativo; * p<0.025; ** p<0.01.

Por otro lado, si tomamos en cuenta aquellos individuos que llevan el alelo 315 como la especie putativa dos, notaremos que del conjunto de puntos considerados en este estudio, solamente se encuentra ausente del río Ichilo. La variabilidad genética en esta entidad, es mayor que la primera, puesto que podemos encontrar individuos heterocigotos para el locus *Opsin* (Cuadro 3).

4.2 Hipótesis 1: dos especies

4.2.1 Variabilidad genética de la especie 1 (Aldo 1, 320)

La medida del equilibrio de Hardy-Weinberg en esta especie mediante el índice F_{is} , reflejó que todas las muestras de tucunaré provenientes de la amazonía boliviana, por locus y en su integridad, no mostraron un alejamiento significativo a la panmixia (Cuadro 3).

En lo concerniente a la heterogeneidad entre las distintas muestras obtenidas, se tiene que aquella presente en el río Ichilo, fue significativamente muy disímil ($p < 0.01$) al resto de grupos examinados que drenan la cuenca amazónica boliviana. La desigualdad expuesta encierra incluso al río Sécure, el cual comparte la misma cuenca del río Mamoré y se encuentra a la menor distancia geográfica respecto de los otros ríos. Sin embargo, la muestra del río Sécure solo mostró diferencias con la laguna Larga ($p < 0.01$) y con la laguna Sala ($p < 0.05$), y no así con las correspondientes del río San Joaquín y Yata.

Respecto al flujo genético entre las muestras, es de esperar que entre conjuntos más próximos se de un mayor intercambio genético. Los tucunarés obtenidos del río San Joaquín, San Martín y Yata, poseen el mayor movimiento de individuos pertenecientes a la especie 1. Pero cabe resaltar, que existe un flujo genético pequeño entre los tucunarés del río Yata y el río San Joaquín con los tucunarés del río Sécure, el cual es suficiente para considerarlas una sola población. Este resultado probablemente se deba al número reducido de individuos considerados tanto para el río Yata como para el río Sécure, en el cálculo del flujo genético (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Variabilidad genética de seis loci intrónicos en dos especies putativas de *Cichla* aff. *monoculus* en los ríos amazónicos de Bolivia. Para cada especie se presenta 6 poblaciones de los diferentes puntos considerados con la siguiente nomenclatura: Yata, San Joa (San Joaquín), Lag Lar (Laguna Larga), Lag Sal (Laguna Sala), Al Ite (Alto Iténez), Manu (Manuripi), Securé e Ichilo. A la izquierda de la tabla se expone el número total de especímenes considerados por cada muestra y locus (N), los alelos encontrados por locus, la heterocigosidad esperada (H exp.), ajustada (H n.b) y observada (H obs.), y por último el índice de endogamia (Fis). En la parte final de la tabla está el Fis Múltiple (Fis Mult.) para cada muestra poblacional.

	Especie 1						Especie 2							
	Yata	San Joa	Lag Lar	Lag Sal	Securé	Ichilo	Manu	Yata	San Joa	Lag Lar	Lag Sal	Lag Red	Al Ite	Securé
Aldo1														
(N)	5	6	14	10	5	13	10	6	18	23	29	14	20	6
320	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
315	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
H exp.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aldo2														
(N)	5	6	14	10	5	13	10	6	18	23	29	14	20	6
250	0.00	0.00	0.11	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.07	0.02	0.00	0.00	0.00
260	1.00	1.00	0.89	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97	0.93	0.98	1.00	1.00	1.00
H exp.	0.00	0.00	0.19	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.12	0.03	0.00	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00	0.20	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.12	0.03	0.00	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.21	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.04	0.03	0.00	0.00	0.00
Fis	-	-	-0.08 ns	-0.06 ns	-	-	-	-	0.00	0.66 ns	0.00	-	-	-
Mhc														
(N)	5	6	14	10	5	13	10	6	18	23	29	14	20	6
300	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.08	0.06	0.02	0.00	0.00	0.05	0.00
305	1.00	1.00	1.00	0.85	1.00	1.00	1.00	0.92	0.94	0.98	1.00	1.00	0.95	1.00
H exp.	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.15	0.10	0.04	0.00	0.00	0.10	0.00
H n.b.	0.00	0.00	0.00	0.27	0.00	0.00	0.00	0.17	0.11	0.04	0.00	0.00	0.10	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.17	0.11	0.04	0.00	0.00	0.10	0.00
Fis	-	-	-	0.64 ns	-	-	-	0.00	-0.03 ns	0.00	-	-	-0.03 ns	-
Opsin														
(N)	5	6	14	10	5	13	10	6	18	23	29	14	20	6
500	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97	0.93	1.00	1.00	1.00	1.00
535	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00
H exp.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00
H n.b.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00
H obs.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
Fis	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	-0.05 ns	-	-	-	-
Actin 1														
(N)	5	6	14	10	5	13	10	6	18	23	29	14	20	6
700	0.80	0.75	0.57	0.65	0.70	0.00	0.00	0.42	0.67	0.54	0.62	0.50	0.60	0.83
730	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.04	0.00	0.08
740	0.20	0.25	0.43	0.35	0.20	1.00	1.00	0.58	0.33	0.46	0.36	0.46	0.40	0.08
H exp.	0.32	0.38	0.49	0.46	0.46	0.00	0.00	0.49	0.44	0.50	0.48	0.53	0.48	0.29
H n.b.	0.36	0.41	0.51	0.48	0.51	0.00	0.00	0.53	0.46	0.51	0.49	0.55	0.49	0.32
H obs.	0.40	0.50	0.43	0.50	0.60	0.00	0.00	0.83	0.56	0.39	0.41	0.29	0.60	0.33
Fis	-0.14 ns	-0.25 ns	0.16 ns	-0.05 ns	-0.20 ns	-	-	-0.67 ns	-0.22 ns	0.23 ns	0.16 ns	0.49 ns	-0.23 ns	-0.05 ns
Actin 2														
(N)	5	6	14	10	5	13	10	6	18	23	29	14	20	6
660	0.90	1.00	1.00	0.90	0.30	0.04	1.00	0.92	1.00	1.00	0.97	0.93	1.00	0.33
690	0.10	0.00	0.00	0.10	0.70	0.96	0.00	0.08	0.00	0.00	0.03	0.07	0.00	0.67
H exp.	0.18	0.00	0.00	0.18	0.42	0.07	0.00	0.15	0.00	0.00	0.07	0.13	0.00	0.44
H n.b.	0.20	0.00	0.00	0.19	0.47	0.08	0.00	0.17	0.00	0.00	0.07	0.14	0.00	0.48
H obs.	0.20	0.00	0.00	0.20	0.20	0.08	0.00	0.17	0.00	0.00	0.07	0.14	0.00	0.33
Fis	0.00	-0.06 ns	-	-	0.60 ns	0.00	-	0.00	-	-	-0.02 ns	-0.04 ns	-	0.33 ns
Fis Mult.	-0.09 ns	-0.25 ns	0.09 ns	0.12 ns	0.20 ns	0.00	0.00	-0.4 ns	-0.16 ns	0.24 ns	0.13 ns	0.39 ns	-0.19 ns	0.18 ns

ns = no significativo; * p<0.025; ** p<0.01.

Por último las distintas poblaciones de la especie 1, repartidas en la red que conforma la parte alta del río Madera en Bolivia, se aproximan a una separación genética en tres conjuntos. El primero corresponde al río Ichilo ya que posee las distancias genéticas más

elevadas respecto a las otras muestras geográficas. El segundo conformado por los tucunares que habitan en el río Sécore, el cual tiene una distancia genética altamente significativa del río Ichilo ($p < 0.01$) y está parcialmente separado de la tercera unidad, la cual se conforma por los puntos considerados en el Iténez medio. La parcialidad que denotamos, se refiere a la diferencia que sólo se da con las muestras obtenidas en dos lagunas (Larga, $p < 0.01$ y Sala, $p < 0.05$) del río San Martín (Tabla 4).

Cuadro 4. Resumen de los parámetros que definen la estructuración genética entre las muestras de *Cichla* aff. *monoculus* (especie 1) provenientes de los ríos amazónicos bolivianos. Los nombres de las localidades son Ichilo, San Joaquín (San Joa), Laguna Larga (Lag Lar), Laguna Sala (Lag Sal), Sécore y Yata. Los parámetros comparados para cada par de poblaciones son, el índice de fijación (Fst), flujo genético (Nm) y la distancia genética (D).

		Yata	Secure	Lag Sal	Lag Lar	San Joa
Ichilo	Fst	0.87 **	0.66 **	0.69 **	0.75 **	0.89 **
	Nm	0.04 **	0.13 **	0.11 **	0.08 **	0.03 **
	D	2.05 **	1.08 **	1.16 **	1.41 **	2.23 **
San Joa	Fst	0.00	0.39 ns	0.00	0.01 ns	
	Nm	-	0.39 ns	-	30.45 ns	
	D	0.00	0.50 ns	0.00	0.01 ns	
Lag Lar	Fst	0.04 ns	0.38 **	0.00		
	Nm	6.57 ns	0.40 **	-		
	D	0.04 ns	0.48 **	0.00		
Lag Sal	Fst	0.00	0.23 *			
	Nm	-	0.86 *			
	D	0.00	0.26 *			
Secure	Fst	0.27 ns				
	Nm	0.68 ns				
	D	0.31 ns				

ns = no significativo; - = infinito; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Por otro lado, si nos preguntamos cual es el motivo principal de la estructuración encontrada entre poblaciones de la especie 1, pensaríamos que la distancia por el curso de los ríos no tendría efecto alguno debido a la extensa zona de inundación que poseen las principales cuencas de los ríos amazónicos bolivianos, y que en consecuencia, existiría al menos durante la época de agua altas, un movimiento migratorio entre ellas que se traduciría en un flujo genético.

Para probar aquello, se construyó una curva en la que se contrapuso, la distancia geográfica por el curso normal de las aguas de los ríos y entre puntos opuestos (o a vuelo de ave), y la distancia genética inferida. Los resultados que se presentan en la Figura 5, indican que la distancia por el curso de los ríos tiene la influencia principal sobre el efecto de aislamiento entre las poblaciones de la especie 1, con un coeficiente de correlación de $r = 0.65$ ($p < 0.01$), más que el curso por la zona de inundación ($r = 0.11$, $p > 0.1$). Por lo tanto, al menos para la especie 1 de *Cichla* aff. *monoculus* que habita los ríos amazónicos bolivianos, el canal principal de los ríos es un camino de dispersión preferencial, comparado al curso por la planicie de inundación.

4.2.2 Variabilidad genética de la especie 2 (Aldo 1, 315)

Los valores obtenidos para el índice de endogamia correspondientes a las diferentes muestras obtenidas en los sistemas amazónicos de Bolivia (especie 2), indican que al tratar locus por locus como a los mismos en su totalidad, no existe un desplazamiento considerable al equilibrio de Hardy-Weinberg en la especie 2 (Cuadro 3).

Las muestras del río Manuripi y del río Sécore fueron altamente diferentes ($p < 0.01$) cuando fueron comparadas entre ellas y con cada una de las otras muestras geográficas de tucunaré (Cuadro 5). Por lo tanto se puede afirmar que el mayor flujo genético entre los grupos de estos peces, se da entre aquellos ubicados en el río Yata, San Martín y San Joaquín. La distancia genética estimada para todas las muestras correspondientes a la especie 2, indican que al igual que en el caso de la especie 1 se pueden diferenciar tres conjuntos, uno formado únicamente por aquellos que habitan el río Manuripi, otro por los tucunarés correspondientes al río Yata, río San Martín (laguna Sala, Larga y Redonda), San Joaquín y la parte alta del río Iténez, y finalmente un último grupo conformado por los individuos del río Sécore (Cuadro 5, Figura 5 y 6).

Haciendo la misma consideración que para la especie 1, respecto a cual de las distancias geográficas (a vuelo de ave o por el curso normal de los ríos), explica mejor la distancia genética entre poblaciones separadas geográficamente de la especie 2, encontraremos en

la Figura 5, que el aislamiento entre las poblaciones se debe principalmente a un efecto de la distancia por el curso regular de los ríos. De este modo se puede sugerir que la dispersión de los tucunarés de la especie 2, toma lugar preferentemente por el cauce principal de los ríos, más que por la planicie de inundación. La ecuación que describe la línea de correlación posee un coeficiente de $r = 0.8$ ($p < 0.01$).

Cuadro 5. Parámetros poblacionales estimados para las muestras obtenidas de *Cichla aff. monoculus* (especie 2) en los ríos amazónicos de Bolivia. Las localidades están denominadas como Yata, Manu (Manuripi), Sécore, laguna Sala (lag Sal), laguna Redonda (lag Red), San Joaquín (San Joa) y Alto Iténez (Al Ité). Los parámetros comparados para cada par de poblaciones son el índice de fijación (Fst), el flujo genético (Nm) y la distancia genética (D).

		Yata	Manu	Secure	Lag Sal	Lag Red	Lag Lar	San Joa
Al Ité	Fst	0.02 ns	0.47 **	0.44 **	0.00	0.00	0.00	0.00
	Nm	10.24 ns	0.28 **	0.32 **	-	-	-	-
	D	0.02 ns	0.64 **	0.58 **	0.00	0.00	0.00	0.00
San Joa	Fst	0.05 ns	0.50 **	0.40 **	0.00	0.01 ns	0.00	
	Nm	4.35 ns	0.25 **	0.38 **	-	18.55 ns	-	
	D	0.06 ns	0.69 **	0.50 **	0.00	0.01 ns	0.00	
Lag Lar	Fst	0.00	0.33 **	0.39 **	0.00	0.00		
	Nm	-	0.51 **	0.39 **	-	-		
	D	0.00	0.40 **	0.50 **	0.00	0.00		
Lag Red	Fst	0.00	0.38 **	0.37 **	0.00			
	Nm	-	0.41 **	0.43 **	-			
	D	0.00	0.47 **	0.46 **	0.00			
Lag Sal	Fst	0.03 ns	0.46 **	0.40 **				
	Nm	7.08 ns	0.29 **	0.37 **				
	D	0.04 ns	0.62 **	0.52 **				
Secure	Fst	0.38 **	0.80 **					
	Nm	0.41 **	0.06 **					
	D	0.47 **	1.61 **					
Manu	Fst	0.36 **						
	Nm	0.44 **						
	D	0.45 **						

ns = no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

4.2.3 Comparación del polimorfismo genético y distribución geográfica de las dos especies de *Cichla aff. monoculus* en Bolivia.

La distancia genética existente entre las distintas muestras poblacionales de *Cichla aff. monoculus* pertenecientes a la especie 1, permite crear un dendrograma de similitud (UPGMA) para ilustrar lo anteriormente explicado (Figura 6). La primera comparación entre los individuos del río Ichilo y las muestras capturadas en el río Sécore, Yata, San

Martín y San Joaquín en conjunto, indica una diferencia altamente significativa para el valor calculado de F_{st} ($p < 0.01$). A continuación se tiene los tucunares provenientes del río Sécure versus las restantes poblaciones nominadas más arriba. El valor de F_{st} determinado para esta comparación, también refleja una diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.01$). Como ya se había mostrado en los precedentes, solo aquellas 3 poblaciones individuales reflejan heterogeneidad a nivel genético.

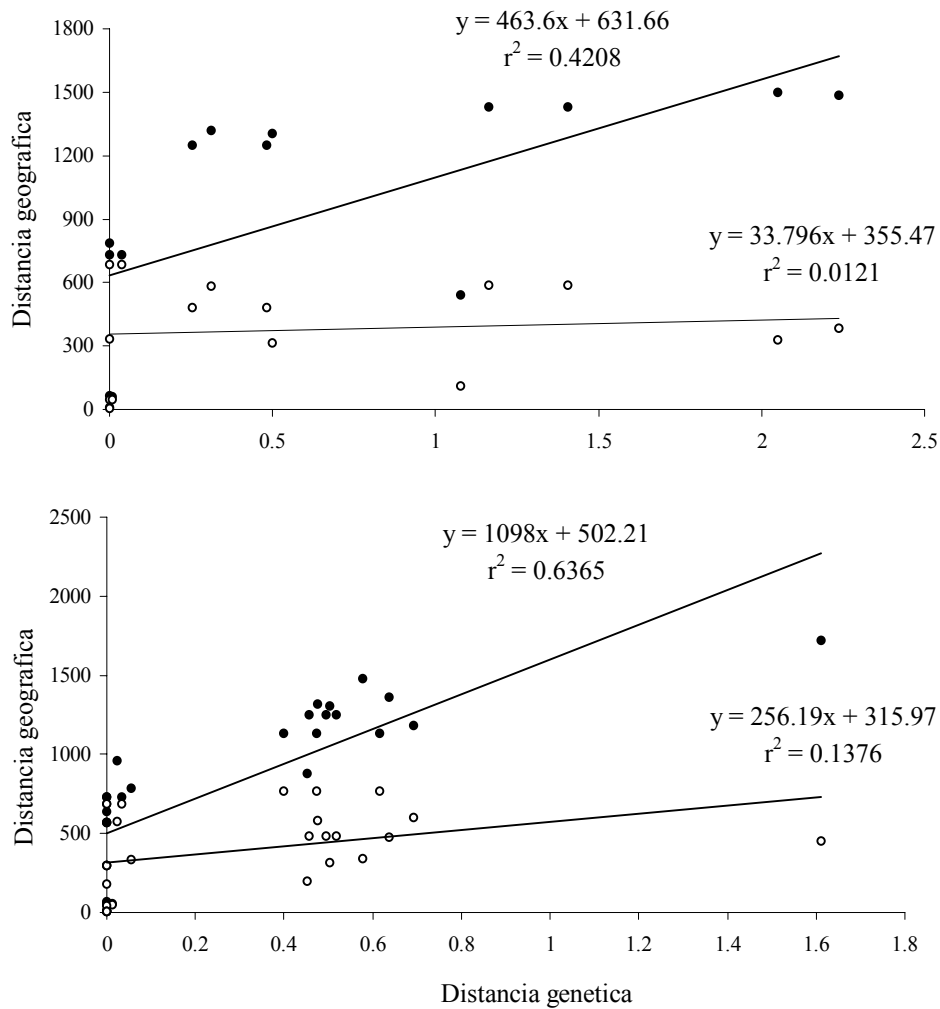


Figura 5. Representación de la correlación existente entre la distancia geográfica por el curso natural de los ríos y la distancia a vuelo de ave, vs la distancia genética obtenida. En la parte superior de la figura se encuentra las líneas de correlación para la especie 1 y en la inferior para la especie 2. Cada una de ellas posee cerca de los trazos, la ecuación y el valor del coeficiente de determinación r^2 para la correspondencia relativa a la longitud del curso de los ríos (puntos oscuros). De la misma forma, en la parte inferior derecha están la ecuación y el coeficiente r^2 que describen la curva a vuelo de ave (puntos claros).

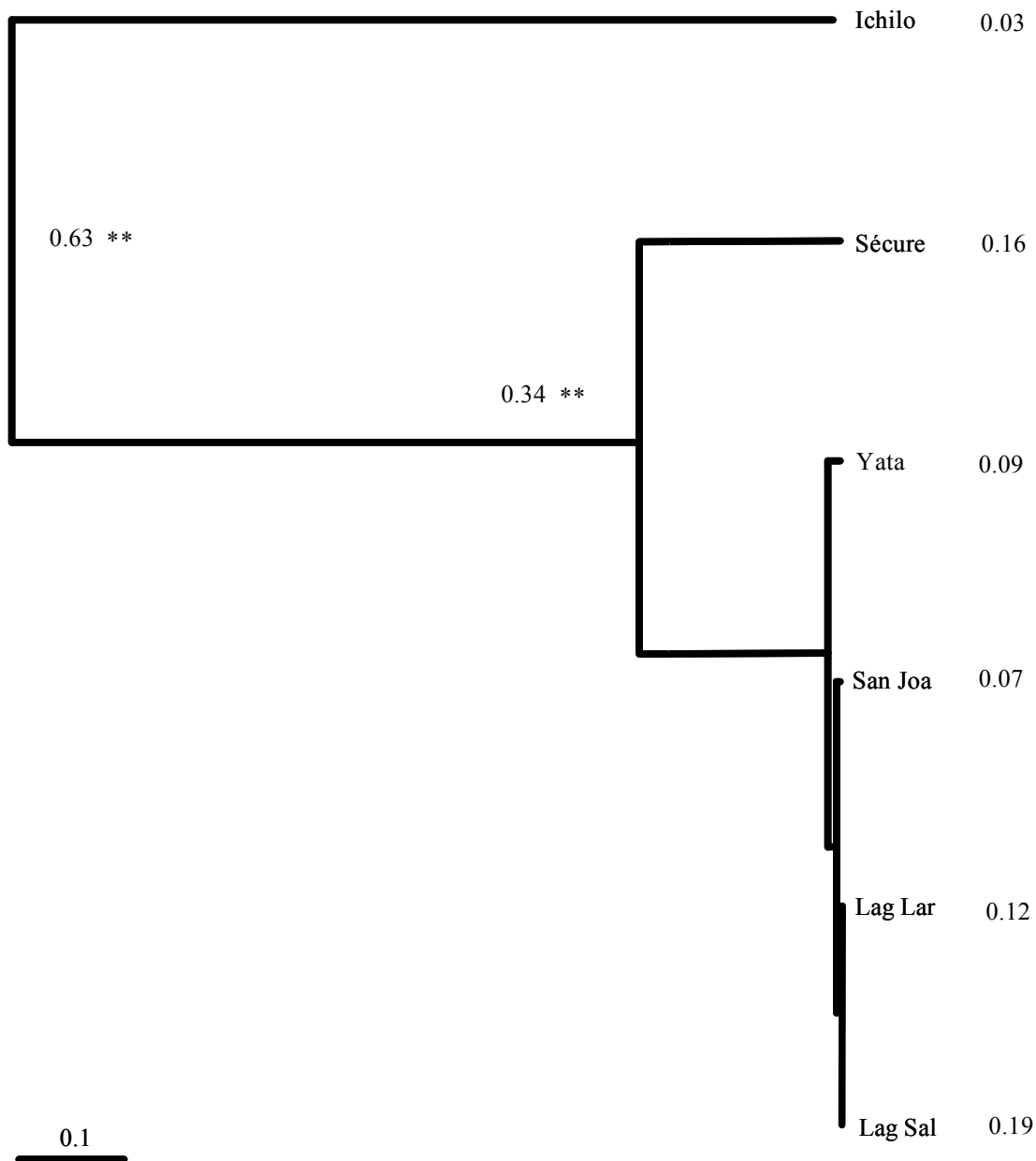


Figura 6. Dendrograma de similitud construido según el criterio UPGMA, basado en las distancias genéticas para todos los loci en la especie 1 de *Cichla* aff. *monoculus*. Los valores cerca de los nodos representan el cálculo del índice Fst (** p < 0.01), obtenido al comparar las poblaciones que quedan a cada lado de las ramas. Las muestras corresponden a río Ichilo, río Sécure, río Yata, río San Joaquín (San Joa), laguna Larga (Lag Lar) y laguna Sala (Lag Sal). Al final de las ramas se presenta los valores para la heterocigosidad calculada según Nei (1978).

Además de lo mencionado anteriormente, si comparamos los dos valores de F_{st} calculados en el árbol, veremos que la diferencia existente entre la muestra proveniente del río Ichilo y sus semejantes en otros puntos, es de casi el doble al existente cuando comparamos los tucunares del río Sécore con los de otros lugares.

Por último, tomando en cuenta la presencia de la especie 1 en los ríos de la planicie amazónica boliviana considerados aquí, podemos notar que se encuentra en los siguientes sistemas: río Ichilo, río Yata, río Iténez en su parte media (representados en este trabajo por el río San Martín (laguna Sala, Larga y Redonda) y río San Joaquín, y por último la parte alta del río Iténez. Este último punto, no figura en los análisis realizados para esta especie, debido a que solo se encontró un individuo de 21 considerados de este lugar (Figura 7).

Un esquema de lo explicado hasta ahora sobre la estructuración de la especie 1 en los ríos de Bolivia se presenta en la Figura 7, las poblaciones diferenciadas se encuentran delimitadas en círculos y la magnitud de las flechas es proporcional al flujo genético existente entre las mismas.

De la misma forma, un dendrograma de similitud (UPGMA) fue generado empleando la distancia genética calculada en función del F_{st} estimado para las 6 muestras de tucunare concernientes a la especie 2 (Figura 8). Los trazados indican que, los especímenes provenientes del río Manuripi al ser comparados con sus semejantes del río Iténez, Yata y Sécore, reflejan una diferencia altamente significativa en el estimador de F_{st} ($p < 0.01$). Avanzando en el árbol, la siguiente y última diferencia genética ($p < 0.01$), se da entre la población del río Sécore y la rama que reúne las muestras del río Yata e Iténez.

De una manera sintética a nivel geográfico, la Figura 9 describe la estructuración genética de la especie 2 de tucunare en Bolivia. Como ya fue expuesto párrafos anteriores, tres grupos genéticos claros están presentes en los ríos amazónicos bolivianos. El primero y de más amplia distribución, es aquel formado en conjunto por el río Yata más el río Iténez, los dos restantes se localizan en el río Manuripi y el río Sécore.

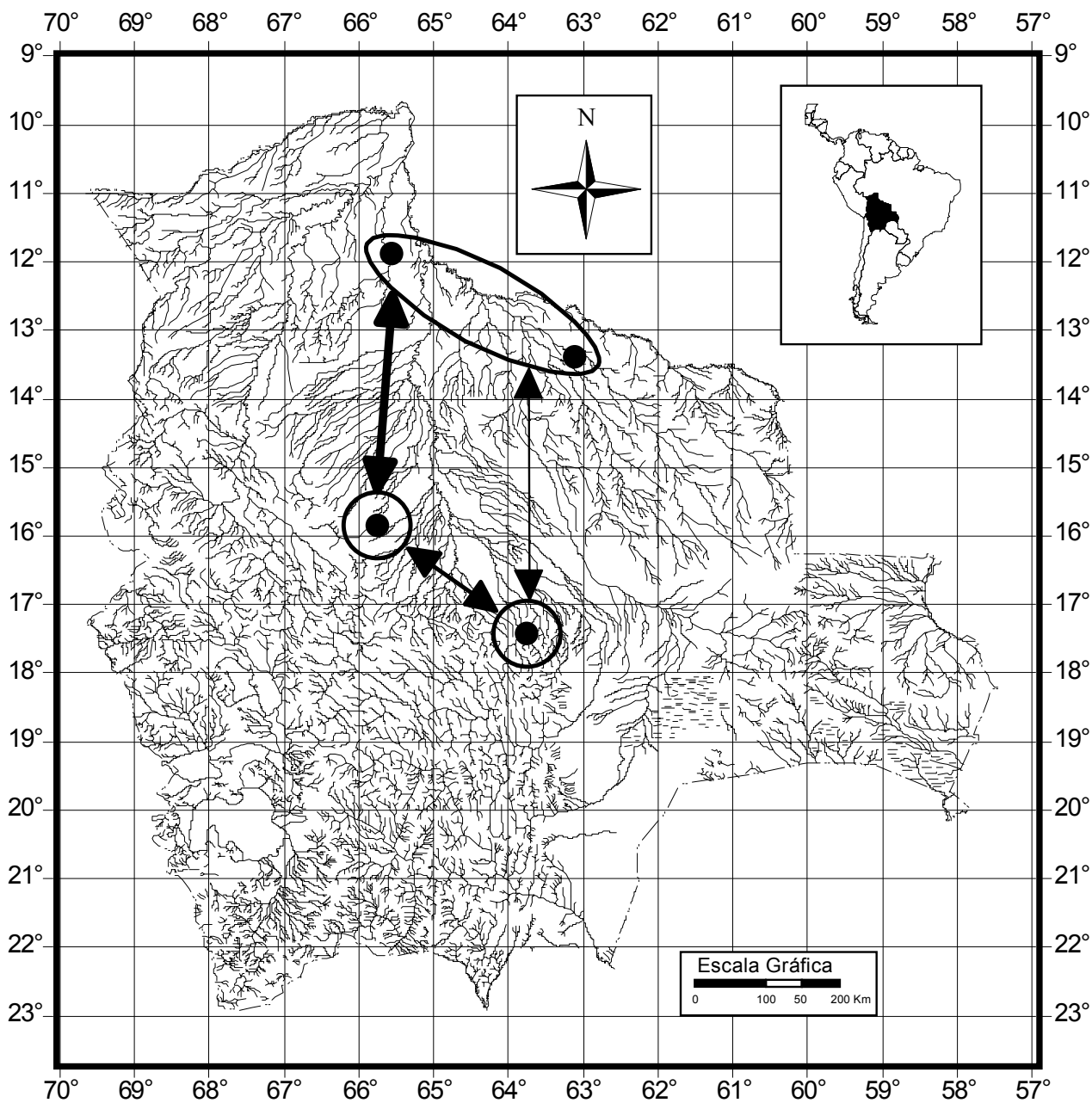


Figura 7. Distribución geográfica de la especie 1 de *Cichla* aff. *monoculus*, en los diferentes sistemas fluviales amazónicos bolivianos. Las circunferencias y el óvalo indican las poblaciones genéticamente distintas y las flechas establecen la proporcionalidad del flujo genético existente entre ellas, por el grosor de sus líneas.

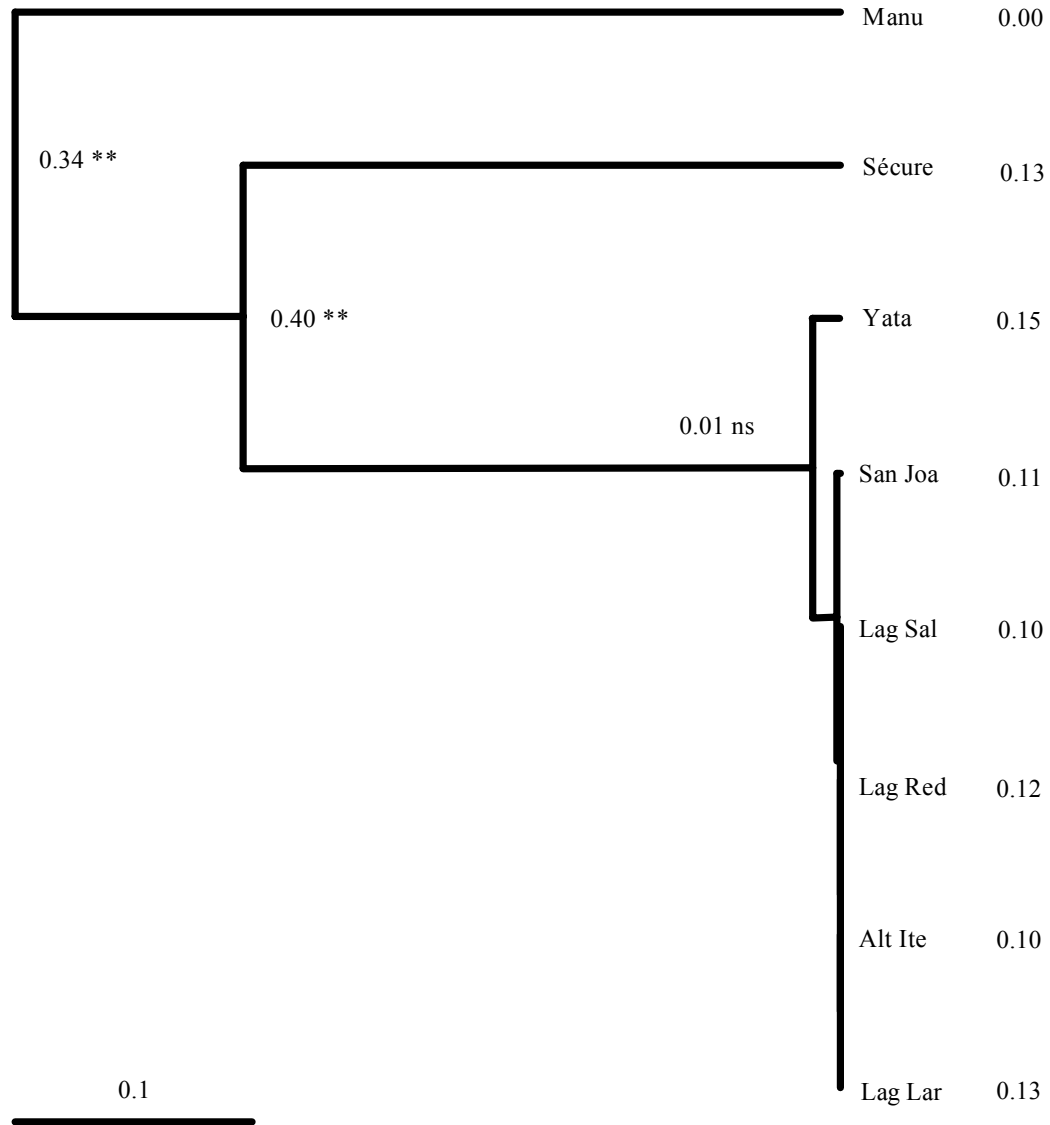


Figura 8. Dendrograma de similitud construido bajo el criterio UPGMA, usando distancias genéticas derivadas del cálculo de F_{st} para las poblaciones de tucunaré (especie 2). Los números colocados en el punto de divergencia de las poblaciones, indica el índice de fijación entre los diferentes conjuntos de muestras que corresponden a cada rama (** $p < 0.01$). Las muestras en el análisis son del río Manuripi (Manu), río Sécure, río Yata, río Iténez en su parte media, representado por el San Joaquín (San Joa), laguna Sala (Lag Sal), Larga (Lag Lar) y Redonda (Lag Red) sobre el río San Martín, y por el Iténez en su parte alta (Alt Ité). A lado del código de las localidades se ubica la heterocigosidad calculada siguiendo el criterio de Nei (1978).

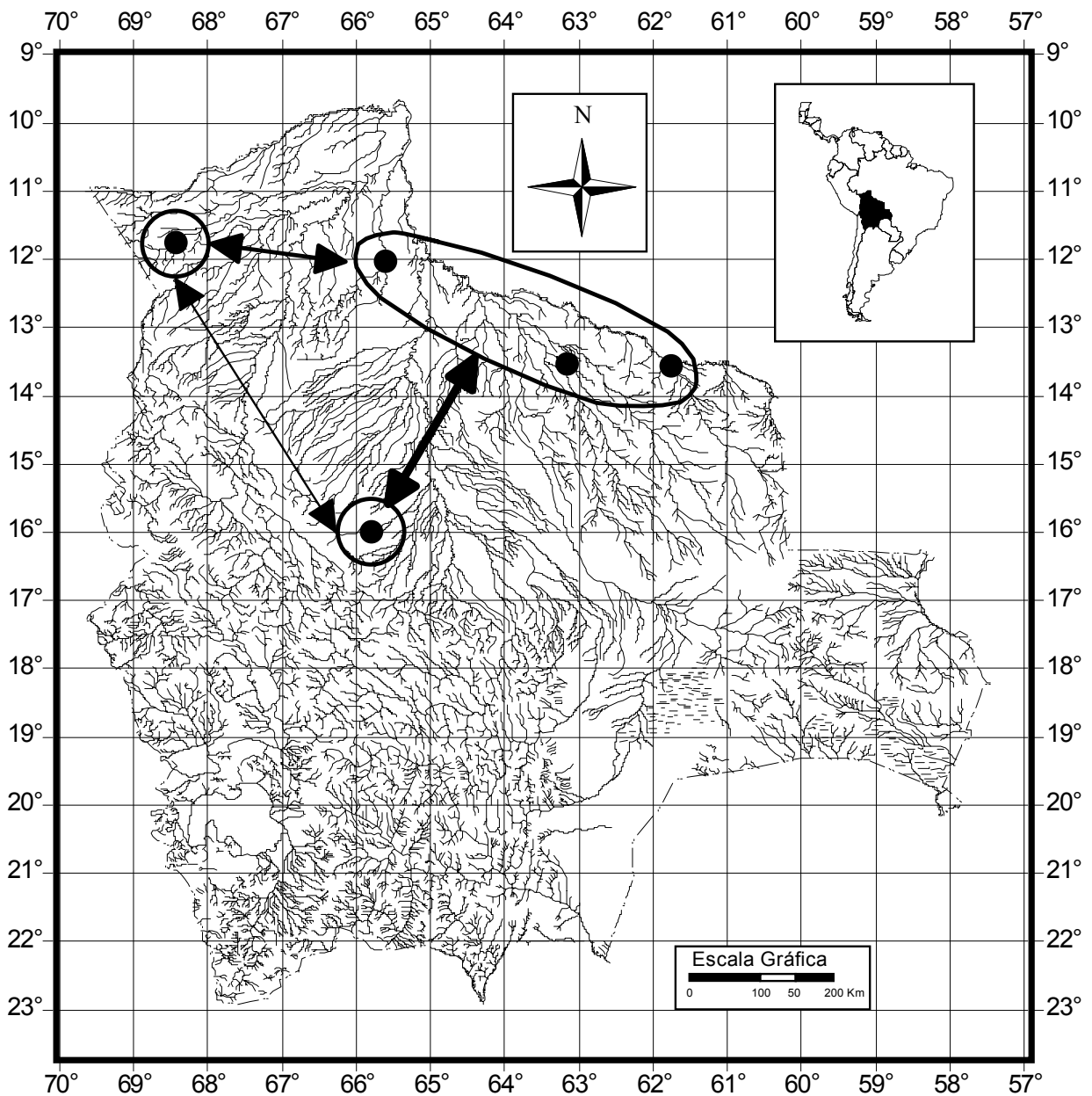


Figura 9. Representación geográfica de la estructura genética de la especie 2 de tucunaré, en los distintos ríos amazónicos de Bolivia. Las líneas circulares y el óvalo indican la posición geográfica de una población genéticamente diferente de las otras. Las flechas indican la dirección del intercambio genético, mostrando la proporcionalidad del flujo por el grosor de sus barras.

4.3 Hipotesis 2: una especie

4.3.1 Análisis genético sin considerar el locus *Aldo 1*

Si se considera al locus *Aldo 1*, como un marcador específico de las dos especies de tucunaré, se podría asegurar, que al momento ellas aparecen como especies incipientes muy cercanas, ya que ninguno de los otros locus analizados distanció los grupos en el mismo sentido.

Pero por otro lado, se podría suponer que el locus *Aldo 1* proporciona información errónea o incompleta a cerca de las poblaciones de *Cichla* aff. *monoculus* en los ríos amazónicos bolivianos y que solo tratamos con una sola especie. De esta manera, si dejamos de considerar al locus *Aldo 1*, y procedemos con el respectivo cálculo del índice de endogamia para cada una de las muestras geográficas con los 5 loci restantes (Fis Mult.), notaremos que todos los grupos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto aquel obtenido sobre el río San Joaquín casi en la confluencia con el río San Martín, posiblemente debido al tamaño de muestra considerado (10 ind.) (Cuadro 6).

Tomando en cuenta el nivel de diferenciación entre grupos geográficos, podemos manifestar que solo la comparación entre la muestra del río Manuripi y aquella cerca de la boca del río San Joaquín, poseen una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Cuadro 7). Los restantes pares de comparaciones entre el río Ichilo, río Sécore y río Manuripi con las otras muestras geográficas, exhibieron una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$). Contrario a aquello, las muestras provenientes del río Yata y el río Iténez en su parte media y alta, forman un solo conjunto (Cuadro 7).

La comparación entre las distancias geográficas (a vuelo de ave y siguiendo el curso de los ríos) y la distancia genética generada en función al índice F_{st} , señala que el intercambio genético entre las poblaciones se da principalmente por los canales de los ríos más que por la planicie de inundación, sugiriendo de esta manera, un aislamiento por

la longitud de los ríos. La ecuación que describe la curva generada posee un coeficiente de correlación $r = 0.75$ ($p < 0.001$) (Figura 10).

Cuadro 6. Variabilidad genética obtenida para las muestras de tucunaré (una sola especie) obtenidas de diferentes puntos de la amazonía boliviana. El cálculo del índice de endogamia múltiple (Fis Mult.) fue realizado sin el locus *Aldo 1*. Las muestras analizadas provienen del río Manuripi (Manu), Yata, Laguna Sala (Lag Sal), Laguna Larga (Lag Lar), Laguna Redonda (Lag Red), San Joaquín en la boca del San Martín (Boca SM), río Iténez en su parte alta (Al It), río Ichilo y río Sécore.

	Manu	Yata	Lag Sal	Lag Lar	Lag Red	Boca SM	San Joa	Al It	Ichilo	Secure
Fis Mult.	0.00	-0.19 ns	0.12 ns	0.18 ns	0.08 ns	0.69 *	-0.18 ns	-0.23 ns	0.00	0.15 ns

ns = no significativo, * $p < 0.05$

Cuadro 7. Parámetros que miden el nivel de estructuración entre grupos geográficas de *Cichla aff. monoculus* (1 sola especie) provenientes de los sistemas amazónicos de Bolivia. A la izquierda de la columna se encuentran el índice de fijación (Fst), el flujo genético existente entre cada par de muestras (Nm) y la distancia genética entre las mismas (D). Las muestras consideradas provienen del río Manuripi (Manu), río Yata, laguna Sala (Lag Sal), laguna Larga (Lag Lar), laguna Redonda (Lag Red), río San Joaquín propiamente (San Joa) y el mismo casi en la confluencia con el San Martín (Boca SM), río Iténez en su parte alta (Al It), río Ichilo y río Sécore. Las pequeñas barras horizontales representan el valor ∞ .

		Yata	Secure	Ichilo	Manu	Alt It	San Joa	Boca SM	Lag Red	Lag Lar
Lag Sal	Fst	0.00	0.35 **	0.68 **	0.40 **	0.00	0.00	0.00	0.01 ns	0.00
	Nm	-	0.46 **	0.12 **	0.38 **	-	-	-	47.67 ns	92.83
	D	0.00	0.44 **	1.14 **	0.51 **	0.00	0.00	0.00	0.01 ns	0.00
Lag Lar	Fst	0.00	0.40 **	0.68 **	0.33 **	0.00	0.01 ns	0.00	0.00	
	Nm	-	0.37 **	0.12 **	0.52 **	-	17.63 ns	-	-	
	D	0.00	0.51 **	1.13 **	0.40 **	0.00	0.01 ns	0.00	0.00	
Lag Red	Fst	0.00	0.33 **	0.70 **	0.33 **	0.01 ns	0.05 ns	0.00		
	Nm	-	0.52 **	0.11 **	0.5 **	18.88 ns	4.43 ns	-		
	D	0.00	0.39 **	1.19 **	0.41 **	0.01 ns	0.06 ns	0.00		
Boca SM	Fst	0.00	0.40 **	0.79 **	0.46 *	0.00	0.00			
	Nm	-	0.38 **	0.07 **	0.29 *	-	-			
	D	0.00	0.51 **	1.56 **	0.62 *	0.00	0.00			
San Joa	Fst	0.00	0.41 **	0.77 **	0.62 **	0.00				
	Nm	193.21	0.36 **	0.08 **	0.23 **	-				
	D	0.00	0.53 **	1.46 **	0.73 **	0.00				
Alt It	Fst	0.00	0.43 **	0.77 **	0.46 **					
	Nm	-	0.34 **	0.08 **	0.29 **					
	D	0.00	0.56 **	1.45 **	0.62 **					
Manu	Fst	0.46 **	0.71 **	0.96 **						
	Nm	0.29 **	0.1 **	0.01 **						
	D	0.62 **	1.25 **	3.10 **						
Ichilo	Fst	0.74 **	0.63 **							
	Nm	0.09 **	0.15 **							
	D	1.34 **	0.99 **							
Secure	Fst	0.32 **								
	Nm	0.54 **								
	D	0.38 **								

ns = no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

En la Figura 11, se describe gráficamente la distancia genética existente entre las diferentes poblaciones de tucunaré que ocupan los ríos de la cuenca amazónica de Bolivia. En esta figura se puede reconocer, que la población más distante de entre todas las muestras consideradas, pertenece al sistema del río Ichilo, con un valor de $F_{st} = 0.61$ ($p < 0.01$). Ulteriormente, la población proveniente del río Manuripi, está significativamente aislada del conjunto de poblaciones restantes como una entidad individual ($F_{st} = 0.33$, $p < 0.01$). Finalmente podemos decir que en las aguas del río Sécore, habita otra población diferenciada de aquella que reside en los ríos Yata e Iténez conjuntamente ($F_{st} = 0.40$, $p < 0.01$).

De esta forma se puede afirmar, que a pesar de no considerar el locus *Aldo 1* dentro de nuestro análisis, seguirá existiendo una estructuración muy fuerte entre las mismas cuatro poblaciones que fueron definidas al examinar los 6 loci en conjunto.

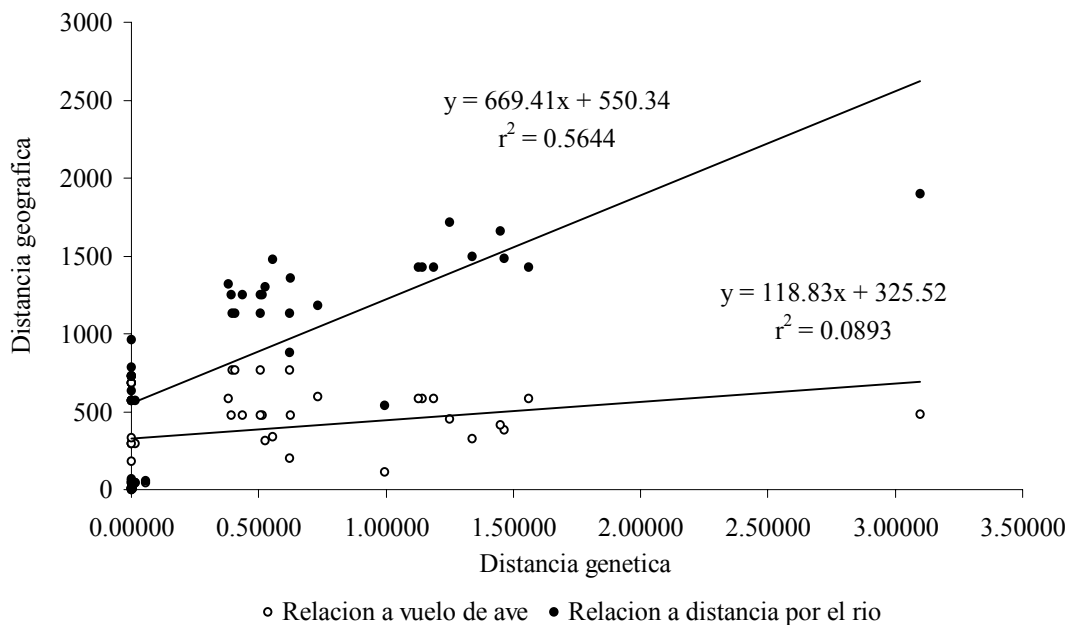


Figura 10. Descripción de la correlación existente entre la distancia geográfica de los diferentes puntos de colecta (a vuelo de ave y por el curso normal de los ríos) y la distancia genética calculada al considerar una sola especie de tucunaré en Bolivia. Cerca de las curvas, se ubican las ecuaciones y coeficiente de correlación.

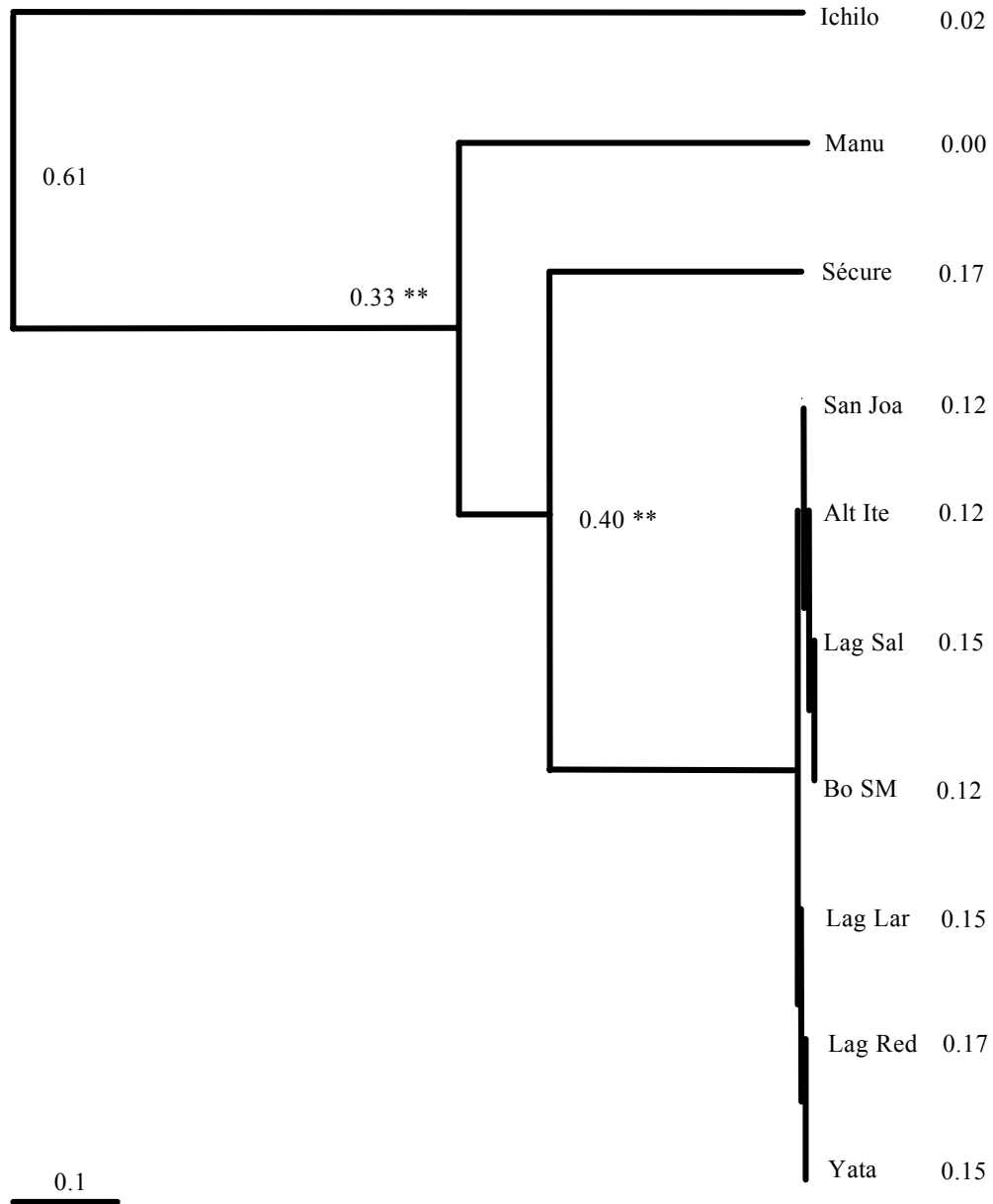


Figura 11. Dendrograma de similitud (UPGMA), construido según la distancia genética entre todas las muestras de tucunare en Bolivia, sin considerar el locus *Aldo 1*. Los valores próximos a los nodos, representan los estimadores de F_{st} obtenidos al comparar las poblaciones que engloban las ramas desde aquel punto. Las muestras en la figura provienen del río Ichilo, Manuripi (Manu), Sécore, San Joaquín, Alto Iténez, laguna Sala, laguna Larga, laguna Redonda y Yata.

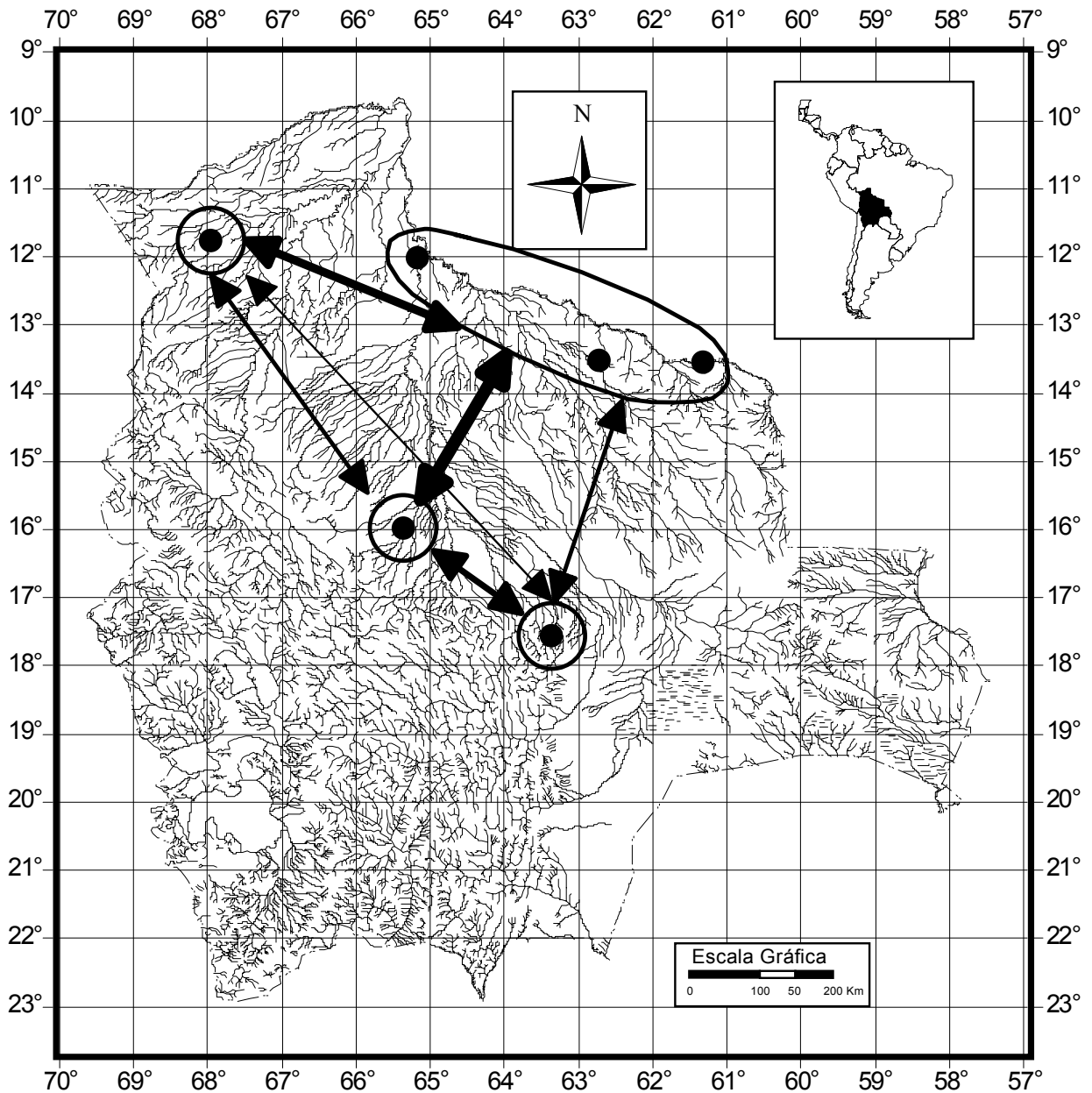


Figura 12. Ilustración de la estructuración genética a nivel geográfico de las 4 poblaciones de tucunaré encontradas en los ríos bolivianos, que corresponden a la cuenca del alto Madera. Los círculos y el óvalo representan a una población en particular y las flechas al intercambio genético existente entre ellas, siendo su grosor proporcional al flujo de genes.

Una última visualización de la estructuración genética a nivel de la posición geográfica de los ríos amazónicos-bolivianos, se expone en la Figura 12. Los puntos delimitados

corresponden a las poblaciones genéticamente sub-divididas, y como ya se mencionó con anterioridad, las más distantes genéticamente y que concuerdan con las más distantes geográficamente, son aquellas habitando el río Ichilo y el río Manuripi. Empero, el mayor flujo de entre las cuatro poblaciones se da entre la del río Sécore y la población integrada por la cuenca del río Yata e Iténez.

5. DISCUSIÓN

De lo expuesto hasta aquí, se puede resaltar que los fundamentos que sostienen cada hipótesis son de magnitudes diferentes. Por este motivo comenzaremos a analizar cada hipótesis propuesta en los resultados, siguiendo la robustez y fuerza de sus argumentos.

La primera y la más factible, es aquella que considera la información del locus *Aldo 1* como errónea o incompleta por la relativa dificultad en su lectura y la divergencia solitaria que refleja (ningún otro locus considerado apunta en el mismo sentido). Y en consecuencia, considera una sola especie de tucunaré fuertemente estructurada en relación a la distancia geográfica de los ríos.

La segunda, y de mayor incertidumbre por el momento, considera la información del locus *Aldo 1* como verdadera y separa a dos especies putativas de *Cichla*. Cada una de ellas, se encuentra independientemente estructurada en tres poblaciones correspondientes a distintas zonas geográficas del drenaje amazónico de Bolivia.

A continuación damos algunos detalles sobre las ideas que apoyan cada una de las hipótesis planteadas.

5.1 Hipotesis de una especie de tucunaré y su estructuración en ríos bolivianos del alto Madera

Se demostró (respaldado por 5 locus intrónicos) que 4 poblaciones internamente en panmixia, conforman la estructura genética de *Cichla* aff. *monoculus* en la amazonía boliviana. Aquellas poblaciones se ubican en zonas geográficas distintas unas de las otras y el flujo genético entre ellas es de magnitudes variables. Los movimientos restringidos (sedentarismo) que caracterizan a estas especies (Hoeinghaus *et al.*, 2003) concuerdan con estos resultados. Sin embargo, se debe continuar analizando mayor número de locus y de individuos, para caracterizar mejor los patrones de flujo génico entre las poblaciones y proveer una estimación más robusta de la migración.

Gracias a que el cauce principal de los ríos es el camino de dispersión más importante para el tucunaré en los ríos amazónicos bolivianos, es evidente que el aislamiento entre poblaciones se debe principalmente a su distancia geográfica. Manifestaremos el estado de una tendencia clara hacia poblaciones menos estructuradas y resultados menos significativos cuando las muestras del mismo sistema/región de un río fueron comparadas entre sí, que cuando las poblaciones de diferentes sistemas/región fueron comparadas con las de otras (con la excepción Sécure-Ichilo). Al parecer podríamos esperar que las distancias geográficas entre sistemas sean importantes (tal como ocurre entre el río Ichilo y Manuripi), mientras que distancias geográficas entre poblaciones dentro un mismo sistema es de limitada importancia para la estructura genética de las poblaciones.

Por lo tanto, al menos para esta especie, la planicie de inundación no cumple un papel homogeinizante entre poblaciones geográficamente distantes.

En cuanto a la diversidad genética(alélica) encontrada para *Cichla* aff. *monoculus* en los ríos que atraviesan la amazonía boliviana, se identificó a la zona de los ríos San Martín-San Joaquín (cuenca del río Iténez), como el lugar con mayor diversidad de alelos (población ancestral). Ninguna de las otras poblaciones consideradas en este estudio mostró alguna exclusividad de alelos comparado a esta última. Debido a esto, pensamos que el río Iténez pudo haber sido o una zona de refugio o una zona de pasaje intermedio en la colonización de los ríos de la amazonía boliviana por parte de tucunarés provenientes del río Madera. Según Torrico (2004), de todos los linajes filogenéticos de *Cichla* identificados en la amazonía boliviana, el más próximo al grupo ancestral es el correspondiente a la zona del Iténez central.

En el primer caso, una población residente en Bolivia quedo refugiada en las aguas del río San Martín-San Joaquín durante los períodos desfavorables del Cuaternario (eventos de glaciación). Desde allí más tarde se dispersaría a la red hidrográfica de la amazonía boliviana, posiblemente como parte de la deriva génica.

En la segunda alternativa, los tucunarés que ahora habitan en Bolivia, habrían llegado desde algún punto ubicado en el río Madera. La primera zona de colonización para esta especie estaría aproximadamente en la zona del Iténez medio (río San Martín-San Joaquín). Posteriormente a este hecho, la población fuente se dispersaría hacia las cuencas del río Ichilo-Mamoré, Orthon-Madre de Dios y otras de menor tamaño (i.e. Yata).

Para comprobar estas hipótesis, deben ser considerados individuos que habiten en puntos a lo largo del río Madera y en otros lugares de la amazonía (i.e. río Ucayali). Este tipo de comparaciones nos permitirá saber además, si aquellas poblaciones pueden ser identificadas según el perfil del locus *Aldo 1* y si las mismas poseen una variabilidad genética mayor a la registrada hasta aquí.

Sea cual sea el evento que explique mejor la mayor diversidad genética registrada en la zona del río Iténez, es claro que las cuencas restantes de la amazonía en Bolivia, fueron colonizadas por una población fuente proveniente de la zona del río San Martín-San Joaquín. A diferencia del río Yata y Sécuré, las muestras poblacionales procedentes del río Ichilo y Manuripi, revelaron un estado monomórfico para todos los loci analizados. Esta constitución particular en las poblaciones más distantes genética y geográficamente, puede ser explicado por la ocurrencia de dos eventos fundadores hacia 2 cuencas distintas de forma independiente.

Deben ser llevados a cabo trabajos adicionales con el fin de explicar la forma en la que sucedieron aquellos eventos de colonización y las razones (si es que existen) por las cuales genotipos diferentes alcanzaron ambientes acuáticos distintos (i.e. desde el punto de vista ecológico).

5.2 Hipótesis de dos especies de tucunaré en Bolivia y su estructuración genética en los ríos amazónicos bolivianos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto a esta hipótesis, no representan evidencia suficiente para afirmar la existencia de dos especies diferentes de *Cichla* en los

ríos amazónicos bolivianos. Según la información proporcionada por el locus *Aldo 1*, queda abierta la posibilidad de existir dos entidades genéticas distintas, las cuales pudieron haber surgido mediante un proceso de especiación alopátrica con un contacto secundario posterior, o mediante un proceso de especiación simpátrica complejo. Para esclarecer esta incertidumbre taxonómica, debe ser generada información adicional analizando otros loci intrónicos y mayor número de individuos.

La consideración hipotética de dos especies de *Cichla* habitando los ríos de la cuenca amazónica boliviana, puede ser válido sólo si se asume que el aislamiento reproductivo aún de muy corta duración, no permitió una acumulación discernible de cambios y/o mutaciones en cada linaje. Por esta razón, es que cada especie putativa de tucunaré posee un polimorfismo ancestral elevado en los restantes loci considerados (Figura 13).

5.2.1 Especiación simpátrica hipotética

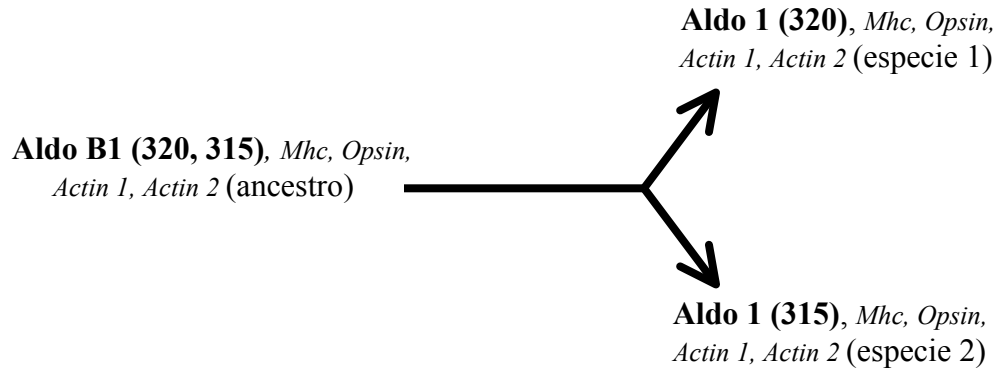


Figura 13. Representación del polimorfismo ancestral supuesto entre las especies putativas de tucunaré encontradas en los ríos de la planicie amazónica en Bolivia.

Aun que hasta ahora es desconocida la causa por la cual divergieron las especies de *Cichla* en Sud América, la ocurrencia de dos taxa diferentes en la misma área geográfica del río Iténez, Mamoré y Yata, no sería el primer registro de coexistencia dentro el género, ya que *C. monoculus*, por ejemplo, comparte los mismos sistemas amazónicos

que *C. orinocensis* y *C. temensis* en ríos brasileros, colombianos y venezolanos (Kullander, 1986, 2003; Winemiller, 2001). Al parecer, todas las especies de *Cichla* pueden ser encontradas en el territorio venezolano y de ellas, *C. ocellaris* es la única que no habita el mismo espacio con sus demás congéneres (Winemiller, 2001). Las restantes ocupan los ríos que principalmente drenan hacia la cuenca del río Orinoco y una parte hacia el río Amazonas a través de las aguas del río Negro, el cual se encuentra conectado con el primero mediante las aguas del río Casiquiare. Recientemente en proximidades de este último, han sido registradas 4 especies de *Cichla* en simpatria (Winemiller, 2001).

Presumiblemente, algún lugar en los ríos venezolanos o en la amazonía central (próximo al río Negro), fue el lugar de origen de estos interesantes peces durante el levantamiento final de los Andes y los últimos períodos interglaciares (Andrade *et al.*, 2001), ya que el mayor número de especies correspondientes al género se encuentran en aquellos lugares. Desde allí se dispersaron a varios afluentes que desembocan en el sistema amazónico, algunas especies alcanzaron mayores distancias de distribución que otras. Los casos extremos se dan al comparar la distribución de *C. ocellaris* y *C. monoculus*. El primero está restringido solo a una fracción en la parte Nor-Este de Sud América (Kullander & Nijssen, 1989; Winemiller, 2001; Keith *et al.*, 2000), mientras que el segundo está a lo largo de todo el río Amazonas y algunos ríos de las Guayanas (Kullander, 1986; Winemiller, 2001). El gran alcance de localidades que ha logrado *C. monoculus*, probablemente involucra a numerosos cuellos de botella que ocurrieron cada vez que colonizó una cuenca nueva. Gracias a esta diferencia inicial, una divergencia admisible a nivel intra-específico en su poza génica podría ser acompañada por diferencias en el desarrollo y morfología.

Datos merísticos como el número de escamas, la longitud de la tercera espina dorsal y la presencia de la cuarta banda transversal hacia el pedúnculo caudal, no son concordantes entre la descripción del verdadero *C. monoculus* que habita en el Brasil y los *Cichla* provenientes de Bolivia (Kullander, com. pers. a F. Duponchelle). Además de aquello, los registros del tamaño y peso para peces capturados en Brasil y Perú, son bastante desiguales a los obtenidos en los ríos bolivianos, incluso en los lugares donde casi no

existe la pesca (Renno, Duponchelle & Carvajal obs. pers). Posiblemente se trate de una o varias especie(s) endémica(s) del alto Madera (como fue sugerido por Torrico, 2004, y por Kullander a Duponchelle en com. pers.), pero también podría tratarse de una forma bastante alejada del verdadero *C. monoculus* que habita la parte central y oeste del río Amazonas. Para confirmar aquello se debe continuar con estudios que comparen las poblaciones bolivianas y poblaciones que estén identificadas de acuerdo a la descripción original de esta especie.

Como comentario adicional a esto, Willink *et al.* (1999), reportaron para las aguas del río Manuripi (Norte de Bolivia), la presencia de una forma distinta de *Cichla* comparada a las del resto del país, y Andrade *et al.*, (2001) colectaron individuos idénticos al *C. monoculus* de la zona de Porto Velho, Rondônia (río Madera).

Casi todos los ríos venezolanos donde habitan los *Cichla* spp. son de aguas negras (Taphorn & Barbarino Duque, 1993; Winemiller *et al.*, 1997; Jepsen *et al.*, 1997; Willams & Winemiller, 1998; Winemiller, 2001). Este tipo de aguas generalmente nacen en las llanuras aluviales y poseen una transparencia significativa por la reducida cantidad de sólidos suspendidos y disueltos que llevan consigo (Sioli, 1968, 1984). La visibilidad permitida por la transparencia de estas aguas, pudo haber jugado un rol importante en la especiación de estos peces. Los cíclidos neotropicales y africanos se caracterizan por la gran variabilidad e intensidad de colores que presentan. Muchos trabajos han mencionado al Sistema de Reconocimiento de Pareja (SRP) (Paterson, 1985) como un mecanismo de especiación rápida en los cíclidos (p.e. Haplochrominae) que habitan los grandes lagos africanos, donde se sugiere que la coloración puede ser particularmente susceptible a la selección sexual (Ribbink *et al.*, 1983; Dominey, 1984; Paterson, 1985; Ribbink, 1986; Knight & Turner, 1999; Kornfield & Smith, 2000; Couldridge & Alexander, 2002)

Seehausen *et al.* (1997), demostraron que en condiciones de visibilidad reducida producida por la eutrofización antropogénica en algunas zonas del lago Victoria (Africa), la interferencia en el reconocimiento visual de signos sexuales guiados por el color,

permitió la hibridización de dos especies que en condiciones naturales de transparencia se encontraban reproductivamente aisladas por un mecanismo pre-cigótico.

Al igual que en aquellos cuerpos de agua, pudieron haber sucedido fenómenos similares en las aguas de los ríos venezolanos, donde la transparencia favoreció el reconocimiento entre formas fenotípicas con diferentes preferencias reproductivas gobernadas por el color.

La cuenca del río Iténez en general y otros ríos que nacen en la llanura aluvial que drenan hacia la parte alta del río Madera (i.e. Yata), han sido corrientemente clasificados como de aguas negras por el parecido en el color y la transparencia a aquellas clasificadas verdaderamente con aquel nombre (i.e. río Negro en Brasil) (i.e. Killeen, 1998). La mayor diversidad genética que fue encontrada en los tucunares bolivianos, se ubica en los ríos que desembocan en la parte central del río Iténez, aquellos tributarios son casi exclusivamente de aguas transparentes y de corriente suave (llanura aluvial del escudo brasileiro, Navarro & Maldonado, 2002).

La primera hipótesis que se planteará va en la misma dirección que para los cíclidos de lagos africanos y probablemente para los *Cichla* de Venezuela. En un caso supuesto de simpatria, posiblemente algún tipo de preferencia(s) sexual(s) relacionada con el color o forma, conllevó a la especiación simpátrica de los tucunares bolivianos en la zona del río San Martín-San Joaquín.

La coloración en estos peces difiere bastante entre regiones e incluso dentro de ellas. En la parte alta del río Iténez, por mencionar un ejemplo (Bella Vista y río Paraguá), los tucunares capturados en lagunas desconectadas del cauce principal del río durante la época de aguas bajas (casi comenzando la época de reproducción), poseen un color casi completamente negrusco en el dorso y ocasionalmente un color rojo a amarillo en el vientre, mientras que peces obtenidos en lagunas conectadas con el canal principal por una gran cárcava, pero que su corriente es inapreciable, son casi completamente verde-oliva con colores amarillos a pálidos en el vientre (ver Muñoz, 2002). Por último,

aquellos que fueron pescados a orillas de la corriente principal, fueron en su mayoría de un amarillo intenso brillante. Variaciones diferentes a las mencionadas, también fueron observadas en especímenes provenientes tanto de lagunas aledañas al río San Martín como del mismo río, el cual está varias centenas de kilómetros río abajo del anterior punto. Allí, los colores amarillo y plomo podían claramente ser diferenciados en individuos obtenidos de una misma localidad, y ocasionalmente algunos llevaban colores intermedios. Tales variaciones geográficas de color pueden ser de importancia central para el aislamiento reproductivo y la generación de diversidad (Kornfield & Smith, 2000).

Observaciones similares fueron comentadas por Junk *et al.* (1997) en especímenes pertenecientes al género *Symphysodon* provenientes de diferentes regiones de la amazonía. Las disimilitudes sugieren una separación respectiva de sus poblaciones. Generalmente en alopatria, las diferencias en la coloración de los cíclidos machos que van a reproducirse han sido uniformemente empleados para reconocer especies por el decremento en el número de sus características compartidas (Lewis, 1982; Ribbink, 1986). Por otro lado, en el río Tocantins, Tapajos y Uatumã (Brasil), colores y formas intermedias entre *C. monoculus* y *C. temensis*, resultaron ser híbridos entre las dos especies al analizar la constitución de su genoma mitocondrial (Andrade *et al.*, 2001).

Eventualmente también, los colores UV, que son desapercibidos por el ojo humano, pueden jugar diversos roles en los cíclidos neotropicales, como ocurre para otros peces (Losey *et al.*, 1998). Al parecer, la relevancia del color para la diferenciación taxonómica permanece como una pregunta central no solo en la evolución de las especies flock de los cíclidos del este del Africa (Kornfield & Smith, 2000), si no también para los cíclidos del nuevo mundo (Wilson *et al.*, 2000).

Otro mecanismo probable de especiación simpátrica que pudo haber ocurrido con los tucunarés del río Iténez, es aquel relacionado con la divergencia de nicho (repartición de recursos). Para algunos taxa, la adquisición y defensa del territorio puede ser el factor más crítico influenciando el suceso reproductivo (Kornfield & Smith, 2000).

En la amazonía, las lagunas que se encuentran en la planicie de inundación de los ríos de aguas negras, poseen la diversidad más alta de cíclidos, comparado a los ambientes de aguas blancas donde eventualmente también pueden ser capturadas varias de aquellas formas (Henderson & Crampton, 1997). En general las aguas negras poseen mayor riqueza específica que las aguas blancas (Henderson & Crampton, 1997; Saint-Paul *et al.*, 2000). La ausencia de una inundación extrema, hace que sean sistemas más estables que aquellos de la várzea. Y a pesar de su baja producción primaria anual, mantienen altas cosechas por parte de sus componentes bióticos.

En comparación, los sistemas de aguas blancas son menos estables debido a que están sujetos a un ciclo de inundación anual y muchas veces atraviesan períodos con bajas concentraciones de oxígeno que matan a los peces (Henderson & Crampton, 1997; Saint-Paul *et al.*, 2000). La riqueza específica de aquellos dos tipos de hábitats puede ser explicada en parte por la cantidad de nutrientes que posee cada uno. En las aguas negras, la limitación de los recursos evitará la dominancia de algún grupo en especial y los componentes presentes serán especialistas del nicho que ocupan; lo que permite la existencia de un gran número de especies con abundancia reducida. En cuanto a las aguas blancas, la abundancia de recursos disponibles permitirá la dominancia de ciertos grupos que controlarán la estructura de la comunidad (Henderson & Crampton, 1997).

En el caso del río San Martín-San Joaquín, la limitación de los recursos disponibles podría haber dirigido una divergencia inicial a nivel de nicho entre los tucunares que habitan esta región. La disminución paulatina de los apareamientos entre miembros de las sub-poblaciones, se daría como un efecto de la selección, la cual opera más eficientemente sobre poblaciones fragmentadas que ocupan diversos hábitats y sufren cambios (a nivel de los rasgos de vida) para asegurar su reproducción y sobrevivencia (Wright, 1931; Haskins *et al.*, 1961; Carvalho, 1993).

Sería interesante averiguar, si la separación reciente de las dos especies putativas encontradas, puede reflejar diferencias a nivel de la repartición de recursos (nicho) y los rasgos de vida. Además de aquello, deben dirigirse estudios detallados sobre el régimen

hidrológico, contenido de nutrientes y la producción relacionada a las aguas que drenan la amazonía boliviana. Estos datos ayudarán a tener una mejor interpretación de la dinámica de las comunidades de peces en estos ambientes, ya que los sistemas acuáticos del alto Madera posiblemente son bastante diferentes a los encontrados en la amazonía central (Navarro & Maldonado, 2002), donde la mayor parte de los trabajos sobre este punto fueron realizados. Sin embargo, es dificultoso establecer un mecanismo quimio-hidrológico simple guiando aquellos eventos potencialmente significativos desde el punto de vista biológico.

Entre algunos sucesos que proponen la separación de nichos como el factor principal en la divergencia de entidades, se puede mencionar: el origen monofilético de las especies de tilapia en los lagos-crater de Camerún gracias a una rápida diferenciación trófica (Schliwewen *et al.*, 1994; Schuller, 1998). Nagelkerke *et al.* (1995), por su parte, sugirieron que la especialización trófica en los ‘barbs’ del lago Tana parece ser el factor principal que promueve el aislamiento reproductivo entre estos peces, y sobre el mismo punto, Berrebi & Valiushok (1998), indicaron que una separación en espacio y/o tiempo de las zonas de desove, puede contribuir rápidamente a la formación de especies. Sin embargo, Turner (1994), indica que a pesar de la gran diversidad morfológica trófica existente en los cíclidos africanos, generalmente se considera improbable que estas especializaciones tengan una influencia significativa guiando la especiación.

5.2.2 *Especiación alopatrica y contacto secundario hipotético*

Un segundo modelo que podría explicar el origen de dos especies en la zona del río Iténez, podría ser formulado a partir de la Teoría del Refugio en los neotrópicos, lo cual ya fue mencionado por Ibáñez (2002) para la zona del río San Martín y para algunas zonas del Neotrópico por Weitzman & Weitzman (1982) y Renno *et al.*, (1991).

Tomando en cuenta que la diversidad genética encontrada en la parte central del río Iténez es superior al resto de los puntos considerados en Bolivia, y que las variaciones encontradas en todos ellos no son exclusivas de los mismos; podemos sospechar que en la

zona del Iténez central, las poblaciones pudieron haber permanecido en refugios durante los disturbios paleoclimáticos del Cuaternario. Los remanentes poblacionales de esta zona restringida, quedaron en algún momento separados por un tiempo suficientemente largo como para alcanzar un nivel de divergencia al menos como subespecies, las cuales fueron favorecidas por el reforzamiento cuando se dio un contacto secundario. De esta manera podríamos explicar el porqué de la mayor diversidad genética de esta zona, la separación muy reciente reflejada por el locus *Aldo 1* y el polimorfismo ancestral encontrado.

Para las especies 'flock' en la mayoría de los lagos del mundo, un prerequisite para la especiación, es que durante los eventos episódicos del medio es necesario aislar pozas génicas de los co-específicos bajo diferentes condiciones ambientales nuevas. Si la alopatria de tales pozas guía al desarrollo de poblaciones, cada una de las cuales sigue un futuro evolucionario separado por virtud del desarrollo de distintos sistemas de reconocimiento de pareja, entonces se puede asumir que la especiación toma lugar (Working group, 1994).

5.3 Comparación entre especies putativas de tucunaré en Bolivia

Los eventos de colonización se dan como efecto de los cuellos de botella, debido generalmente, al movimiento de poblaciones de tamaño pequeño que van de una cuenca a otra, o de un río a otro. Aquellos sucesos fortalecen la deriva genética y luego dirigen la pérdida (impredecible) de diversidad genética. En aquellas condiciones, las poblaciones localizadas en o cerca al origen de la especie, son aquellas que deben tener los niveles más altos de diversidad genética (Agnèse *et al.*, 1996; Adépo-Gourène *et al.*, 1997). La deriva genética en las poblaciones involucra cambios aleatorios en la frecuencia de los alelos, y aquellos cambios no ocurrirán exactamente en la misma forma en loci independientes (Palumbi & Baker, 1994). La deriva genética puede guiar a cambios erráticos en las frecuencias de alelos sin la fuerza homogeneizadora del flujo génico (Hansen & Mensberg, 1997).

La estructuración encontrada en los *Cichla* que habitan los ríos bolivianos concuerda con el sedentarismo que caracteriza a estas especies no migradoras (Junk *et al.* 1997; Hoeninghaus *et al.*, 2003) y apoya la idea de que el intercambio genético en los ríos amazónicos se da principalmente de forma longitudinal y no de forma transversal por pasos supuestos a través de la planicie de inundación (Junk, 1997). La presencia-ausencia observada para las dos especies supuestas, puede ser explicada por la ocurrencia independiente de dos cuellos de botella (deriva génica) que tomaron lugar hacia dos cuencas distintas. La población fundadora de la especie 1 se desplazó hacia la cuenca del río Ichilo (parte alta del río Mamoré), e individuos fundadores correspondientes a la especie dos, alcanzaron el sistema del río Orthon (río Manuripi).

Una combinación de los factores ambientales y biológicos a los que están sujetos puede estar condicionando la presencia de cada una de ellas en sus diferentes hábitats. Henderson & Crampton (1997) mostraron que el oxígeno disponible y las interrelaciones tróficas son los factores principales que determinan la presencia de peces (entre ellos el tucunaré) más que la química del agua; aunque Junk *et al.* (1996), ejemplifica algunos casos diferentes a estos. En las lagunas de aguas negras el contenido de oxígeno es persistentemente alto mientras que dentro de los lagos de várzea, los cuerpos de agua por debajo de los 2 metros son casi siempre desoxigenados debido a la demanda biológica producida por la gran cantidad de detritus que se genera (Henderson & Crampton, 1997). Posiblemente, la especie presente en el río Ichilo, posee una mayor resistencia a condiciones de anoxia, turbiedad y continuas variaciones en el nivel del agua. Al contrario, la especie que habita en el río Manuripi, podría ser más resistente al ataque de nemátodos por ejemplo (los cuales son abundante en esta cuenca, Carvajal obs. per.) y estar ajustada a una mayor regularidad en el nivel de las aguas, las cuales también fueron tipificadas como negras por Barbosa *et al.* (1999 a, b).

También existen las barreras fisicoquímicas. Las adaptaciones específicas a las diferentes condiciones hidroquímicas de las aguas blancas y negras, son de ventaja evolutiva para las especies animales y vegetales que habitan en ellas. Después de la adaptación a condiciones hidroquímicas específicas, la migración de una especie de un afluente a otro

puede ser prevenida por la diferente composición hidroquímica de los principales ríos conectados. Por ejemplo, *Symphysodon discus* está restringido a aguas claras, mientras que *S. aequifasciata* ecotipo “royal blue” se encuentra sólo en aguas blancas (Geisler & Schneider, 1976). Se ha demostrado que el contenido mineral de los huesos de aquellas dos especies difiere de acuerdo a las condiciones hidroquímicas del hábitat respectivo (Junk *et al.*, 1997). Diferencias en la química del agua, fueron sugeridas como barreras supuestas para peces migradores desde hábitats de aguas negras a hábitats de aguas blancas (Goulding *et al.*, 1988; Junk *et al.*, 1997).

Al nivel de la cuenca amazónica de Bolivia, es importante preguntarnos si el tipo de aguas que corren a través de esta, representa una verdadera barrera para el movimiento de los tucunarés. Todos los ríos considerados en este estudio no poseen una barrera geográfica que pueda obstaculizar el movimiento de peces de una cuenca a otra y por lo tanto podrían ser considerados como parte de un mismo hábitat extenso. Las condiciones de simpatria o alopatría para los *Cichla* que ocupan las aguas bolivianas, quedan como una pregunta central a responder en futuras investigaciones. La confirmación de uno de estos modelos, será un aporte importante en el intento de identificar o un complejo de especies o una estructuración marcada que está en camino de la especiación.

Especies relacionadas que experimentan diferentes grados de heterogeneidad ambiental, son importantes para estudios que intentan entender los efectos de las fuerzas selectivas que mantienen la variación genética en las poblaciones naturales (Kornfield & Koehn, 1975) y la demografía histórica en base a modelos empíricos (Hare *et al.*, 2002). Ibáñez (2002), utilizó electroforesis de proteínas (isoenzimas) y de intrones, como marcadores genéticos para evaluar la variabilidad genética de tucunarés provenientes del río Iténez (laguna Sala y Larga), río Mamoré y Manuripi (Hiroshima). Sus datos de isoenzimas reflejaron una estructuración importante entre sub-poblaciones que se hallaban en simpatria. La diferenciación genética entre ellas, sugiere que podría tratarse de varias especies. Una sub-población nómada habitaría todas las sub-cuencas consideradas en su trabajo y otras tres (sedentarias) se hallarían en dos lagunas que se encuentran a poco menos de 5 km de distancia siguiendo el curso del río San Martín en la cuenca del río

Iténez. Lo interesante de estas últimas tres sub-poblaciones diferentes, es que dos de ellas corresponden, respectivamente, a dos capturas realizadas con un año de diferencia y en un mismo cuerpo de agua (Laguna Sala).

En lo concerniente a sus resultados reflejados por los fragmentos intrónicos (tres de los cuales fueron utilizados en este estudio), se encontraron sólo dos sub-poblaciones claramente diferentes. Una correspondiente al río Manuripi (sub-cuenca del río Orthon-Madre de Dios) y la otra a la sub-cuenca del río San Martín (cuenca del río Iténez). En la sub-cuenca del río Mamoré, se encontró una población local diferenciada que compartía el mismo grupo con peces provenientes de las dos sub-cuencas mencionadas anteriormente. Además de aquello, en el río Manuripi fue hallado un alelo exclusivo del locus *Mhc*. Estos resultados son parcialmente diferentes a los encontrados en el presente estudio. Por una parte, las isoenzimas van en el mismo sentido de varias especies en simpatria a pesar de dar una descripción diferente a los EPIC. Y por otra, la técnica de PAGE da mayor resolución que la electroforesis en geles de agarosa.

Pero, un suceso que parece coincidir con los datos obtenidos en las corridas de poliacrilamida, es que los individuos del río Sécure (afluente del río Mamoré) poseían alelos que también estuvieron localizados tanto en el río Iténez como en el río Manuripi. Sugerimos que la razón principal para tal disimilitud, es que Ibáñez obtuvo sus resultados solamente de la lectura en geles de agarosa. Al comparar el número de bandas obtenidas en agarosa y poliacrilamida, se encontró una diferencia significativa (datos no publicados). La red formada por agarosa no permite distinguir fragmentos que son de peso molecular aproximado, mientras que los geles de poliacrilamida pueden separar fragmentos que son diferentes hasta en 5 pares de bases y su lectura se realiza casi sin dificultad. Adicionalmente a esto, podemos comentar que incluso en geles de agarosa no fue posible dar una interpretación coherente a las varias bandas visualizadas cuando se amplificó el intrón *Mhc*, posiblemente debido a su naturaleza multilocus encontrada por Hassan *et al.* (2002).

6. CONCLUSIONES



Se ha delimitado a la cuenca del río Iténez en su parte central, como la zona de mayor diversidad genética entre las poblaciones consideradas de tucunaré, que habitan los distintos ríos que convergen hacia el alto Madera en Bolivia. Dos alelos pertenecientes a dos locos distintos, fueron exclusivos de esta región: *Opsin* (535) y *Aldo 2* (250).



Basados en la variabilidad genética encontrada a partir de cinco loci intrónicos pilimórficos, se ha identificado a cuatro poblaciones fuertemente estructuradas (las cuales corresponden a 4 puntos geográficos distintos), como la situación de mayor probabilidad dentro los tucunarés que habitan los principales tributarios del alto Madera en la amazonía boliviana.



Alternativamente, se identificó al locus *Aldo 1* del intrón *Aldolasa B1*, como un posible marcador diagnóstico en la separación de dos especies putativas de *Cichla* aff. *monoculus* que habitan conjuntamente en las principales sub-cuencas del mayor afluente del río Amazonas en su parte más alta en Bolivia.



Las poblaciones de la especie putativa 1 están geográficamente diferenciadas en tres unidades. La más distante de ellas reúne a individuos provenientes de la cuenca del río Ichilo, lugar donde no ha sido encontrada la especie 2.



Las poblaciones correspondientes a la especie 2, poseen una estructuración que corresponde a tres puntos geográficos distintos. La población más distante está establecida en la cuenca del río Orthon, donde no han sido capturados especímenes concernientes a la especie 1.



Ha sido detectada una alta correlación entre la distancia genética correspondiente a cada muestra poblacional obtenida por especie en los principales ríos amazónicos de Bolivia y la distancia geográfica por el curso natural de los ríos que las conectan. De esta manera se ha demostrado, al menos para los ríos bolivianos, que el flujo de genes entre las poblaciones de tucunaré se da principalmente por los canales principales de los ríos, más que por las extensas áreas de la planicie de inundación.

7. PERSPECTIVAS

Estos resultados son un primer paso para incentivar y continuar con estudios que enfoquen y aclaren muchas interrogantes que se plantea no solo para los *Cichla* bolivianos que forman parte de la cuenca del alto Madera en Bolivia, si no también para los cíclidos neotropicales en general.

En función a los resultados presentados y las dudas que surgen al intentar explicar la variabilidad genética en función a los loci utilizados, se puede aludir algunos puntos que deben tocarse en el futuro:



Puesto que la técnica de EPIC-PCR es de reciente aplicación en genética de poblaciones de peces (Palumbi, 1995), es necesario confirmar si las variantes basadas en el PCR, son heredadas en una forma mendeliana. Para este fin se deben realizar cruza experimentales bajo condiciones controladas en una estación piscícola. Amplificaciones iniciales usualmente producen varios productos correspondientes a diferentes loci amplificados. Una ventaja de aquellos productos múltiples es que varios, presumiblemente loci independientes, pueden ser identificados usando los iniciadores iniciales, y aquellos pueden ser examinados separadamente por el uso de iniciadores rediseñados para ser específicos a un locus únicamente (e.i. en *Aldolasa b1*).



De ser demostrada la herencia mendeliana del locus *Aldo 1*, se deberán conducir experimentos que puedan aclarar si existe o no un aislamiento reproductivo entre las dos especies putativas y conocer más acerca de los rasgos fenotípicos (i.e. color de los machos), que pueden estar involucrados en el aislamiento reproductivo. La estación piscícola “El Prado” (Santa Cruz) donde miembros del IRD están llevando a cabo un proyecto sobre reproducción de especies nativas colectadas en diferentes puntos de Bolivia, puede ser un buen lugar para comenzar a realizar estas pruebas.



Una forma alternativa de saber si se trata con dos especies distintas, puede ser alcanzada si visualizamos diferencias a nivel de los rasgos de vida (reproducción, crecimiento y otros), ecología (repartición de los recursos), sistemática (filogénia, ontogénia y morfometría) y etología (formas de reproducción) en condiciones naturales. Mediante ellas se puede identificar especies hermanas con una taxonomía anatómica complicada tal como fue realizado por Ribbink *et al.* (1983) en complejos de los cíclidos africanos o con especies simpátricas de *Cichla* en Venezuela (Jepsen *et al.*, 1997). Además de esto, una vez que tales poblaciones son reconocidas y mantenidas separadas cuando son colectadas, un cuidadoso análisis de las muestras discretas podrá exhibir diferencias anatómicas entre las especies hermanas, las cuales son esenciales para la identificación de especímenes en museos como fue mostrado por Marsh (1983).



Muestras adicionales de otros puntos de Bolivia (i.e. a lo largo del río Ichilo-Mamoré) pueden ayudar a interpretar la forma de dispersión de los tucunarés y la dinámica del flujo genético (clinas) existente entre las poblaciones geográficamente diferenciadas.



Adicionalmente a la perspectiva del último punto, una filogénia de las dos especies putativas debe ser llevado a cabo, para proveer una base informativa de la evolución de características importantes en estados tempranos de la divergencia.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adépo-Gourène, B., G. G., Teugels, L. M., Risch, M. M., Hanssens & J. F., Agnès. 1997. Morphological and genetic differentiation of 11 populations of the African catfish *Chrysichthys nigrodigitatus* (Siluroidei; Claretoidi), with consideration of their biogeography. *Can. J. Zool.* 75:102-109.
- Agnès, J. F., B., Adépo-Gourène, E. K., Abban & Y., Fermon. 1996. *Heredity*. 79:88-96.
- Andrade, F., H., Schneider, I., Farias, E., Feldberg & I., Sampaio. 2001. Análise filogenética de duas espécies simpátricas de Tucunaré (*Cichla*, Perciformes), com registro de hibridização em diferentes pontos da bacia Amazônica. *Revista virtual de iniciação acadêmica de UFPA*. 1(1):1-11.
- Barbosa, F. A., F., Villarroel, J. F., Guerra, G. P., Castro, P. M., Maia-Barbosa, R. M., Méndez, M. C., Faria & J.A., Vianna. 1999 a. Water quality, zooplankton and macroinvertebrates of the rio Tahuamanu and the rio Nareuda. p. 27-34. *In: Chernoff, B. & P. W., Willink (eds.). A biological assessment of the aquatic ecosystems of the upper rio Orthon basin, Pando, Bolivia. Bulletin of Biological Assessment 15. Conservation International. Washington D.C.*
- Barbosa, F. A., F., Villarroel, J. F., Guerra, G. P., Castro, P. M., Maia-Barbosa, R. M., Méndez, M. C., Faria & J.A., Vianna. 1999 b. Summary of the physicochemical characteristic of the waters in the upper Tahuamanu and lower Nareuda/Middle Tahuamanu sub-basins during the Aqua Rap expedition to Pando, Bolivia in September 1996. p. 76-78. *In: Chernoff, B. & P. W., Willink (eds.). A biological assessment of the aquatic ecosystems of the upper rio Orthon basin, Pando, Bolivia. Bulletin of Biological Assessment 15. Conservation International. Washington D.C.*
- Belkhir, K., P., Borsa, L., Chikhi, N., Raufaste & F., Bonhomme. 1996-2002. Genetix 4.04, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier, France.

- Berrebi, P. & D., Valiushok. 1998. Genetic divergence among morphotypes of lake Tana (Ethiopia) barbs. *Biological Journal of the Linnean Society*. 64:369-384.
- Bierne, N., S. A. Lehnert, E. Bédier, F., Bonhomme & S.S., Moore. 2000. Intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR. *Molecular Ecology*. 9:233-235.
- Carvajal, F. M. 2002. Variación en la ictiocenosis lacustre por el intercambio río-laguna en la várzea del río Ichilo (Cochabamba, Bolivia). Tesis de grado para obtener el diploma académico de Licenciado en Biología. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias y Tecnología, Carrera de Biología. Cochabamba, Bolivia. p. 21.
- Carvalho, G. R. 1993. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology*. 43:53-73.
- Chakrabarty, P. 2004. Cichlid biogeography: comment and review. *Fish and fisheries*. 5:97-119.
- Chow, S. & H., Takeyama. 1998. Intron length variation observed in the creatine kinase and ribosomal genes of the swordfish *Xiphias gladius*. *Fisheries Sciences*. 64(3):397-492.
- Chow, S. & K., Hazama. 1998. Universal PCR primer for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology*. 7:1247-1263.
- Couldridge, V. C. K. & G. J., Alexander. 2002. Color patterns and species recognition in four closely related species of lake Malawi cichlid. *Behavioral Ecology*. 13(1):59-64.
- Daguin, C. 2000. Phylogéographie des moules du complexe d'espèces *Mytilus edulis*. These pour obtenir le grade de Docteur de L'université Montpellier II. Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc. U. F. R. Sciences. Montpellier, France.
- Danley, P. D. & Kocher, T. D. 2001. Speciation in rapidly diverging systems: lessons from lake Malawi. *Molecular Ecology*. 10:1075-1086.
- Darlington, P. L. 1957. *Zoogeography: the geographical distribution of animals*. Museum of Comparative Zoology, Harvard University. p.39-125.

- Dominey, W. J. 1984. Effects of sexual selection and life history on speciation: species flocks in African cichlids and Hawaiian *Drosophila*. p. 231-249. In: Echele, A. A. & Kornfield, I. (Eds.), Evolution of fishes species flocks. University of Maine at Orono press.
- Eigenmann, C. H. 1909. The fresh water fishes of Patagonian and an examination of the Archiplata-Archhelenis theory. Rep. Princeton U. Exp. Patagonia, 1896-1899, 3, part 3. p. 225-374.
- Eigenmann, C. H. & W. R., Allen. 1942. Fishes of western South America. Lexington, Kentucky, University of Kentucky.
- Farias, I. P., G., Ortí & A., Meyer. 2000. Total evidence: Molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlid fishes. *Journal of experimental zoology*. 288:76-92.
- Farias, I. P., G., Ortí, I., Sampaio, H., Schneider & A., Meyer. 1999. Mitochondrial phylogeny of the family Cichlidae: monophyly and fast molecular evolution of the Neotropical assemblage. *Journal of Molecular Evolution*. 48:703-711.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5 c. Seattle: University of Washington.
- Fowler, H. W. 1940. Zoological results of the second Bolivian expedition for the Academy of Natural sciences of Philadelphia 1936-1937. Part I. Proc. Acad. Nat. Sci. Phila. 92(120):43-103.
- Futuyma, D. 1986. Evolutionary biology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. p. 223-231.
- Galis, F. & J. A. T., Metz. 1998. Why are there so many Cichlids species?. *TREE*. 13(1):1-2.
- Gardner, E. 1980. Principios de genética. Limusa, México. p. 561-584.
- Geisler, R. & J., Schneider. 1976. The element matrix of Amazon waters and its relationships with the mineral content of fishes (determination using neutron activation analysis). *Amazoniana*. 6(1):47-65.
- Goulgind, M., M. L., Carvalho & F. G., Ferreira. 1988. Río Negro: rich life in poor water. SPB Academic Publishing, The Hague.
- Greenwood, P. H. 1974. The cichlid fishes of lake Victoria, East Africa: the biology and evolution of a species flock. *Bull. Br. Mus. nat. Hist. Zool. Suppl.* 6:1-134.

- Greenwood, P. H. 1991. Speciation. p. 86-103. *In*: M. H A., Keenleyside. Cichlid fishes, behaviour, ecology and evolution. Chapman & Hall. Cambridge, Great Britain.
- Haffer, J. 1982. General aspects of the Refuge Theory. p. 6-24. *In*: Prance, G. T. (Ed), Biological diversification in the Tropics. Columbia University Press. New York, United States of America.
- Hansen, M. M. & Mensberg, K. L. D. 1997. Genetic differentiation and relationship between genetic and geographical distance in Danish sea trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Heredity*. 81:493-504.
- Hare, M. P., F., Cipriano & S. R., Palumbi. 2002. Genetic evidence on the demography of speciation in allopatric dolphin species. *Evolution*. 56(4):804-816.
- Hartl, D. L. 1994. Génétique des populations. Flammarion. Paris, France. p. 5-66.
- Haskins, C. P., E. F., Haskins, J. J. A., McLaughlin & R. E., Hewitt. 1961. Polymorphism and population structure in *Lebistes reticulatus*, a population study. p. 320-395. *In*: Blair, W. F. (Ed). Vertebrate Speciation. University of Texas. Austin.
- Hassan, M., C., Lemaire, C., Fauvelot & F., Bonhomme. 2002. Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. *Molecular Ecology*. 2:334-340.
- Hassan, M., C., Lemaire, C., Fauvelot & F., Bonhomme. 2002. Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. *Molecular Ecology*. 2:334-340.
- Henderson, P. A. & W. G. R., Crampton. 1997. A comparison of fish diversity and abundance between nutrient-rich and nutrient-poor lakes in the upper Amazon. *Journal of Tropical Ecology*. 13:175-198.
- Hoeinghaus, D. J., C. A., Layman, D. A., Arrington & K. O., Winemiller. 2003. Movement of *Cichla* (Cichlidae) in a Venezuelan floodplain river. *Neotropical Ichthyology*. 1(2):121-126.
- Ibañez, C. 2002. Structure génétique et écologie des populations de *Cichla monoculus* (Téléostéen, Cichlidés) en Amazonie Bolivienne. Diplôme d'études approfondies (DEA), Biologie de L'évolution et Ecologie. Université Montpellier II sciences et techniques du languedoc, Ecole nationale supérieure agronomique. Montpellier, France.

- Jepsen D. B., K. O., Winemiller, D. C., Taphorn & D. R., Olarte. 1999. Age structure and growth of peacock cichlids from rivers and reservoirs of Venezuela. *Journal of Fish Biology*. 55:433-450.
- Jepsen, D. B., K. O., Winemiller & D. C., Taphorn. 1997. Temporal patterns of resource partitioning among *Cichla* species in a Venezuelan blackwater river. *Journal of Fish Biology*. 51:1085-1108.
- Junk, W. J. 1997. Structure and function of the large Central Amazonian river floodplains: synthesis and discussion. p. 455-472. *In*: Junk, W. J. (Ed.), *The Central Amazon Floodplain*. Springer. Berlin, Germany.
- Junk, W. J., Soares, M. G. M. & U., Saint-Paul. 1997. The Fish. p. 385-408. *In*: W. J., Junk (Ed.), *The central Amazon floodplain, Ecology of a pulsing system*. Springer. Germany.
- Keith, P., P. Y., Le Bail & P., Planquette. 2000. Atlas des Poissons d'eau douce de Guyane. Publications scientifiques de M.N.H.N, Service du Patrimoine Naturel, Paris. p. 162-167.
- Killeen, T. 1998. Geomorfología de la meseta de Huanchaca y sus alrededores. p. 52-54. *In*: Killeen, T. & S., Schulenberg (eds.). *A biological assessment of Paque Nacional Noel Kempff Mercado, Bolivia*. RAP Working Papers10. Conservation International. Washington D.C.
- Knight, M. E & G. F., Turner. 1999. Reproductive isolation among closely related lake Malawi cichlids: can models recognize conspecific females by visual cues?. *Animal Behaviour*. 58:761-768.
- Kornfield, I. L. 1978. Evidence for rapid speciation in African cichlid fishes. *Experientia*. 34:355-336.
- Kornfield, I. L. & Koehn, R. 1975. Genetic variation and speciation in New World cichlids. *Evolution*. 29:427-437.
- Kornfield, I. L. & P. F., Smith. 2000. African cichlid fishes: Model system for evolutionary biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31:163-196
- Kullader, S. O. 2003. Family Cichlidae (Cichlids). p. 605-654. *In*: Reis, R., S. O., Kullander & C. J., Ferraris Jr. (eds.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS. Porto Alegre, Brazil.

- Kullander, S. O. 1986. Cichlid fishes of the Amazon river drainage of Peru. Swedish Museum of Natural History. Stockholm, Sweden. p. 56.
- Kullander, S. O. & H., Nijssen. 1989. The cichlids of Surinam. E. J. Brill. Leiden, Netherlands. p. 7-23.
- Kullander, S. O. 1998. A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). p. 462. *In*: Malabarba, L. R., R. E., Reis, R. P., Vari, Z. M. S., Lucena & C. A. S., Lucena (ed.), Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS. Porto Alegre, Brasil.
- Lauzanne, L. & G., Loubens. 1985. Peces del río Mamoré. ORSTOM. Paris, Francia. p. 39.
- Lauzanne, L., G., Loubens & B., Le Guenec. 1991. Liste commentée des poissons de l'Amazonie Bolivienne. Rev. Hydrobiol. Trop. 24(1):61-76.
- Lessa, E. P. 1992. Rapid surveying of DNA sequence variation in Natural populations. Molecular Biology and Evolution. 9(2):323-330.
- Lewis, D. S. 1982. A review of the genus *Labidochromis* (Teleostei: Cichlidae) from lake Malawi. Zool. J. Linn. Soc. 75:189-265.
- Lincoln, R., G., Boxshall & P., Clark. 1998. A dictionary of ecology, evolution and systematic. Cambridge University Press. Cambridge, UK. p. 291.
- Losey, G. S., T. W., Cronin, T. H., Goldsmith, D., Hyde, N.J., Marshall, et al. 1998. The UV visual world of fishes: a review. Journal of Fish Biology. 54:921-943.
- Lovejoy, N. R., & L. G., de Araújo. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. Molecular Ecology. 9:259-268.
- Lowe-McConnell, R. H. 1969. The cichlid fishes of Guyana, South America, with notes on their ecology and breeding behaviour. Zool. J. Linn. Soc. 48:255-302.
- Lundberg, J. G. 1998. The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. p. 49-68. *In*: Malabarba, L. R., R. E., Reis, R. P., Vari, Z. M. S., Lucena & C. A. S., Lucena (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs. Porto Alegre, Brasil.

- Machado-Allison, A. 1971. Contribución al conocimiento de la taxonomía del género *Cichla* (Perciformes, Cichlidae) en Venezuela, Parte I. *Acta Biologica Venezuelana*. 7:459-497.
- Maldonado, M. 1996. Caracterización limnológica de lagunas en la llanura aluvial del río Ichilo de Cochabamba (Bolivia). *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental*. 1:29-30.
- Mallet, J. 1995. A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology and Evolution*. 10:294-299.
- Marsh, A. C. 1983. A taxonomic study of the fishes genus *Petrotilapia* (Pisces: Cichlidae) from lake Malawi. *Ichthyol. Bull. J. L. B. Smith. Inst. Ichthyol.* 48:1-14.
- Maynard, J. 1999. *Evolutionary genetics*. Oxford University Press. United States. p. 267-273.
- Mayr, E. 2001. Wu's genic view of speciation. *J. Evol. Biol.* 14:866-867.
- McElroy, D. M. & I., Kornfield. 1990. Sexual selection, reproductive behaviour, and speciation in the mbuna species flock of Lake Malawi (Pisces: Cichlidae). *Environmental Biology of Fishes*. 28:273-284.
- McKaye, K R. 1991. Sexual selection and the evolution of the cichlid fishes of Lake Malawi, Africa. p. 241-257. *In: Keenleyside, M. (Ed.). Cichlid Fishes: Behaviour, ecology and evolution*. Chapman & Hall. London.
- Montoya, R. P., P. I., Gomez, M. A., Gonzalez, M., Henriquez & A., Candia. 1996. Amplificación de genes por PCR y su aplicación al estudio de la biodiversidad. *Bol. Soc. Biol.* 67:43-51.
- Muñoz, H. 2002. Ecología y aprovechamiento del Tucunaré (*Cichla monoculus*) en el río Paraguá, Sta. Cruz-Bolivia. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. p 44.
- Nagelkerke, L. A. J., F. A., Sibbing & J. W. M., Osse. 1995. Morphological divergence during growth in the large barbs (*Barbus* spp.) of Lake Tana. *Netherlands Journal of Zoology*. 45(3-4):431-454.
- Navarro, G. & M., Maldonado. 2002. Geografía ecológica de Bolivia, vegetación y ambientes acuáticos. Fundación Simón I. Patiño. p. 501-701.

- Ohresser, M., P., Barbosa & C., Delsert. 1997. Intron-length polymorphism at the actin gene locus *mac-1*: a genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L.
- Page, R. D. M. 1996. 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.
- Palumbi, S. R. 1995. Nucleic Acides II: The polymerase chain reaction. p. 205-247. *In*: Hillis, D. & C., Mortiz. Molecular Systematics 2da Ed. Sinauer, Sunderland, M. A.
- Palumbi, S. R. & C.S., Baker. 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Mol. Biol. Evol.* 11:426-435.
- Paterson, H. E. H. 1980. A comment on mate recognition system. *Evolution.* 34:330-331.
- Paterson, H. E. H. 1985. The recognition concept of species. p. 21-29. *In*: Vrba, E. S. (ed). Species and speciation. Transvaal Museum Monograph. Transval Museum, Pretoria.
- Paterson, H. E. H. 1993. Animal species and sexual selection. p. 209-228. *In*: Lees, D. R. & D., Edmunds (Eds.). Evolutionary patterns and processes. Academic Press. London.
- Patton, J. L., & M. N. F., da Silva. 1998. Rivers, Refuges, and Ridges: The geography of speciation of Amazonian mammals. p. 202-216. Howard, N. J. & S. H., Berlocher (Eds). Endless Forms, species and speciation. Oxford University Press, New York, EEUU.
- Pearson, N. E. 1924. The fishes of the Eastern slope of the Andes. I. The fishes of the rio Beni basin, Bolivia, collected by the Mulford Expedition. Indiana University Studies, Bloomington. Vol. XI, p 83.
- Quatro, J., W. J., Jones & K. J., Oswald. 2001. PCR primers for an aldolase-B intron in acanthopterygian fishes. *BMC Evolutionary Biology.* 1:9.
- Renno, J. F., A., Machordom, A., Blanquer & P., Boursot. 1991. Polymorphism of mitochondrial genes in populations of *Leporinus friderici* (Bloch, 1794):

- intraspecific structure and zoogeography of the Neotropical fish. *Genetica*. 84:137-142.
- Reynolds, J., B. S., Weir, C. C., Cockerham. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767-779.
- Ribbink, A. J. 1986. The species concept, sibling species and speciation. p. 109-116. *In*: Crapon de Crapona, M. D. & F., Fritsch (Eds.), Proceedings of the 3rd Europ workshop on cichlid biology. Bielefeld, West Germany.
- Ribbink, A. J., B. A., Marsh, A. C., Marsh, A. C., Ribbink & B. J., Sharp. 1983. A preliminary survey of the cichlid fishes of rocky habitats in lake Malawi. *S. Afr. J. Zool.* 18:149-310.
- Roman, B. 1985. Peces de agua dulce de Venezuela. *Biosfera*. Caracas, Venezuela. p. 19-24.
- Rundle, H. D., L., Nagel, J., Wenrick & D., Schluter. 2000. Natural selection and parallel speciation in sympatric sticklebacks. *Science*. 287:306-308.
- Saint-Paul, U., J., Zuanon, M. A., Villacorta, M., Garcia & N. N., Fabre. 2000. Fish communities in central Amazonian white- and blackwater floodplains. *Enviromental Biology of Fishes*. 57:235-250.
- Sarmiento, J., B., Chernoff, S., Barrera, A., Machado-Allison, N., Menezes & H., Ortega. 1999. Fishes collected during the AquaRap expedition to Pando, Bolivia in September 1996. p. 87-95. *In*: Chernoff, B. & P. W., Willink (eds). A biological assesment of the aquatic ecosystem of the upper rio Orthon basin, Pando, Bolivia. RAP Working papers No. 15, Conservation International, Washington, D.C.
- Schliwewen, U., Tautz, D. & S., Paabo. 1994. Sympatric speciation suggested by monophyly of crater lake cichlids. *Nature*. 368:629-632.
- Schulter, D. 1998. Ecological causes of speciation. p.114-129. *In*: Howard, D. J. (Ed.). *Endless forms: Species and Speciation*. New York, Oxford University Press.
- Seehausen, O. & J. J. M., van Alphen. 1998. The effect of male coloration on female mate choice in closely related lake Victoria cichlids (*Haplichromis nyererei* complex). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42:1-8.

- Seehausen, O. & J. J. M., van Alphen. 1999. Can sympatric speciation by disruptive sexual selection explain rapid evolution of cichlid diversity in lake Victoria?. *Ecology Letters*. 2:262-271.
- Seehausen, O., J. J. M., van Alphen & F., Witte. 1997. Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science*. 277:1808-1811.
- Sioli, H. 1968. Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region. *Amazoniana*. 1(3):267-277.
- Sioli, H. 1975. Amazon tributaries and drainage basins. p. 199-213. *In*: Hasler, A. D. (ed.). *Coupling of Land and Water Systems*. Springer Verlag, New York.
- Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river course, and river types. p. 127-165. *In*: Sioli, H. (ed). *The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. *Monographiae Biologicae* 56. The Netherlands.
- Slade, R. W., C., Mortinz & A., Heideman. 1994. A multiple nuclear-gene phylogenies: Application to pinnipeds and comparison with a mitochondrial DNA gene phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* 11:341-356.
- Slatkin, M. & W. P., Madisson. 1990. Detectin isolation by distance using phylogenies of genes. *Genetics*. 126:249-260.
- Solignac, M., G., Periquet, D., Anxolabéhère & C., Petit. 1995. Génétique et evolution, la variation, les genes dans les populations. Hermann. Paris, France. p. 105-137.
- Stiassny, M. & A., Meyer. 1999. La naissance des especes. *Pour la Science*. 258:70-75.
- Stiassny, M. L. J. 1991. Phylogenetic intrarelationships of the family Cichlidae: an overview. p. 1-35. *In*: Keenleyside, M. H. A. (Ed), *Cichlid fishes behaviour, ecology and evolution*. Chapman & Hall. Cambridge, Great Britain.
- Sturmbauer, C. 1998. Explosive speciation in cichlid fishes of the African great lakes: a dynamic model of adaptative radiation. *Journal of Fish Biology*. 53(Supplement A):18-36.
- Taphorn, D. & A., Barbarino Duque. 1993. Evaluación de la situación actual de los pavones (*Cichla* spp.), en el parque nacional Capanaparo-Cinaruco, Estado de Apure, Venezuela. *Natura*. 96. 10-25.

- Torrice, J. P. 2004. Filogeografía comparada de siete especies de peces de agua dulce del Alto Madera (amazonía boliviana). Tesis de grado para optar el título de Magister Scientiarum. Facultad de Ciencias Puras y Naturales. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 132 p.
- Turner, G. F. 1994. Speciation mechanisms in lake Malawi cichlids: a critical review. *Arch. Hydrobiol. Beih. Limnol.* 44:139-160.
- Turner, G. F. 1996. *Offshore Cichlids of lake Malawi.* Cichlid Press. England.
- Turner, G. F. 2000. What is a fish species?. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 9:281-297. p. 209-235.
- Turner, G. F. & M. T., Burrows. 1995. A model of sympatric speciation by sexual selection. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 260:287-292.
- Van Damme, P. 2001. Plan de manejo de los recursos pesqueros del río Paraguá (Bajo Paraguá) 2001-2003. Fundación Amigos de la Naturaleza. Santa Cruz, Bolivia. 96 p.
- Vari, R. 1988. The Curimatidae, a lowland neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. p. 343-377. *In: Vanzolini, D. E. & W.R., Heyer (Eds.). Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns, 1987.* Academia Brasileira de Ciencias, Río de Janeiro.
- Weaver, R. F. & P. W., Hedrick. 1997. *Genetics.* WCB. United States of America. p. 532-556.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Weitzman, S. H. & M., Weitzman. 1982. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. p. 403-422. *In: Prance, G. T. (Ed), Biological diversification in the tropics.* Columbia University Press. New York, EEUU.
- Wenrick, J. 2001. Divergent sexual selection enhances reproductive isolation in sticklebacks. *Nature.* 411:944-948.

- Willams, J. D. & K. O., Winemiller. 1998. Ecology and status of piscivores in Guri, an Oligotrophic tropical reservoir. *North American Journal of Fisheries Management*. 18:274-285.
- Willink, P. W., J., Sarmiento & B., Chernoff. 1999. Comparative list of fishes reported from the Bolivian Amazon. p. 96-113. *In: Chernoff, B & P. W., Willink (ed). A Biological assessment of the aquatic ecosystems of the upper río Orthon basin, Pando, Bolivia. Appendix 7. Bulletin of Biological Assessment 15. Conservation International, Washington, DC.*
- Wilson, A. B., K., Noack-Kunmann & A., Meyer. 2000. Incipient speciation in sympatric Nicaraguan crater lake cichlid fishes: sexual selection versus ecological diversification. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 267:2133-2141.
- Winberger, P. H., R. E., Reis & K. V., Thorton. 1998. Mitochondrial phylogenetics, biogeography and evolution of parental care and matting systems in *Gymnogeophagus* (Perciformes, Cichlidae). p. 510. *In: Malabarba, L. R., R. E., Reis, R. P., Vari, Z. M. S., Lucena & C. A. S., Lucena (ed.), Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS. Porto Alegre, Brasil.*
- Winemiller, K. O. 2001. Ecology of peacock cichlids (*Cichla* spp.) in Venezuela. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences. Cichlid Research: State of the Art*. 9:93-112.
- Winemiller, K. O., D. C., Taphorn & A., Barbarino Duque. 1997. Ecology of *Cichla* (Cichlidae) in two blackwater rivers of Southern Venezuela. *Copeia*. 4, 690-696.
- Working group. 1994. Rates and modes of speciation. p. 505-508. *In: Martens, K., B., Goddeeris & G., Coulter (Eds.), Speciation in ancient lakes. Stuttgart. Germany.*
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. 16:97-159.
- Wright, S. 1969. Evolution and the genetics of populations. Vol. 2. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago.
- Zaret, T. M. & R. T., Paine. 1973. Species introduction in a tropical lake. *Science*. 182:449-455.