

EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA ARAHUANA *Osteoglossum bicirrhosum* (CUVIER, 1829) EN LA REGIÓN LORETO (AMAZONÍA PERUANA) MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

Werner Chota-Macuyama^{1,2}, Carmen García-Dávila^{1,2}, Fabrice Duponchelle^{1,3}, Diana Castro-Ruiz^{1,2}, Fred Chu^{1,4}, Jesus Nuñez^{1,3}, Jean-François Renno^{1,2}

1 Laboratorio Mixto Internacional – Evolución y Domesticación de la Ictiofauna Amazónica (LMI-EDIA)

2 Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM), Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Carretera Iquitos Nauta km 4.5, Iquitos, Perú. E-mail: wernerchotam@yahoo.com

3 Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR-ISEM (Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier), Université Montpellier 2, France

4 Programa de Investigación Para el Uso del Agua y sus Recursos (AQUAREC), Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Carretera Iquitos Nauta km 4.5, Iquitos, Perú.

INTRODUCCIÓN

La riqueza íctica de la cuenca amazónica hace que sea considerada entre las mayores proveedoras de peces ornamentales de agua dulce del mundo (Moreau & Coomes, 2007). El 70% del volumen de exportación sudamericana es cubierto por solamente 10 especies (Ortiz & Iannaccone, 2009), una de las cuales es la arahuana *Osteoglossum bicirrhosum* (Cuvier, 1829). En los últimos años la demanda de alevinos de *O. bicirrhosum* se incrementó debido a que esta siendo comercializado como sustituto de *Scleropages formosus* en los mercados de peces ornamentales asiáticos (Moreau & Coomes, 2006). Ambas especies comparten características de su historia de vida que las hacen vulnerables a la sobreexplotación: madurez tardía, baja fecundidad y cuidado parental bucal paterno. En la Amazonía peruana, el sacrificio de machos adultos, sumado a un limitado monitoreo y deficiente control de su comercialización, ponen en peligro las poblaciones naturales de esta especie (Moreau & Coomes, 2006; De Jesus Da Silva et al., 2009). El efecto del comercio ornamental sobre las especies del género *Osteoglossum* puede ser visto en la Amazonía colombiana donde *O. bicirrhosum* y *O. ferreirai* aparecen incluidos en el libro rojo de ese país, como especie en vulnerabilidad y en peligro de extinción, respectivamente (Argumedo, 2005). *O. bicirrhosum* ha sido poco estudiado en la Amazonía peruana, desconociéndose muchos aspectos de los rasgos de vida y diversidad genética de sus poblaciones; aspectos esenciales para desarrollar programas de manejo para la especie (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de la especie analizando en forma preliminar la variabilidad genética de *O. bicirrhosum* en los principales tributarios de la Amazonía peruana.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron 299 individuos de arahuana procedentes de cinco localidades: Lago Rimachi (Río Pastaza), Lago El Dorado (Río Yanayacu-Pucate), Huicungo (Río Tapiche),

El Estrecho y Huapapa (Río Putumayo). La extracción de DNA fue realizada mediante el protocolo CTAB modificado de Doyle & Doyle (1987). Los 10 loci microsatélites analizados fueron tomados de De Jesus Da Silva et al. (2009). Las amplificaciones fueron realizadas en volúmenes totales de 10 μl , conteniendo: 1X Buffer; 1,5 mM MgCl₂; 200 μM de cada dNTP; 0,3 μM de cada primer; 0,4 U de Taq polimerasa y de 20 a 70 ng de DNA genómico. Las condiciones de temperatura fueron: 94 °C x 1 min de denaturación inicial, seguido de 30 ciclos consistentes en: denaturación a 94 °C x 20 s, hibridación a 60 °C x 20 s, y extensión a 72 °C x 20 s; seguidos de una extensión final de 72 °C x 30 min. La lectura de los microsatélites, fue realizada en un Analizador Genético Applied Biosystems 3130xl siguiendo la metodología del fabricante y los pesos de los alelos fueron determinados con el programa Peak Scanner versión 1.0.

Con la ayuda del programa Genetix versión 4.05.2 fueron estimados para cada locus en cada localidad el número de alelos (A), la heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e); y entre pares de poblaciones, la diferencia a la panmixia (F_{is}), el índice de fijación FST (Weir & Cockerham, 1984) y la Distancia Genética de Nei (1978). Las relaciones entre las poblaciones fueron estimadas con ayuda del software PHYLIP versión 3.5 (Felsenstein, 1993). El dendrograma (Agrupamiento Vecino Próximo) fue visualizado en el software TREEVIEW (Page, 1996). La correlación entre la distancia genética y las distancias geográficas lineal y fluvial fueron estimadas a través del coeficiente de regresión de Pearson. Los resultados fueron verificados con la prueba de Mantel (Mantel, 1967) mediante el programa Genetix versión 4.05.2.

RESULTADOS

Diferenciación genética y relaciones interpoblacionales en Osteoglossum bicirrhosum: Un total de 46 alelos fueron observados con los 10 loci microsatélites en los 299 individuos de *O. bicirrhosum*. Los resultados del índice de fijación-FST, la distancia genética de Nei 1978 (Tabla 1), así como el dendrograma obtenido (con valores de Bootstrap elevados, obtenidos con 1000 réplicas) muestran una fuerte estructuración entre poblaciones analizadas (Figura 1). Esta estructuración es concordante con las cuencas geográficas de procedencia de los individuos analizados (poblaciones geográficas = poblaciones genéticas), mostrando que las localidades más relacionadas fueron Hincungo y El Dorado (FST: 0,05; Nei: 0,026; Bootstrap = 73), seguido de las poblaciones del Estrecho y Huapapa (FST: 0,07; Nei: 0,032; Bootstrap = 73), En tanto que estas cuatro poblaciones se encuentran separadas de la población del lago Rimachi (Bootstrap = 91).

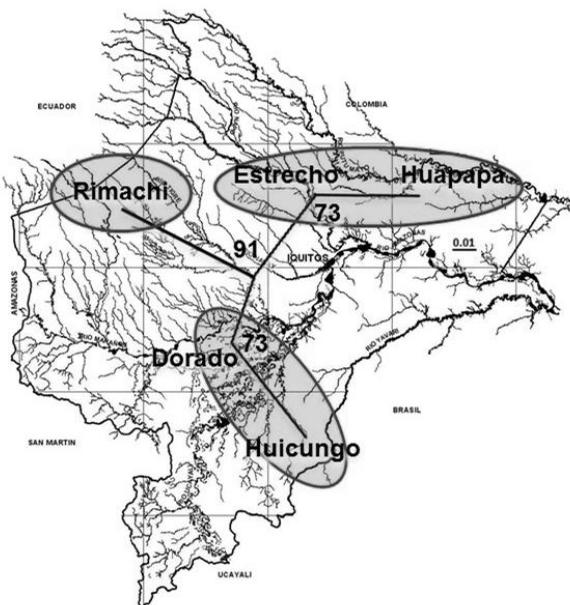


Figura 1. Dendrograma (insertado dentro del mapa de Loreto) construido a partir de las Distancias de Nei (1978) según el criterio de agrupamiento Vecino Próximo para cinco poblaciones naturales de la arahuana *Osteoglossum bicirrhosum* en la región Loreto.

Tabla 1. Índices de fijación (FST) en el diagonal superior y distancia genética de Nei 1978 en el diagonal inferior, estimados a partir de diez loci microsatélites para cinco poblaciones de arahuana *Osteoglossum bicirrhosum* en la región Loreto. Significancia: *** p<0.001

| Poblaciones | Huicungo | El Dorado | Rimachi | Estrecho | Huapapa |
|-------------|----------|-----------|---------|----------|---------|
| Huicungo | - | 0,05*** | 0,22*** | 0,18*** | 0,22*** |
| El Dorado | 0,026 | - | 0,15*** | 0,07*** | 0,14*** |
| Rimachi | 0,100 | 0,066 | - | 0,17*** | 0,28*** |
| El Estrecho | 0,107 | 0,039 | 0,069 | - | 0,07*** |
| Huapapa | 0,120 | 0,073 | 0,124 | 0,032 | - |

Aislamiento por distancia: Los valores de la distancia genética de Rousset variaron entre 0,050 (Huicungo-El Dorado) y 0,394 (Huapapa-Rimachi). Se encontró una mayor correlación ($r = 0,83$) entre la distancia genética (FST / 1-FST. Rousset, 1997) con la distancia geográfica lineal (Figura 2B) y una menor correlación ($r = 0,50$) con la distancia geográfica fluvial entre las cinco poblaciones de *O. bicirrhosum* estudiadas (Figura 2A).

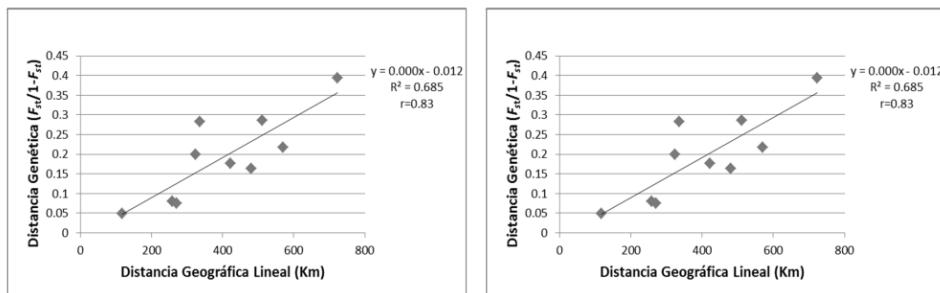


Figura 2. Representación gráfica del análisis de correlación entre la Distancia Genética ($FST/1-FST$) y Distancia Geográfica (Km) Fluvial (A) y Lineal (B) obtenidos para cinco poblaciones de la arahuana *Osteoglossum bicirrhosum* en la región Loreto.

DISCUSIÓN

La variación genética es la que permite a las especies adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales y responder a programas de selección. Las poblaciones de la mayoría de especies, muestran algún nivel de estructuración genética, que puede ser debido a una variedad de eventos que pueden ocurrir al mismo tiempo (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Barreras medioambientales, procesos históricos e historias de vida pueden todos, en alguna magnitud, formar la estructura genética de las poblaciones (Gerlach & Musolf, 2000; Palsson, 2000; Tiedemann et al., 2000).

Pouyaud et al. (2003) confirmaron la estructuración y diferenciación genética entre variedades de color en *Scleropages formosus*, a partir de secuencias nucleotídicas (Citocromo b) y de datos morfológicos, ecológicos y geográficos. Describiendo tres especies nuevas (*S. macrocephalus*, *S. aureus* y *S. legendrei*) dentro de la especie inicialmente descrita. Demostrando además que existe cierta concordancia entre los datos genéticos y los parámetros ecológicos (pH y color de agua) entre algunas especies de Arahuana asiática. Tang et al. (2004) también mostraron una clara división genética entre variedades de color de arahuana asiática (Fst : 0,243 a 0,473) mediante marcadores microsatélites.

Saint-Paul et al. (2000) y Cala (1973), mencionan que las dos arahuanas sudamericanas, *O. bicirrhosum* y *O. ferreirai* (restricto a la cuenca del río Negro) tienen una distribución alopátrica, asociada al tipo de agua. *O. bicirrhosum* habita en aguas neutras a ligeramente alcalinas, mientras *O. ferreirai* en aguas negras altamente ácidas. Reportes de desembarque pesquero y consulta con pescadores (comunicación personal) contribuyen a esta afirmación mostrando que *O. bicirrhosum* no se distribuye en las ácidas aguas del río Nanay (pH: 4,7. Informe Técnico IRD-SENAMHI, 2002; Echenique et al., 2004). Parámetros ecológicos jugando el papel de barreras o de preferendum podrían estar influenciando en la estructuración de *O. bicirrhosum* en la Amazonía peruana, debido a que la especie se distribuye en una amplia extensión territorial habitando muchas veces cuerpos con parámetros físico-químicos diferentes. Por ejemplo la gran diferencia observada entre la población del Rimachi (Pastaza) con las de Huapapa y El Estrecho (ambas del Putumayo), podrían ser una respuesta a diferencias ecológicas entre sus habitats. Futuros estudios complementares podrían profundizar este tema.

Además, la arahuana es un pez sedentario (Pereira, 2007) y sólo realiza migraciones en las crecientes para su alimentación utilizando su capacidad de saltar fuera del agua (Saint-Paul et al., 2000). Nuestros datos dicen que existe correlación entre la distancia genética y la geográfica, mostrándose que las poblaciones genéticas están aisladas por la distancia en línea recta, supuestamente en relación con una dispersión de los peces por la llanura de inundación (poblaciones cercanas). Estudios recientes muestran también que rasgos de vida como la fecundidad, periodo de reproducción y crecimiento son variables entre poblaciones geográficas de *O. bicirrhosum* (Waty, 2009; Ruiz, 2011).

REFERENCIAS

- Argumedo, E. G. 2005. Arawanas, manual para la cría comercial en cautiverio. Asociación de Acuicultores del Caquetá (ACUICA). Caquetá, Colombia. 105pp.
- Balloux, F.; Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-165.
- Cala, P. 1973. Presencia de *Osteoglossum* em los Llanos (Orinoquia). *Acta Zoologica Colombiana*. 18, 8.
- De Jesus Da Silva, T. de J.; Hrbek, T.; Farias, I. P. 2009. Microsatellite markers for the silver arowana (*Osteoglossum bicirrhosum*, Osteoglossidae, Osteoglossiformes). *Molecular Ecology Resources* 9: 1019-1022.
- Doyle, J. J. ; Doyle J. L. 1987. A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.
- Echenique, R.O.; Núñez-Avellaneda, M.; Duque, S.R. Chlorococcales de la Amazonia colombiana I: Chlorellaceae y Scenedesmaceae. *Caldasia* 26(1) 2004: 37-51.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny inference pakage) versión 3.05 general information manual. University of Washintgton, Seattle, Washington. 132pp.
- Gerlach, G.; Musolf, K. F. 2000. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation Biology* 14: 1066-1074.
- IRD-SENAMHI. 2002. Informe Técnico: "2da. Comisión de aforos, muestreo de agua y sedimentos - Cuencas de los Ríos Amazonas, Nanay, Marañón, Napo, Ucayali".
- Mantel, N. (1967). "The detection of disease clustering and a generalized regression approach". *Cancer Research* 27 (2): 209–220.
- Moreau, M. A.; Coomes, O. T. 2006. Potential threat of the international aquarium trade to silver arawana (*Osteoglossum bicirrhosum*) in the Peruvian Amazon. *Oryx* 40: 1–9.
- Moreau, M. A.; Coomes, O. T. 2007. Aquarium fish exploitation in western Amazonia: conservation issues in Peru. *Environmental Conservation*, 34(1): 12-22.

Ortiz, N.; Iannacone, J. 2008. Estado actual de los peces ornamentales amazónicos del Perú que presentan mayor demanda de exportación. *Biologist (Lima)*. Vol. 6, Nº 1: 54-67.

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.

Palsson, S. 2000. Microsatellite variation in *Daphnia pulex* from both sides of the Baltic Sea. *Molecular Ecology* 9: 1075-108

Pereira, H. 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas a aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de producao. *Rev Bras Reprod Anim*, Vol. 31, Nº 3: 351-360.

Pouyaud, L.; Sudarto; Teugels, G. G. 2003. The different colour varieties of the Asian arowana *Scleropages formosus* (Osteoglossidae) are distinct species: morphologic and genetic evidences. *Cybium*, 27(4): 287-305.

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.

Ruiz, A. C. 2011. Historia de vida de la "arahuana" *Osteoglossum bicirrhosum* (Cuvier, 1829) en tres cuencas de la Amazonía peruana. Tesis para optar el grado académico de Magister en Zoología con mención Ecología y Conservación. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 63 pp.

Saint-Paul, U.; Zuanon, J.; Villacorta, M.; M. GARCIA, F. NOEMI. MARCH 2000. Fish communities in central Amazonian white- and blackwater floodplains. *Environmental Biology of Fishes*, 57(3): 235-250.

Tang, P. Y.; Sivananthan, J.; Pillay, S. O.; Muniandy, S. 2004. Genetic Structure and Biogeography of Asian Arowana (*Scleropages formosus*) Determined by Microsatellite and Mitochondrial DNA analysis. *Asian Fisheries Society*, 17 (2004): 81-92. Manila, Philippines.

Tang, P. Y.; Sivananthan, J.; Pillay, S. O.; Muniandy, S. 2004. Genetic Structure and Biogeography of Asian Arowana (*Scleropages formosus*) Determined by Microsatellite and Mitochondrial DNA analysis. *Asian Fisheries Society*, 17 (2004): 81-92. Manila, Philippines.

Tiedemann, R.; Hardy, O.; Vekemans, X.; Milinkovitch, M. C. 2000. Higher impact of female than male migration on population structure in large mammals. *Molecular Ecology* 9: 1159-1163.

Waty, A. 2009. Etude des traits d'histoire de vie de cinq populations d'Arahuana (*Osteoglossum bicirrhosum*) subissant des pressions de pêches contrastées en Amazonie péruvienne. Université Montpellier II. Maestria en Ecologie et Biodiversité, spécialité en

Biodiversité, Ecologie, Evolution. Montpellier. Francia. 10 p.

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