

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) Y *Pseudoplatystoma tigrinum* (Valenciennes, 1840), EN LA AMAZONÍA PERUANA

Javier Rodríguez-Bravo¹, Adriana Iglesias-Vásquez¹, Jean-François Renno², Fernando Alcántara³ y Carmen García-Dávila³

RESUMEN

La variabilidad genética de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. tigrinum* fue estimada en tres localidades de la Amazonía peruana mediante las técnicas “Exon - Primed Intron - Croosing” (EPIC) y “Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)”. Un total de 102 especímenes fueron analizados con tres sistemas intrónicos (Ck, RPEX y PmOPSI). El intrón PmOPSI es diagnóstico para diferenciar ambas especies. Los tres intrones fueron digeridos con enzimas de restricción para analizar la variabilidad de secuencia observando el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), índice de fijación ($F_{st} = 0.43$) y distancia genética ($D = 0.76$) entre ambas especies corroboraron la identidad genética de las mismas, sin híbridos naturales observado entre ellas. A nivel intraespecífico, los resultados encontrados por AFC, F_{st} y D mostraron en *P. fasciatum* como en *P. tigrinum* que la variabilidad genética observada no está relacionada con la ubicación geográfica de las poblaciones. Los resultados podrían ser explicados por el carácter migratorio y la distribución de estas especies en la cuenca Amazónica.

PALABRAS CLAVE: Variabilidad genética, *Pseudoplatystoma*, EPIC-RFLP, Amazonía peruana.

GENETIC VARIABILITY OF *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) AND *Pseudoplatystoma tigrinum* (Valenciennes, 1840), IN THE PERUVIAN AMAZON

ABSTRACT

The genetic variability of *Pseudoplatystoma fasciatum* and *P. tigrinum* was estimated in three localities of the Peruvian Amazon through the techniques “Exon - Primed Intron - Croosing” (EPIC) and “Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)”. A total of 102 specimens were analyzed with three intronic systems (Ck, RPEX and PmOPSI). PmOPSI intron was diagnostic in order to distinguish both species. The three introns were digested with restricted enzymes to analyze the sequence variability observing the restriction fragment length polymorphism (RFLP). The results of the Factorial Correspondence Analysis (FCA), index fixation ($F_{st} = 0.43$) and genetic distance ($D = 0.76$) between both species corroborated the genetic identity of them without observed natural hybrids between them. The results found at intraspecific by CFA, F_{st} and D showed in *P. fasciatum* as well as in *P. tigrinum* that the observed genetic variability is not in relationship with geographic location of the populations. The results would be explained with the migratory behaviour and the distribution of these species in the Amazon basin.

KEYWORDS: Genetic variability, *Pseudoplatystoma*, EPIC-RFLP, Peruvian amazon.

1 Estudiantes de Maestría del Convenio IIAP-IRD. Iquitos, Perú. jarbgen1@yahoo.es gemaiglesias11@yahoo.com

2 Institut de Recherche pour le Développement. Montpellier, France.

3 Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Apartado 784. Iquitos, Perú.

1. INTRODUCCIÓN

La Ictiofauna amazónica es una de las más ricas del planeta; albergando entre 2.500 - 3.000 especies (Goulding *et al.*, 1997). Su gran diversidad, ha hecho difícil para muchos taxónomos la identificación de especies. Hasta hace poco, en la familia Pimelodidae, tres especies, eran clasificadas dentro del género *Pseudoplatystoma*: *P. fasciatum* (cuencas de los ríos del escudo de las Guayanas, Magdalena, Orinoco, Amazonas y Paraná), *P. tigrinum* (cuencas del Orinoco y Amazonas) y *P. corruscans* (cuencas del San Francisco y Paraná). Los resultados de una reciente revisión taxonómica basada en análisis de caracteres morfológicos fue realizada por Buitrago-Suárez & Burr (2007), quienes indican que el género *Pseudoplatystoma* esta conformado por ocho especies agrupadas en un grupo monofilético dividido en dos clados. El primero conformado por *P. tigrinum* y *P. metaense* estaría restringido a las cuencas del Amazonas y Orinoco respectivamente; y el segundo grupo comprendido por seis especies *P. fasciatum* (cuencas del escudo de las Guayanas), *P. magdaleniatum* (cuena del Magdalena), *P. orinocoense* (cuena del Orinoco), *P. punctifer* (cuena del Amazonas), *P. reticulatum* (cuena del Paraná y Amazonas) y *P. corruscans* (cuena del San Francisco y Paraná). En base a esta revisión *P. fasciatum* sería considerado como *P. punctifer* (Castelnaud, 1855) y se encontraría en simpatria con *P. tigrinum*, (Valenciennes, 1840) en la Amazonía peruana. Sin embargo, Torrico, *et al.* (en prensa) demostró en base a datos moleculares que no existiría diferenciación genética entre *P. fasciatum* y *P. punctifer* rechazando el status taxonómico de *P. punctifer* como especie. Considerados dentro del grupo de "grandes bagres", *P. fasciatum* y *P. tigrinum* son especies que se caracterizan por su gran tamaño, valor alimenticio y comercial en la pesca fluvial de la Amazonía peruana, colombiana, boliviana y brasilera (Lauzanne & Loubens 1985; Barthem & Goulding, 1997; Agudelo *et al.*, 2000; Moncada & Ríos, 2002). En el Perú las estas dos especies presentan individuos con padrones de coloración intermedios, que deja suponer la existencia de híbridos naturales entre ellas.

Datos de desembarque pesquero indican, que en los años 2005 y 2006 *P. fasciatum* ocupó el primer y segundo lugar en los volúmenes de desembarque total dentro de los grandes bagres en la región Loreto (258.81 T en el 2005 y 222.41 T en el 2006), mientras que *P. tigrinum* ocupó el sexto y tercer lugar con 56.28 T en el 2005 y 90.48 T en el 2006 (García *et al.*, 2008, en prensa). Asimismo, los datos de captura reportados por Montreuil (2000) muestran que éstas especies vienen siendo extraídas con tallas inferiores a la talla de primera maduración sexual, es decir antes de realizar la primera desova. La sobrepesca y la

pesquería en tallas prohibidas estarían causando la disminución de las poblaciones naturales, con la consecuente erosión genética (Barthem *et al.*, 1995; en Cañas, 1998).

El conocimiento sobre la genética de poblaciones de peces en los principales sistemas fluviales de Sur América, es aún incipiente y las deficiencias en la información disponible limitan el análisis histórico y actual sobre la biogeografía de las especies (Sivasundar *et al.*, 2001), o la diferenciación de stocks con fines de manejo (Gallo & Díaz-Sarmiento, 2003). En el caso de *P. fasciatum* y *P. tigrinum*, varios marcadores moleculares, vienen siendo utilizados para la visualización de la variabilidad genética a nivel interespecífico, inter e intrapoblacional: (Coronel, 2001; Rivera, 2003; Torrico, 2004; Barreta, 2005).

La identificación genética a nivel específico de los peces es un pre-requisito necesario para el manejo de su pesca, su piscicultura y su bioconservación (Moritz, 1995; da Silva & Patton, 1998). Los factores de mayor contribución en la hibridación de especies de peces son: los disturbios antropogénicos relacionados a actividades de acuicultura, la introducción de especies y la pérdida o alteración de hábitats (Scribner *et al.*, 2001). El presente trabajo tuvo como objetivo estimar la variabilidad genética de *P. fasciatum* y *P. tigrinum* en la Amazonía peruana, a través de la combinación de las técnicas moleculares EPIC-RFLP; evaluando preliminarmente los límites genéticos entre estas especies y poblaciones morfológicas, con la posible existencia de híbridos interespecíficos. Asimismo, estudiando la filogeografía del género *Pseudoplatystoma* en el Perú que sirva de base para futuras investigaciones en relación con planes de manejo y conservación.

2. MATERIAL Y MÉTODO

MUESTREO

Se colectó durante el primer semestre del 2006 un total de 102 especímenes (17 individuos de *P. fasciatum* y 17 individuos de *P. tigrinum* por localidad), en las localidades de Iquitos, Pucallpa y Puerto Maldonado en la Amazonía peruana (Figura 1). De cada pez se colectó aproximadamente un cm³ de tejido muscular, el cual fue conservado en etanol al 96%, hasta el momento de la extracción.

ANÁLISIS DE LABORATORIO

La extracción de ADN se realizó de acuerdo al método CTAB de Doyle & Doyle (1987) a partir de 100mg de tejido muscular conservado en etanol al 96%. La verificación del ADN se realizó utilizando agarosa 0.8%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transluminador de luz UV.



Figura 1. Localización geográfica de los sitios de muestreo de doncella *P. fasciatum* y tigre zúngaro *P. tigrinum* en la Amazonía peruana.

En el presente estudio hemos utilizado una combinación de la técnica Exon - Primed Intron - Crossing (EPIC), consistiendo en la amplificación de regiones intrónicas de genes nucleares utilizando dos cebadores ubicados sobre los exones adyacentes (Palumbi, 1995; Bierne *et al.*, 2000; Hassan *et al.*, 2002; Carvajal, 2004); y la técnica "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP), herramienta para determinar y cuantificar altos niveles

de variación genética a nivel poblacional (Slade *et al.*, 1993; Palumbi & Baker, 1994; He & Haymer, 1997). Otros autores también lograron aumentar la cantidad de información de sus datos usando esta misma combinación de técnicas como por ejemplo en el estudio de la mosca de la fruta *Ceratitidis capitata*, (He & Haymer, 1999); los autores aumentaron la resolución informativa del intron Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, cortando con la enzima de restricción *Rsa*I y *Taq*[®]I, logrando diferenciar las relaciones de 26 poblaciones de estas moscas en varias localidades de infestación. Se utilizó los cebadores de tres intrones Ck, RPEX y PmOPSI (Tabla 1).

Las concentraciones finales de cada reactivo en el PCR fueron: 0.04 U/μl *Taq* polimerasa, 1X buffer, 0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 0.04μM de primers F y R, 28ng/μl DNA; la reacción fue completada a 25μl con agua ultrapura. Las condiciones de temperatura fueron: una desnaturalización inicial a 92 °C x 2 min., seguidos de 30 ciclos: desnaturalización a 95 °C x 1min, hibridación a 49.4/45.4/54.8 °C x 1min en RPEX, PmOPSI y Ck respectivamente, y extensión a 72 °C x 1min, seguido por 5min de extensión final a 72 °C. Los intrones amplificados fueron visualizados en agarosa 2% en un transluminador de luz UV. El tamaño de los productos de amplificación fue determinado mediante el uso del marcador de peso molecular ladder 100pb (100 a 1500pb).

Los intrones amplificados fueron cortados con 10 enzimas de restricción (*Hpy*CH4IV, *Hpy*188I, *Nci*I, *Hha*I, *Dra*I, *Rsa*I, *Hpa*II, *Taq*[®]I, *Bst*BI y *Tsp*509I) en un mix de 15μl [4μl de producto PCR, 1.5μl del tampón enzimático; 3U de la enzima; 0.15μl de BSA (100μg/μl) (dependiendo de la enzima), y lo restante, agua ultrapura] e incubados a 37 °C ó 65 °C (dependiendo de la enzima) por dos horas. Los cortes de las enzimas fueron verificados en agarosa 1.8%; teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transluminador de luz UV. El tamaño de los productos digeridos fue determinado mediante el uso del marcador de peso molecular ladder 100pb (100 a 1500pb).

Tabla 1. Número y secuencia de primers utilizados en el análisis por EPIC-PCR.

GEN	POSICIÓN DEL INTRON	PRIMER	FUENTE	SECUENCIA DEL PRIMER (5' → 3')
Creatin Kinasa	6	Ck 6F	Chow & Takeyama, 1998	GAC CAC CTC CGA GTC ATC TC CAG GTG CTC GTT CCA CAT GA
		Ck 6R		
S7 Ribosomal Protein (RP)	1	Rpex 1F	Chow & Takeyama, 1998	TGG CCT CTT CCT TGG CCG TC AAC TCG TCT GGC TTT TCG CC
		Rpex 2R		
Opsin	—	PMO PSI 1F	Bierne, 2000	TTC GGC ACG AGC AGC TCG C CAT GTC CTC AGG CAC TGT GTC C
		PMO PSI 1R		

INTERPRETACIÓN Y TRATAMIENTO DE DATOS

A partir de la combinación de los perfiles enzimáticos generados por cada uno de los tres intrones se estableció el genotipo para cada uno de los individuos. Estos genotipos fueron analizados con la ayuda del Software Genetix versión 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004), las diferencias genéticas fueron establecidas mediante el Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), a nivel intra e interespecífico. La estructura genética entre las poblaciones geográficas fue evaluada utilizando el estimador θ del F_{st} (Weir & Cockerham, 1984; Weir, 1990). Las relaciones genéticas entre las poblaciones de *P. fasciatum* y *P. tigrinum* fueron estimadas en base a las distancias genéticas de Rousset $D = F_{st} / (1 - F_{st})$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los tres intrones analizados (Ck, RPEX y PmOPSI), solamente PmOPSI fue informativo a nivel interespecífico, mostrando antes de la digestión por las enzimas de restricción, un polimorfismo de longitud con dos diferentes fragmentos de ADN

totalmente diagnósticos (diferenciales) de las especies, de aproximadamente 330pb para *P. fasciatum* y 380pb para *P. tigrinum* (Figura 2). Barreta, (2005) en su estudio de la variabilidad genética de cuatro poblaciones bolivianas de estas mismas especies; reportó cuatro intrones Mhc, Am2b, PmOPSI y RPEX, para los cuales fueron detectados loci polimórficos. Otros autores también utilizaron exitosamente la técnica EPIC-PCR para el estudio del polimorfismo en otros peces. Así, Berrebi *et al.*, (2006), encontró cuatro intrones diagnósticos (entre ellos Ck) para demostrar claramente la presencia en China, de cuatro grupos independientes geográficamente dentro de la especie *Opsariichthys bidens*. Hassan *et al.*, (2002), utilizó 17 intrones para estudiar la variación nuclear en algunos peces teleosteos (Carangidae, Centropomidae, Chaetodontidae, Clupeidae, Holocentridae, Moronidae, Mullidae, Pomacentridae, Scombridae y Siganidae), encontrando 14 intrones informativos para estas especies. Hassan & Bonhomme, (2005), en su estudio de la variabilidad genética de *Upeneus moluccensis* con 5 intrones, no encontró diferencia genética significativa.

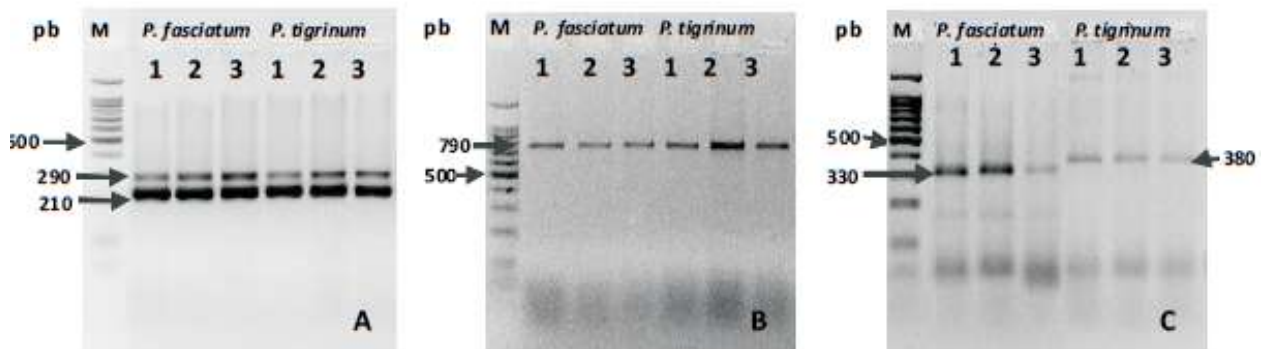


Figura 2. Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de amplificación de los intrones: (A) Ck, (B) RPEX y (C) PmOPSI en doncella *P. fasciatum* y tigre zúngaro *P. tigrinum*.

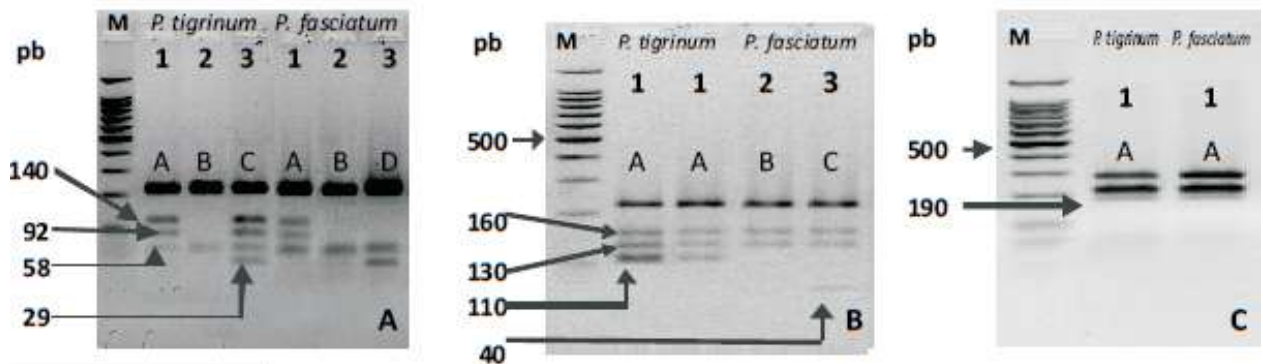


Figura 3. Gel de agarosa al 1.8% mostrando los cortes (Perfiles: A, B, C y D) con enzimas de restricción en el intron Ck: (A) enzima *HhaI*, (B) enzima *RsaI* y (C) enzima *DraI* para tigre zúngaro *P. tigrinum* y doncella *P. fasciatum*.

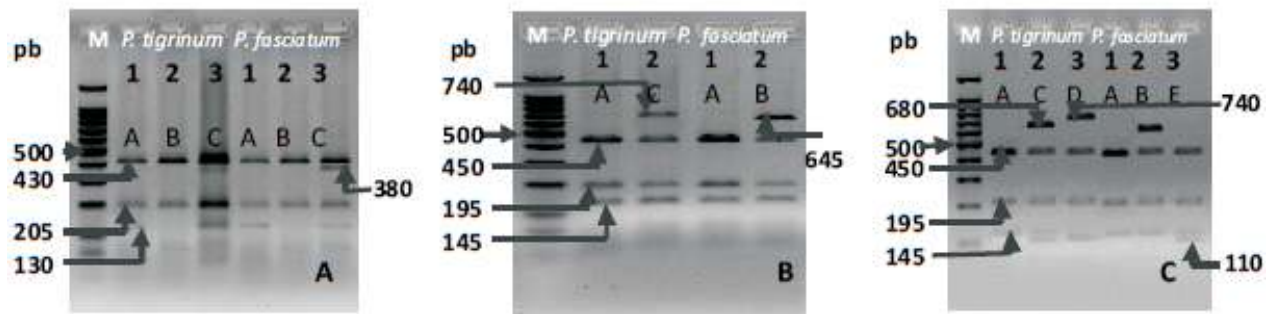


Figura 4. Gel de agarosa al 1.8% mostrando los cortes (Perfiles: A, B, C, D y E) con enzimas de restricción en el intron RPEX: (A) enzima *HpyCH4IV*, (B) enzima *NciI* y (C) enzima *HpaII* para tigre zúngaro *P. tigrinum* y doncella *P. fasciatum*.

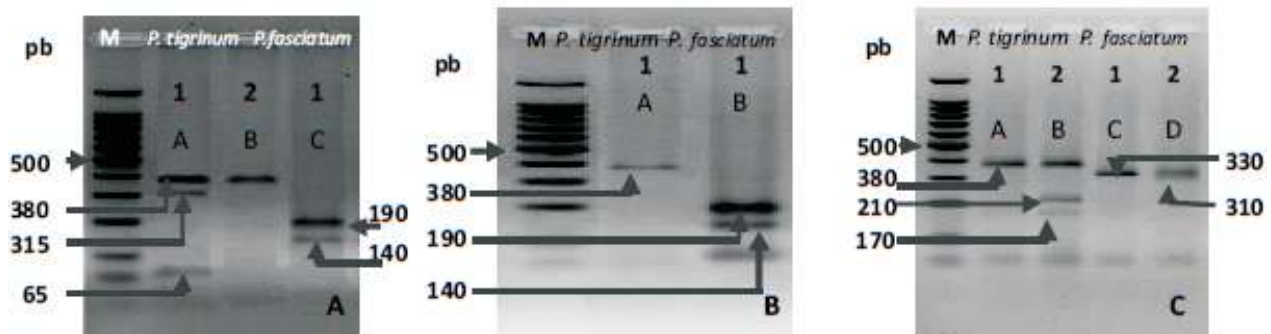


Figura 5. Gel de agarosa al 1.8% mostrando los cortes (Perfiles: A, B, C, D y E) con enzimas de restricción en el intron RPEX: (A) enzima *HpyCH4IV*, (B) enzima *NciI* y (C) enzima *HpaII* para tigre zúngaro *P. tigrinum* y doncella *P. fasciatum*.

De las diez enzimas utilizadas en este estudio, sólo siete revelaron un polimorfismo de restricción (entonces de secuencia): *HhaI* y *RsaI* en el intron Ck (Figura 3); *HpyCH4IV*, *NciI* y *HpaII* en RPEX (Figura 4); y *BstBI*, *TaqI* y *HpaII* en PmOPSI (Figura 5). Los intrones monomórficos Ck y RPEX después de la digestión mostraron un polimorfismo a nivel inter e intrapoblacional con las enzimas *HhaI*, *RsaI*, *HpyCH4IV*, *NciI* y *HpaII*. De estas enzimas *HhaI* y *HpyCH4IV* mostraron perfiles específicos para una parte de las poblaciones en ambas especies. El intron PmOPSI fue poco informativo a nivel inter poblacional, siendo que la única enzima que presentó perfiles informativos para las poblaciones de *P. fasciatum* fue *HpaII*. Las demás enzimas produjeron perfiles comunes entre las tres poblaciones de ambas especies.

RELACIONES INTERESPECÍFICAS ENTRE *Pseudoplatystoma fasciatum* Y *P. tigrinum*

Los resultados del AFC entre las especies, muestran dos grupos claramente definidos y totalmente independientes entre sí (Figura 6); permitiéndonos afirmar la separación genética de estas especies. Estos resultados son corroborados por

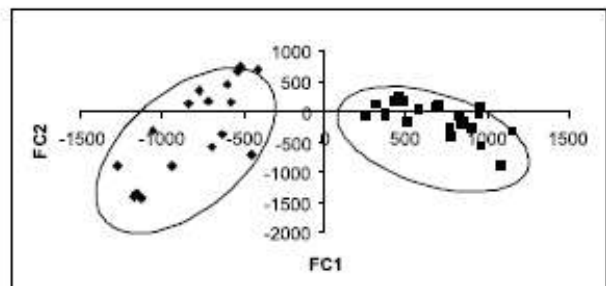


Figura 6. Groyección gráfica de los dos primeros ejes del Análisis Factorial de Correspondencia para los individuos de tigre zúngaro *P. tigrinum* (♦) y doncella *P. fasciatum* (■).

el F_a (0.43, $P = 0$) y la distancia genética fuerte ($D = 0.76$) entre las dos especies. Resultados similares fueron obtenidos por Barreta, (2005) en su análisis interespecífico de las cuencas bolivianas del Beni, Mamoré, Iténez y Manuripi ($F_a = 0.56$ a $P = <5\%$). Asimismo, podemos afirmar que estas especies analizadas con la combinación de los marcadores EPIC-RFLP no presentan híbridos naturales entre ellas; estos resultados concuerdan con los estudios

realizados en otras regiones, con otros marcadores: Isoenzimas y locus de EPIC-PCR (Barreta, 2005), (D-loop)-RFLP (Rivera, 2003) y secuenciamiento nucleotídico de la región D-loop (Torrico 2004). A nivel interpoblacional, en ninguna de las dos especies, el AFC no logró discriminar las tres poblaciones geográficas estudiadas.

Las estimaciones del F_{st} para las poblaciones dentro de las especies no fueron significativas (Tabla 2). Valores semejantes de F_{st} fueron reportados en poblaciones bolivianas de *P. fasciatum* no lográndose establecer diferenciaciones genéticas entre las poblaciones geográficas (Iténez, Orthon y Mamoré); En cambio para *P. tigrinum* al compararse las poblaciones de las tres cuencas en mención se encontraron diferencias entre el Iténez con la cuenca del río Orthon ($F_{st} = 0.19$) y el Iténez con el Mamoré ($F_{st} = 0.15$) (Rivera, 2003).

Tabla 2. Estimación del F_{st} para las tres poblaciones de doncella *P. fasciatum* y tigre zúngaro *P. tigrinum*. En el cuadrante superior se muestra los resultados de F_{st} y en el cuadrante inferior las probabilidades.

	PI	PP	PM	TI	TP	TM
PI	-	0.000	0.033	0.385	0.363	0.403
PP	0.670	-	0.008	0.409	0.381	0.421
PM	0.175	0.332	-	0.505	0.485	0.518
TI	0.000	0.000	0.000	-	0.000	0.015
TP	0.000	0.000	0.000	0.565	-	0.000
TM	0.000	0.000	0.000	0.266	0.717	-

El dendograma obtenido a partir de los datos de F_{st} y mediante la distancia (D) de Rousset, mostró una clara diferenciación genética entre *P. fasciatum* y *P. tigrinum* ($D = 0.76$). El análisis interpoblacional en *P. fasciatum* reveló que las poblaciones fueron reunidas en dos grupos ($D = 0.01$). El primero agrupa las poblaciones de Iquitos y Pucallpa ($D = 0.00$) y el segundo a la población de Puerto Maldonado. Sin embargo, la diferenciación no es significativa. En *P. tigrinum* las poblaciones se encontraron reunidas en un solo grupo ($D = 0.00$) (Figura 7).

La ausencia de estructuración dentro de cada especie a la escala de la Amazonía peruana puede ser relacionada al comportamiento migratorio de los *Pseudoplatystoma* (Muñoz & Vadamme, 1998) facilitando los intercambios genéticos entre cuencas. Comparando las dos especies, la estructuración más pronunciada (sin embargo no significativa) en *P. fasciatum*, si sería confirmada con un mayor número de datos, podría ser relacionada a la distribución de *P.*

fasciatum río arriba a mayores altitudes; entonces en un área topográficamente más fragmentada, facilitando la divergencia genética entre las poblaciones de las diferentes cuencas y subcuencas.

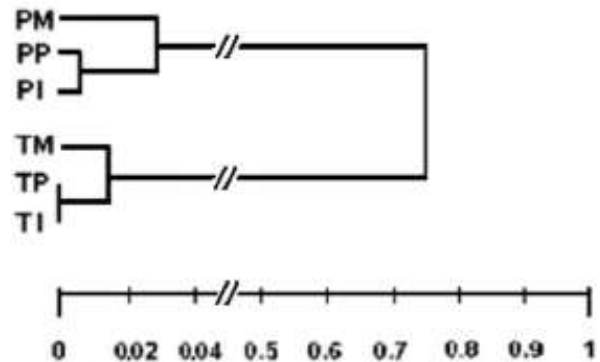


Figura 7. Dendograma elaborado a partir de los datos de distancia genética de Rousset calculada con el F_{st} de las poblaciones de *P. fasciatum* y *P. tigrinum*. PM: *P. fasciatum* Puerto Maldonado; PP: *P. fasciatum* Pucallpa; PI: *P. fasciatum* Iquitos; TM: *P. tigrinum* Puerto Maldonado; TP: *P. tigrinum* Pucallpa; TI: *P. tigrinum* Iquitos.

4. BIBLIOGRAFÍA

- AGUDELO, E., SALINAS, Y., SÁNCHEZ, P., MUÑOZ, D., ALONSO, J., ARTEAGA, M., RODRÍGUEZ, O., ANZOLA, N., ACOSTA, L., NÚÑEZ, M., VALDÉZ, H. 2000. Bagres de la Amazonía colombiana: un recurso sin fronteras. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas (SINCHI). Bogotá. 253 p.
- BARRETA, J. 2005. Variabilidad genética de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* en el alto Madera de la Amazonía boliviana por análisis comparativo del polimorfismo de longitud de secuencia de intrones (EPIC-PCR) y electroforesis enzimática. Tesis de post grado para optar el grado de Magister Scientiarum en Ciencias Biológicas y Biomédicas. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, 102 p.
- BARTHEM, R. B., GOULDING, M. 1997. Os bagres balizadores: ecologia, migração de peixes amazônicos. Sociedade Civil Mamirahuá/MCT-CNPq/IPAAM. Brasília, 129 p.
- BELKHIR, K., BORSA, P., CHICHI, I., RAUFAST, N., BONHOMME, F. 2004. GENETIX 4.05.2, logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

- BERREBI, P., RETIF, X., FANG, F., ZHANG, CH. 2006. Population structure and systematics of *Opsariichthys bidens* (Osteichthyes: Cyprinidae) in south-east China using a new nuclear marker: the introns (EPIC-PCR). *Biological Journal of the Linnean Society*, 87: 155-166.
- BIERNE, N., LEHNERT S., BEDIER F., BONHOMME, F., MOORE, S. 2000. Screening for intron – length polymorphisms in penaeid shrimps using exon – primed intron – crossing (EPIC) - PCR. *Molecular Ecology* (2000), 9: 233-235.
- BUITRAGO-SUÁREZ, U., BURR, B., 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, 1512: 1-38.
- CAÑAS, C. 1998. Evaluación de los recursos pesqueros en la provincia de Tambopata, Madre de Dios para 1997. *Conservación Internacional Perú*. Primera edición. Lima. Real Embajada de los Países Bajos. 86 p.
- CARVAJAL, F. V. 2004. Variabilidad genética de *Cicla* aff. *Monoculus* (Perciformes: Cichlidae) en el alto Madera, Bolivia. Tesis para optar el grado de Magíster Scientiarum en Ciencias Biológicas y Biomédicas. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, 84 p.
- CHOW, S., TAKEYAMA, H. 1998. Intron length variation observed in the creatine kinase and ribosomal protein genes of the swordfish *Xiphias gladius*. *Fisheries Science*, 64: 397-402.
- CORONEL, J. 2001. Population genetics of three species of Pimelodidae (*Brachyplatystoma flavicans*, *Pseudoplatystoma fasciatum* and *Pseudoplatystoma tigrinum*) in the rivers Ichilo and Beni, Bolivia. Tesis de maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, 65 p.
- DA SILVA, M., PATTON, J. 1998. Molecular phylogeography and evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology*, 7: 475-486.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull*, 19:11-15.
- GALLO, H. & DÍAZ-SARMIENTO J. 2003. Variabilidad genética del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pisces: Pimelodidae) en el río Magdalena (Colombia). *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, 27(105): 599-605.
- GARCÍA, A., TELLO, S., VARGAS, G. y DUPONCHELLE, F. 2008 (en prensa). Pattern of commercial fish landings in the Loreto region, Peruvian Amazon between 1984 and 2006. *Fish Physiology and Biochemistry*.
- GOULDING M., SMITH N. Y MAHAR D. (1997). *Floods of fortune: Ecology and Economy along the Amazon*. Columbia University Press, USA. 184 p.
- HASSAN, M., LEMAIRE, C., FAUVELOT, C., BONHOMME, F. 2002. Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. *Molecular Ecology Notes*, 2(3): 334-340.
- HASSAN, M., BONHOMME, F. 2005. No reduction in neutral variability of mitochondrial and nuclear genes for a Lessepsian migrant, *Upeneus moluccensis*. *Journal of fish Biology*. 66: 865-870.
- HE, M., HAYMER, D. 1997. Polymorphic intron sequences detected within between populations of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 90(6): 831-852.
- HE, M., HAYMER, D. 1999. Genetic relationships of populations and the origins of new infestations of the Mediterranean fruit fly. *Molecular Ecology*, 8: 1247-1257p.
- LAUZANNE L. Y LOUBENS G. (1985). *Peces del río Mamoré*. Editions de l'ORSTOM, Collection travaux et documents N° 192. France. 116 p.
- MONCADA, G., RÍOS, G. 2002. Análisis socioeconómico de la pesquería de grandes bagres en Iquitos, Perú. Tesis para optar el título de profesional de Biólogo. Universidad nacional de la Amazonía Peruana. 70 p.
- MONTREUIL, V. 2000. Situación regional de manejo de las pesquerías de los grandes bagres migratorios amazónicos. *FAO*, 110 p.

- MORITZ, C. 1995. Uses of molecular phylogenies for conservation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences, 349: 113-118.
- MUÑOZ, H., VAN DAMME, P. A. 1998. Parámetros de reproducción de cuatro especies de peces comerciales (*Pseudoplatystoma fasciatum*, *P. tigrinum*, *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomum*) en la cuenca del río Ichilo (Bolivia). Revista Boliviana de Ecología, 4: 39-54.
- PALUMBI, S. & BAKER, C. 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. Molecular Ecology, 7: 547-560p.
- PALUMBI, S. 1995. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Molecular Systematics, 2nd edn (ed. Hillis D, Moritz C). Sinauer, Sunderland, MA. 205-247p.
- RIVERA, R. V. 2003. Variabilidad genética de *Pseudoplatystoma tigrinum* y *Pseudoplatystoma fasciatum* en la cuenca de la Amazónica boliviana. Tesis de grado para optar al título de Licenciatura en Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, 49 p.
- SCRIBNER, K., PAGE, K., BARTRON, M. 2001. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. Fish Biology and Fisheries, 10: 293-323.
- SIVASUNDAR, A., ELDREDGE, B., ORTI, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. Molecular Ecology, 10: 407-417.
- SLADE, R., MORITZ, C., HEIDEMAN, A., HALE, P. 1993. Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. Molecular Ecology, 2: 359-373.
- TORRICO, 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 Master en Ciencias Biológicas y Biomédicas. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, 95 p.
- TORRICO, J.P., HUBERT, N., DESMARAIS, DUPONCHELLE, F., NUÑEZ RODRIGUEZ, J., MONTOYA-BURGOS, J., GARCIA DAVILA, C., CARVAJAL-VALLEJOS, F.M., GRAJALES, A.A., BONHOMME, F., RENNO, J-F. Molecular Phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and Evolutionary implications. (Publicación aceptada en Molecular phylogenetics and Evolution).
- WEIR, B.S. 1991. Genetic data analysis. Sinauer, Sunderland, MA.
- WEIR, B.S., COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38: 1358-1370.