

## VARIACIÓN GENÉTICA EN EL COMPLEJO DE ESPECIES *ASTYANAX BIMACULATUS* (PISCES, CHARACIFORMES, CHARACIDAE) DE LA REGIÓN NOR-ORIENTAL DE VENEZUELA

### GENETIC VARIATION IN THE *ASTYANAX BIMACULATUS* SPECIES COMPLEX (PISCES, CHARACIFORMES, CHARACIDAE) FROM NORTH-EASTERN VENEZUELA

Yoliana Añanguren<sup>1</sup> y Ana Bonilla<sup>2</sup>

1. Museo de Ciencias, Parque Los Caobos, Plaza Los Museos (gininvestigacion8@museodeciencias.gov.ve)
2. Laboratorio de Morfología y Genética Evolutiva, Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. (abonilla@strix.ciens.ucv.ve)

#### RESUMEN

En representantes de *Astyanax bimaculatus* provenientes de cuatro localidades al nor-oriente de Venezuela, se realizó un análisis genético preliminar, mediante electroforesis en geles de almidón, para 15 sistemas enzimáticos y proteínas generales. En estas localidades se colectaron representantes de dos morfotipos de esta especie, previamente reportados para la zona: el morfotipo-A en los ríos Arenas (Cuenca del Manzanares), Tamanaco y Güere (Cuenca del Unare) y el morfotipo-B en los ríos Güere y Orituco (Cuenca del Orinoco). A partir de los valores del índice de distancia genética, pudo establecerse una baja diferenciación genética entre las sub-poblaciones analizadas; sin embargo, las frecuencias alélicas señalan una mayor variabilidad genética en las sub-poblaciones pertenecientes al morfotipo-A (Arenas, Güere y Tamanaco). El análisis del patrón de coloración de las aletas caudal y anal mostró diferencias entre los dos morfotipos. El patrón de coloración del morfotipo-A proveniente del río Arenas resultó diferente de los individuos del mismo morfotipo de otras localidades muestreadas. La distribución actual de las sub-poblaciones estudiadas sigue un patrón geográfico del tipo disjunto. En el río Güere se observa un patrón de solapamiento de los dos morfotipos. La diferenciación morfométrica y merística y la cercanía genética de las poblaciones de *A. bimaculatus* de la región nor-oriental del país, sugieren la predominancia de plasticidad fenotípica sobre diferenciación genética en las mismas.

#### ABSTRACT

Isozyme and allozyme patterns for 15 enzymes and general proteins of *Astyanax bimaculatus* from four localities in north-eastern Venezuela were determined by starch gel electrophoresis. Two previously reported morphotypes were collected: morphotype-A from Arenas river (Manzanares river Basin) and Güere and Tamanaco rivers (Unare river Basin) and morphotype-B from Orituco (Orinoco rivers Basin) and Güere rivers. Genetic distance values indicate a low level of differentiation among the subpopulations analyzed, however, allelic frequencies values indicate larger genetic variability in subpopulations of morphotype-A. Analysis of caudal and anal fin color patterns showed differences between morphotypes. Color pattern for morphotype-A from Arenas river differed from the specimens of the same morphotype in other localities sampled. The actual distribution of the subpopulations studied shows a disjunct geographic pattern, although morphotypes A and B coexist in Güere river. This study suggests dominance of phenotypic plasticity over genetic differentiation in explaining the morphological and genetic patterns observed in populations of *A. bimaculatus* of north-eastern Venezuela.

**Palabras clave:** *Astyanax*, isoenzimas, morfotipos, Venezuela.

**Keywords:** *Astyanax*, isozymes, morphotypes, Venezuela.

## INTRODUCCIÓN

Los factores causantes de la variación genética en los organismos pueden originarse selectivamente o neutralmente, con la selección natural y las migraciones y deriva génica, como los principales mecanismos asociados en cada caso (Allendorf y Phelps, 1981). Independientemente de la naturaleza de los factores que originan la variación genética, son las alteraciones en la estructura genética de las poblaciones las que definen los cambios evolutivos (Futuyma, 1979). Una alteración en la estructura genética de una población puede presentarse al restringirse el flujo génico entre los individuos que la integran y, dependiendo del tipo de restricción, causar variación geográfica, si es limitada o especiación, si es total (Endler, 1977; Futuyma, 1979).

El estudio de los procesos de especiación implica no sólo la determinación del nivel de variabilidad que presenta el grupo en cuestión, (p. ej., patrones morfológicos y/o genéticos), sino también el conocimiento de los patrones biogeográficos y la historia geológica del área geográfica correspondiente. En este sentido, los peces dulceacuícolas primarios resultan particularmente interesantes, ya que en la mayoría de los casos, es factible determinar de manera precisa su distribución geográfica y las consecuencias genéticas y morfológicas de cualquier interrupción del flujo génico por el aislamiento entre sus poblaciones.

Diversidad de ejemplos de este tipo de estudios, que utilizan como metodología básica la técnica de electroforesis en geles de almidón para el análisis iso y aloenzimático, se encuentran en la bibliografía desde la década de 1970. Destaca el trabajo de Avise y Selander (1972) sobre la genética evolutiva de peces del género *Astyanax* (Characidae), en el cual se comparan morfológica y genéticamente ejemplares de *A. mexicanus* que habitan en cuevas y en ríos superficiales de la misma localidad, reportando una alta similaridad isoenzimática, acompañada de una marcada diferenciación morfológica basada en la despigmentación corporal e individuos ciegos en las cuevas. Turner (1983) demuestra una sobreestimación de los niveles de diferenciación genética en poblaciones aisladas de *Cyprinodon macularius* (Cyprinodontidae), que inclusive habían sido reconocidas como especies distintas, debido a

su gran diferenciación morfológica. En la década de los 80, la incorporación de los análisis de ADN trajo consigo un auge de trabajos que incluyeron ambas técnicas genéticas. Tal es el caso del reporte de Dowling y Brown (1989) en el que emplean aloenzimas y ADN mitocondrial para inferir relaciones filogenéticas entre cuatro especies de ciprínidos del género *Notropis*, encontrando discrepancia entre los resultados obtenidos por ambos métodos, posiblemente debido a la propensión de hibridizar de las especies en estudio y a la posibilidad de introgresión del ADNm. Más recientemente, Nakanorn y col. (2002) pudieron diferenciar fácilmente tres especies nativas y una introducida de bagres del género *Clarias* de Tailandia, con base en los patrones isoenzimáticos y en el porcentaje de loci diagnósticos observado entre las mayoría de las especies geográficamente separadas.

En la región nor-oriental de Venezuela han sucedido diversos procesos geomorfológicos e hidrológicos que pudiesen constituir eventos vicariantes para la fauna dulceacuícola de la zona. Un caso resaltante es la separación de las cuencas de los ríos Unare y Orinoco hace unos 7 a 10 millones de años (Rod, 1981; Méndez, 1985; Díaz de Gamero; 1996), con el consecuente aislamiento de las poblaciones ancestrales de los peces de ambas cuencas. Como resultado de este evento, en las actuales cuencas del Unare y Manzanares habrían quedado sólo pequeñas fracciones de la población original, sujetas a presentar variación por deriva génica. De acuerdo con Bush (1975), este escenario se correspondería muy ajustadamente con el modelo de especiación alopátrica por efecto fundador, precedido por un patrón de variación geográfica del tipo disjunto (Endler, 1977).

Entre la diversidad de especies ícticas dulceacuícolas primarias que podrían ejemplificar muy bien los planteamientos anteriores, destaca el complejo *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae) por su amplia distribución geográfica en el territorio nacional (Mago-Leccia, 1965), incluyendo la región del país antes mencionada, además de la variada gama de patrones de coloración corporal y diferencias merísticas que se observan en los individuos de distintas localidades.

En este sentido, González-Carcacia y López-Rojas (2002) determinaron dos morfotipos para repre-

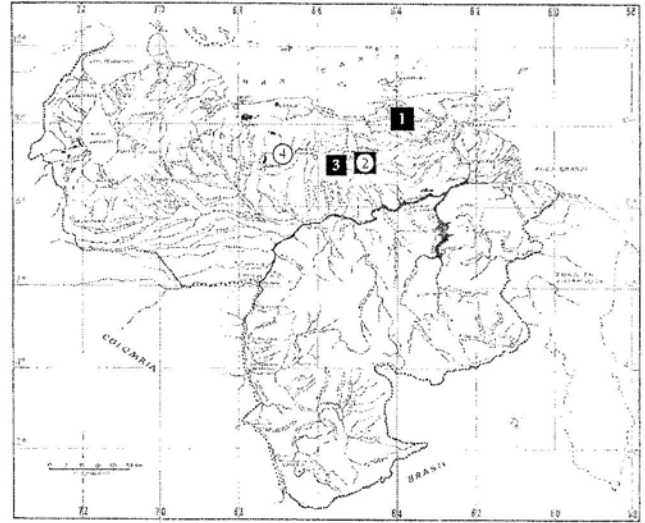
representantes del complejo *Astyanax bimaculatus*, de algunas localidades de las cuencas del Orinoco y del Caribe, basado en diferencias merísticas (morfotipo-A, con 35 a 39 escamas sobre la línea lateral, de 13 a 15 escamas en la serie transversal y de 29 a 30 radios en la aleta anal y morfotipo-B, el cual posee de 40 a 42 escamas sobre la línea lateral, de 16 a 17 escamas en la serie transversal y entre 26 a 28 radios en la aleta anal). Así, encontraron el morfotipo-A en los ríos Arenas y La Toma (Cuenca del Manzanares), Tamanaco y Güere (Cuenca del Unare) (ambas cuencas pertenecen a la extendida cuenca del Caribe), y el morfotipo-B en los ríos Güere y Orituco y Laguna El Jabillal (Cuenca del Orinoco). Adicionalmente, el análisis morfométrico de representantes de los dos morfotipos en las localidades antes mencionadas, evidenció la existencia de variación morfológica entre los ejemplares de *A. bimaculatus* de las cuatro cuencas estudiadas.

Estas premisas motivaron la realización de un estudio genético preliminar del complejo *Astyanax bimaculatus* en poblaciones presentes en algunas de las localidades antes mencionadas, pertenecientes a las cuencas de los ríos Orinoco, Unare y Manzanares, a fin de determinar el nivel de diferenciación genética de los morfotipos identificados para la zona, como información base para determinar la existencia de patrones de variación geográfica que conlleve a la formación de nuevas especies.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los individuos utilizados para este estudio se colectaron entre abril de 2000 y junio 2001, mediante varios lances de chinchorros de playa de 1.5 m x 1.0 m y 1.0 cm de abertura de malla, en las siguientes localidades: río Arenas (Edo. Sucre) perteneciente a la cuenca del Manzanares; río Güere (Edo. Anzoátegui) y Tamanaco (Edo. Guárico) pertenecientes a la cuenca del Unare y río Orituco (Edo. Guárico) de la cuenca del Orinoco (Figura 1).

Inmediatamente después de colectados, los peces completos fueron congelados en hielo seco y posteriormente almacenados en un ultracongelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La identificación taxonómica se realizó siguiendo las claves de Eigenmann (1921; 1927), Géry (1977), además de claves provisionales de



**Figura 1.** Localidades de colecta de *Astyanax bimaculatus*. 1. Río Arenas; 2. Río Güere; 3. Río Tamanaco; 4. Río Orituco. Se indica la ubicación de los dos morfotipos reportados para la región (símbolos cuadrados, morfotipo-A y círculos, morfotipo-B).

Garutti y Figueredo-Garutti (1992) y la caracterización de morfotipos de poblaciones de los ríos en estudio según González-Carcacia (2001). El estadio de madurez sexual de cada individuo se determinó practicando una incisión ventral para examinar directamente las gónadas.

Para los ensayos isoenzimáticos mediante electroforesis en geles de almidón al 10%, se tomaron muestras de músculo esquelético de la región dorsal de 113 individuos adultos (Tabla 1) que se homogeneizaron en buffer Tris/EDTA pH 7.0. Para todas las poblaciones estudiadas se ensayaron 15 sistemas enzimáticos: Lactato Deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27), Glucosa-6-fosfato Isomerasa (GPI, EC 5.3.1.9), Fosfoglucomutasa (PGM, EC 5.4.2.2), Malato Deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), Enzima Málica (ME, EC 1.1.1.40), Isocitrato Deshidrogenasa (IDH, EC 1.1.1.42), Alcohol Deshidrogenasa (ADH, EC 1.1.1.1), Glucosa Deshidrogenasa (GCDH, EC 1.1.1.47), Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49), Fosfogluconato Deshidrogenasa (PGDH, EC 1.1.1.44), Esterasas generales (EST, EC 3.1.1.-), Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), Hexokinasa (HK, EC 2.7.1.1), Creatina Kinasa (CK, EC 2.7.3.2), Glicerol-3-fosfato Deshidrogenasa (G3PDH, EC 1.1.1.8), además de Proteínas Generales (GP), siguiendo los récipes propuestos por

Shaw y Prasad (1970), Harris y Hopkinson (1976), Aebersold y col. (1987), Murphy y col. (1990) y Buth y Murphy (1990).

Para el análisis de los electroforetogramas, los geles revelados se preservaron refrigerados en una solución de ácido acético:metanol:agua (5:1:5), para ser luego fotografiados (Sistemas de Documentación Digital Kodak DC 40) y/o procesados directamente con un scanner, para la documentación posterior. La nomenclatura de los loci presuntivos, así como la de sus correspondientes alelos, sigue a Shaklee y col. (1990): para los loci, se inició a partir de 1 en forma ascendente en la dirección cátodo-ánodo y para los alelos, al más común se le asignó el número \*100 como punto de referencia para la numeración del resto, de acuerdo con su movilidad relativa.

Una vez definidos los loci presuntivos y su composición alélica, a partir de los electroforetogramas se determinaron los genotipos individuales, para calcular (BIOSYS-1 versión 1.7, Swofford y Selander, 1989), las frecuencias alélicas, el porcentaje de polimorfismo ( $P$ ), la heterocigosidad promedio ( $H$ ), las desviaciones de las proporciones de la Ley Hardy-Weinberg por cada locus, distancia genética ( $D$ ; Nei, 1978) y el estadístico  $F_{ST}$  para cada loci polimórfico tomando todas las sub-poblaciones estudiadas, según el arreglo jerárquico que se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Arreglo jerárquico para la región nor-oriental del país: cuencas, ríos, morfotipos. Se incluye el número de individuos y sexo de los ejemplares analizados. M=macho, H=Hembra, ND=no determinado.

CUENCA	RÍO	MORFOTIPO	Número de individuos			
			M	H	ND	Total
Manzanares	Arenas	A	8	14	-	22
Unare	Tamanaco	A	9	13	1	23
	Güere	A	11	9	-	20
	Güere	B	9	14	-	23
Orinoco	Orituco	B	6	19	-	25

## RESULTADOS

El estudio electroforético de 15 sistemas enzimáticos más proteínas generales, mostró 18 loci bien revelados, 11 de los cuales resultaron monomórficos ( $LDH-1^*$ ,  $LDH-2^*$ ,  $GPI-1^*$ ,  $GPI-2^*$ ,  $PGM^*$ ,  $ADH^*$ ,  $G6PDH^*$ ,  $GCDH^*$ ,  $PG-1^*$ ,  $EST^*$ ,  $PGDH^*$ ) y 7

polimórficos ( $MDH-1^*$ ,  $ME_{(s)}^*$ ,  $ME_{(m)}^*$ ,  $PG-2^*$ ,  $PG-3^*$ ,  $EST-2^*$  Y  $EST-3^*$ ). Los sistemas G3PDH, CK, HK, IDH y SOD no revelaron para ninguna de las poblaciones analizadas. En la Tabla 2 se muestran las frecuencias alélicas de cada uno de los loci polimórficos revelados para cada sub-población de *A. bimaculatus*; además se presenta la heterocigosidad por locus ( $h$ ) según el estimado no-sesgado de Nei (1978).

**Tabla 2.** Frecuencias alélicas y heterocigosidad por locus ( $h$ : estimación no-sesgada según Nei, 1978) de los loci polimórficos (frecuencia del alelo más común menor de 0.950) para las cinco sub-poblaciones de *Astyanax bimaculatus* estudiadas.

Alelos	Locus		
	$MDH-1^*$	$MEs^*$	$ME_{(m)}^*$
<b>Río Arenas (A)</b>			
*98	0.000	0.156	0.000
*100	1.000	0.844	0.500
*102	0.000	0.000	0.500
$h$	0.000	0.264	0.500
<b>Río Tamanaco (A)</b>			
*98	0.525	0.357	0.000
*100	0.475	0.643	0.611
*102	0.000	0.000	0.389
$h$	0.499	0.459	0.475
<b>Río Güere (A)</b>			
*98	0.289	0.118	0.000
*100	0.711	0.882	0.778
*102	0.000	0.000	0.222
$h$	0.411	0.208	0.346
<b>Río Güere (B)</b>			
*98	0.350	0.000	0.000
*100	0.650	1.000	0.833
*102	0.000	0.000	0.167
$h$	0.455	0.000	0.278
<b>Río Orituco (B)</b>			
*98	0.000	0.000	0.000
*100	1.000	1.000	1.000
*102	0.000	0.000	0.000
$h$	0.000	0.000	0.000

La proporción de loci polimórficos ( $P$ ) y la frecuencia promedio de loci heterocigos por individuo ( $H$ ), como medidas de variabilidad genética, se muestran en la Tabla 3. Las sub-poblaciones de Río Tamanaco (morfotipo-A) y Río Güere (morfotipo-A), mostraron el mismo valor de polimorfismo (23.1%) teniendo ambas sub-poblaciones los tres loci polimórficos ( $MEs^*$ ,  $ME_{(m)}^*$  y  $MDH-1^*$ ), a pesar de que los valores de heterocigosidad promedio no son semejantes (0.113 y 0.076, respectivamente). Río Arenas (morfotipo-A) y Río Güere morfotipo-B poseen valores de polimorfismo (15.4%) y heterocigosidad promedio (0.060 y 0.058,

respectivamente) muy similares, aunque en la primera sub-población el polimorfismo corresponde a las dos formas de *ME*\* (soluble y mitocondrial) y en la segunda a *ME*m\* y *MDH-1*\*. La subpoblación del Río Orituco (morfotipo-B) resultó ser monomórfica para todos los loci analizados. Los tres loci polimórficos (*ME*s\*, *ME*m\* y *MDH-1*\*) demostraron heterogeneidad significativa ( $P < 0.01$ ) para todas las subpoblaciones.

Para la determinación de las desviaciones de las proporciones de la Ley Hardy-Weinberg se realizaron pruebas de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para cada locus polimórfico en las 5 subpoblaciones, basadas en las frecuencias alélicas y genotípicas (Tabla 4). Ninguno de los tres loci polimórficos resultó en proporción según la Ley Hardy-Weinberg, ya que los valores calculados de  $\chi^2$  son mayores que el valor teórico (3.84 según tabla de Chi-cuadrado con 95%

**Tabla 3.** Variabilidad genética en los trece loci analizados para las cinco sub-poblaciones de *A. bimaculatus*. Entre paréntesis el error estándar.

Población (morfotipo)	n	a	(P)	(H)	
				Observada	Esperada según Hardy-Weinberg*
Río Arenas (A)	21.2 (0.5)	1.2 (0.1)	15.4	0.005 (0.005)	0.060 (0.043)
Río Tamanaco (A)	22.2 (0.4)	1.2 (0.1)	23.1	0.023 (0.013)	0.113 (0.060)
Río Güere (A)	18.8 (0.2)	1.2 (0.1)	23.1	0.004 (0.004)	0.076 (0.042)

n = Tamaño promedio de la muestra por locus. a = Número promedio de alelos por locus. (P) = Porcentaje de loci polimórficos (frecuencia del alelo más común menor de 0,950). (H) = Heterocigosidad promedio; \* = Estimación no-sesgada según Nei, 1978.

**Tabla 4.** Coeficientes para exceso o deficiencia de heterocigos (D) para cada locus polimórfico, en las poblaciones estudiadas.

Locus	Heterocigos observados	Heterocigos esperados	Índice de fijación (F)	D <sup>(1)</sup>
<b>Río Arenas (morfotipo A)</b>				
<i>ME</i> s*	1	4.219	0.763	-0.76
<i>ME</i> m*	0	9.000	1.000	-1.0
<b>Río Tamanaco (morfotipo A)</b>				
<i>MDH-1</i> *	1	9.975	0.900	-0.90
<i>ME</i> s*	3	9.643	0.689	-0.68
<i>ME</i> m*	2	8.556	0.766	-0.76
<b>Río Güere (morfotipo A)</b>				
<i>MDH-1</i> *	1	7.816	0.872	-0.87
<i>ME</i> s*	0	3.529	1.000	-1.00
<i>ME</i> m*	0	6.222	1.000	-1.00
<b>Río Güere (morfotipo B)</b>				
<i>MDH-1</i> *	0	9.100	1.000	-1.00
<i>ME</i> m*	2	5.000	0.600	-0.60
<b>Río Orituco (morfotipo B)</b>				
No se encontraron loci polimórficos				

<sup>(1)</sup> los valores negativos indican deficiencia de heterocigos

de confianza y un grado de libertad). Además, todas las poblaciones mostraron valores elevados del Índice de Fijación (F), oscilando entre 0.600 y 1.000, así como deficiencia de heterocigos (D entre -1.00 y -0.60) para todos los loci polimórficos revelados.

Para estimar el grado de diferenciación entre sub-poblaciones se hace uso de medidas estándar de divergencia entre loci individuales, como el estadístico F, cuyos valores teóricos oscilan entre 0 y 1 (Allendorf y Phelps, 1981). Los valores de F asociados a cada nivel de jerarquía, relativo al otro nivel y su correspondiente componente de varianza, se indican en la Tabla 5, donde se aprecia que el mayor nivel de estructuración genética se presenta entre los morfotipos con relación a las cuencas donde se localizan. La diferenciación entre morfotipos contribuye en baja medida a la estructuración observada.

Al analizar la variabilidad por locus, se observa que el valor de  $F_{ST}$  promedio para los tres loci polimórficos y las cinco sub-poblaciones fue de 0.187. Según los intervalos propuestos por Wright en 1978 (citado por Hartl y Clark, 1997), los valo-



res de  $F_{ST}$  obtenidos en este trabajo son indicativos de una gran estructuración genética entre las subpoblaciones estudiadas. El locus que más contribuye a la variabilidad total es *MDH-1\** con un valor de  $F_{ST}$  de 0.236, a pesar de no encontrarse en polimorfía en todas las subpoblaciones, como sí es el caso de *MEim\** ( $F_{ST} = 0.160$ ). El locus *MEs\** ( $F_{ST} = 0.156$ ) es el que menos contribuye, aunque como puede observarse, la diferencia entre los dos últimos es muy pequeña.

**Tabla 5.** Estadístico F y su varianza asociada, para todos los loci analizados de acuerdo al arreglo jerárquico establecido.

Comparación X	Y	Varianza	F(XY)	
Morfotipo	Río	0.00879	0.011	
Morfotipo	Cuenca	0.17251	0.179	
Morfotipo	Región	0.16769	0.175	
Río	Cuenca	0.16373	0.170	
Río	Región	0.15890	0.166	
Cuenca	Región	0.00482	0.005	

En la Tabla 6 se resumen los coeficientes de distancias genéticas ( $D$ ), calculados según Nei (1978), obtenidos para el análisis jerarquizado por Cuencas y por Ríos. Los valores de  $D$  indican una elevada cercanía genética entre las subpoblaciones analizadas, propia de poblaciones conespecíficas.

Adicional al estudio isoenzimático, el análisis morfológico cualitativo de los ejemplares en estudio, permitió establecer patrones de coloración de las aletas anal y caudal, específicos para cada morfotipo: el morfotipo-B posee el borde de la aleta anal y los lóbulos de la aleta caudal de un color rojo vivo, mientras que en el morfotipo-A la aleta anal es incolora y sólo los bordes de los lóbulos de la caudal tienen un color amarillo claro. Este patrón de coloración se cumple en todas las subpoblaciones a excepción de los individuos pertenecientes al río Arenas, donde la aleta anal tiene el borde de

color rojo, pero la aleta caudal posee una coloración amarilla en la base y rojiza en los bordes de los lóbulos.

**Tabla 6.** Distancias genéticas ( $D$ ) no sesgadas, según Nei (1978) por cuencas y por ríos, según el arreglo jerárquico. Entre paréntesis los valores mínimo y máximo.

Análisis por Cuencas					
Cuenca	Pobl.	1	2	3	
1. Orinoco	1	—	—	—	
2. Unare	3	0.021 (0.010-0.043)	0.008 (0.000-0.015)	—	
3. Manzanares	1	0.021 (0.021-0.021)	0.019 (0.011-0.025)	—	
Análisis por Ríos					
Río	Pobl.	1	2	3	4
1. Orituco	1	—	—	—	—
2. Güere	2	0.010 (0.010-0.011)	0.000 (0.000-0.000)	—	—
3. Tamanaco	1	0.043 (0.043-0.043)	0.012 (0.009-0.015)	—	—
4. Arenas	1	0.021 (0.021-0.021)	0.015 (0.011-0.020)	0.025 (0.025-0.025)	—

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las poblaciones de *Astyanax bimaculatus* estudiadas muestran una distancia genética muy baja, lo cual apoya el mantenimiento de su condición conespecífica, como era de esperarse. Sin embargo, el análisis jerarquizado del parámetro de  $F_{ST}$  indica una gran estructuración genética entre cuencas (Orinoco, Unare y Manzanares) y ríos (Orituco, Tamanaco, Güere y Arenas) y una pequeña estructuración atribuible a las diferencias entre los morfotipos A y B.

Así, las subpoblaciones correspondientes a las cuencas del Unare y Manzanares son más parecidas entre sí, que ambas respecto a la subpoblación de la cuenca del Orinoco, pero con valores muy similares ( $D = 0.019$ , Unare vs Manzanares y  $D = 0.021$  ambas respecto a Orinoco). En este sentido,

es importante resaltar que la subpoblación estudiada de la cuenca del Orinoco (río Orituco) resultó ser monomórfica para todos los loci analizados, lo cual influye determinantemente sobre la diferenciación observada.

En general, la variabilidad genética encontrada entre las subpoblaciones estudiadas pareciera tener un componente selectivo, fundamentado en la desviación de las proporciones de la Ley Hardy-Weinberg y en la deficiencia de heterocigos de todos los loci polimórficos analizados. Esta condición pudiera ser más evidente en la población del río Tamanaco, tal como lo refleja la distribución relativamente equitativa de los alelos y por la proporción de individuos heterocigos ( $h$ ) en sus tres loci polimórficos ( $MDH-1^*$ ,  $MEs^*$  y  $MEem^*$ ) y en la población del río Arenas (morfotipo-A), con un locus ( $MEem^*$ ) equitativo.

La condición antes descrita, posiblemente esté ocasionando que las poblaciones pertenecientes al morfotipo-A presenten un nivel de variabilidad mayor que aquellas del morfotipo-B, situación ésta que se expresa claramente en el locus  $MEs^*$ , donde se encontró que las poblaciones pertenecientes al morfotipo-A tienen formas alélicas alternas, mientras que las poblaciones pertenecientes al morfotipo-B poseen un único alelo.

Siguiendo los patrones de variación geográfica propuestos por Endler (1977), la distribución actual de ambos morfotipos refleja la existencia de poblaciones disjuntas para las distintas cuencas en estudio (Manzanares, Unare y Orinoco). El origen de las diferencias morfológicas, que derivaron en morfotipos distintos en las cuencas actuales del Caribe y Orinoco (morfotipo-A y morfotipo-B, respectivamente), puede ser consecuencia de las diferencias ambientales que se establecieron en cada una de esas áreas aisladas luego del evento vicariante (levantamiento de tierras y divisoria de aguas), que provocó el fraccionamiento y aislamiento de una única población ancestral localizada en la gran cuenca del Orinoco. La separación de las cuencas del río Orinoco y del Caribe oriental, se estima en unos 7 a 10 millones de años (Mioceno Tardío), mientras que el aislamiento de las cuencas del Unare y Manzanares tiene una data relativamente más reciente, 3 millones de años (Rod, 1981; Méndez, 1985; Díaz de Gamero, 1996).

Entre las localidades estudiadas, en el río Güere (cuenca del Unare) se observa un patrón de solapamiento entre los dos morfotipos, que González-Carcacia y López-Rojas (2002) atribuyen a las introducciones de peces de forrajeo (entre ellas el género *Astyanax*) que realizó el Ministerio de Obras Públicas en el año de 1970, desde la cuenca del Orinoco hacia la cuenca del Unare, a raíz de la construcción de embalses en dicha zona. Se sugiere entonces, que la presencia actual del morfotipo-B en el río Güere responde a la introducción antes mencionada y que, luego del reciente contacto secundario entre los dos morfotipos, todavía mantienen cierto nivel de aislamiento reproductivo, tal como indica la ausencia del alelo  $*98$  para  $MEs^*$  en los individuos del morfotipo-B.

El análisis de los morfotipos por cada río, muestra que las diferencias genéticas encontradas se corresponden parcialmente con los patrones merísticos y morfométricos previamente establecidos para la misma región por González-Carcacia y López-Rojas (2002). Al comparar los resultados morfológicos reportados por los autores antes citados con los patrones genéticos encontrados en este estudio, se observa que dentro del morfotipo-A, la población correspondiente a la cuenca del Manzanares (río Arenas) tiende a diferenciarse morfométricamente de aquellas presentes en la cuenca del Unare (Tamanaco y Güere). En el aspecto isoenzimático, la población de Tamanaco es la que más se diferencia del resto, seguida por la del río Arenas, también correspondiente al mismo morfotipo. Las poblaciones genéticamente más cercanas son las río Güere (morfotipo-A y morfotipo-B).

Los patrones morfológicos y genéticos encontrados para *Astyanax bimaculatus* en las cuencas estudiadas, sugieren la predominancia de plasticidad fenotípica sobre diferenciación genética. El tiempo transcurrido desde el aislamiento entre las cuencas posiblemente sea suficiente para que se manifiesten claras diferencias en caracteres morfológicos externos, como por ejemplo, número de escamas sobre la línea lateral, número de radios y coloración de la aleta anal y altura corporal, pero no para que se establezca un nivel de divergencia genética entre las poblaciones de las distintas cuencas, que permita considerarlas como especies diferentes. La validez del componente genético o morfológico en la

explicación de los patrones biogeográficos observados, necesita de la ampliación del estudio a poblaciones de otras cuencas y un análisis más detallado de los casos donde existe simpatria entre los morfotipos.

Es de vital importancia, la confrontación de la información obtenida en este estudio y de otros similares con las hipótesis que se manejan sobre los movimientos del río Orinoco y el origen de las diferentes cuencas suramericanas como lo sugieren Bonilla-Rivero y col, (2002). Esto permitiría generar modelos de distribución de los peces dulceacuicolas más cercanos a la realidad, a la vez que aumentaría la evidencia acumulada para sustentar las hipótesis hidro-geológicas actuales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo desean agradecer la colaboración y el material suministrado por los miembros de la Colección de Peces del Museo de Biología del Instituto de Zoología Tropical de la Universidad Central de Venezuela, la asistencia técnica en el campo del Sr. Ángel Rojas y la asesoría del Dr. Héctor López-Rojas (IZT, UCV) en la revisión de este manuscrito. Este trabajo fue financiado parcialmente por los Proyectos de Investigación CDCH-UCV 03-31-3451/99 y CONICIT S1-95000515 y forma parte del Trabajo Especial de Grado en la Licenciatura de Biología de Yoliana F. Añanguren G. (UCV).

---

## LITERATURA CITADA

---

- AEBERSOLD, P. B., G. A. WINANS, D. J. TEEL, G. B. MILNER Y F. M. UTTER  
1987. *Manual of starch gel electrophoresis: A method for the detection of genetic variation*. NOAA Technical Report NMFS No. 61. 19 p.
- ALLENDORF, F. W. Y S. R. PHELPS  
1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 38: 1507-1514.
- AVISE, J.C. Y R.K. SELANDER  
1972. Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax*. *Evolution*, 26:1-19.
- BONILLA-RIVERO, A, H. LÓPEZ-ROJAS Y A. MACHADO-ALLISON  
2002. Especiación vicariante en el género *Gephyrocharax* Eigenmann 1912 (Pisces:Characidae:Glandulocaudinae) de Venezuela. *Interciencia*, 27(3):118-127.
- BUSH, G.L.  
1975. Modes of animal speciation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 6:339-364.
- BUTH, D. G. Y R. W. MURPHY  
1990. Enzyme staining formulas. En: *Molecular Systematics* (Hillis, D. M. y C. Moritz, Ed.) Sinauer Associates, Inc., pp 99-126.
- DÍAZ DE GAMERO, M. L.  
1996. The changing course of the Orinoco river during the Miocene: A review. *PALAEO*, 123:385-402.
- DOWLING, T.E. Y W.M. BROWN  
1989. Allozymes, mitochondrial DNA, and levels of phylogenetic resolution among four minnow species (*Notropis*: Cyprinidae). *Syst. Zool.*, 38(2): 126-143.
- EIGENMANN, C. H.  
1921. The American Characidae. *Mem. Mus. Comp. Zool. Harv.* 53(3): 209-310.
- EIGENMANN, C. H.  
1927. The American Characidae. *Mem. Mus. Comp. Zool. Harv.*, 43 (4): 311-428.
- ENDLER, J. A.  
1977. *Geographic variation, speciation and clines*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 246 p.
- FUTUYMA, D. J.  
1979. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Inc., 565 p.
- GARUTTI, V. Y M. L. FIGUEREIDO-GARUTTI  
1992. Caracterização de populações do Lambari *Astyanax bimaculatus* (Pisces:Characidae), procedentes do campus de Jaboticabal. UNESP, SP. *Naturalia*, 17: 17-29.
- GÉRY, J.  
1977. *Characoids of the World*. Neptune City. TFH. Publication Inc. USA. 672 p.
- GONZÁLEZ-CARCACÍA, J. A.  
2001. Morfología comparativa en ejemplares de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes, Characidae) de las cuencas del río Orinoco y del Caribe (ríos Unare, Manzanares y La Toma), Venezuela. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 69 p.
- GONZÁLEZ-CARCACÍA, J.A. Y H.R. LÓPEZ-ROJAS  
2002. Morfología comparativa de ejemplares de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes, Characidae) de las cuencas de Río Orinoco y del Caribe (Ríos Unare, Manzanares y La Toma), Venezuela. *Acta Biol. Venez.*, 22 (3-4): 1-12.



HARRIS, H. Y A. HOPKINSON

1976. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. American Elsevier, New York.

HARTL, D.L. Y G. CLARK

1977. *Principles of population genetics*. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 542 p.

MAGO-LECCIA F.

1965. Contribución a la sistemática y ecología de los peces de la Laguna de Unare, Venezuela. *Bull. Mar. Sci.*, 15(2): 274-330.

MENDEZ, O.

1985. Historia Geológica Graficada de la Cuenca Oriental de Venezuela. VI Congreso Geológico Venezolano. p: 1000-1040.

MURPHY, R. W., J.W. SITES, D.G. BUTH Y C. H. HAUFLE

1990. Proteins I: Isozyme electrophoresis. En: *Molecular Systematics* (Hillis, D. M. y C. Moritz, Ed.) Sinauer Associates, Inc., pp: 99-126.

NA-NAKORN, U., P. SODSUK, P. WONGRAT, S. JANEKITKARN Y D.M. BARTLEY

2002. Isozyme variation among four species of the catfish genus *Clarias*. *J. Fish Biol.*, 60:1051-1057.

NEI, M.

1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetic*, 89:583-590.

ROD, E.

1981. Notes on the shifting course of the ancient Río Orinoco from the late Cretaceous to Oligocene time. *GEOS*, 26:54-56.

SHAKLEE, J. B., F. W. ALLENDORF, D. C. MORIZOT Y G. S. WHITT

1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Transactions of the American Fisheries Society*. 119: 2-15.

SHAW, C. R. Y R. PRASAD

1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, 4: 297-320.

SWOFFORD D.L. Y R.B. SELANDER

1989. *BIOSYS-1: a Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Population Genetic and Biochemical Systematics*, Release 1.7. Urbana IL: University of Illinois, Illinois Natural History Survey. 43 p.

TURNER, B.J.

1983. Genic variation and differentiation of remnant natural populations of the desert pupfish, *Cyprinodon macularius*. *Evolution*, 37:690-700.