

DATOS PRELIMINARS DE LA SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LA ESPECIE
***Pseudoplatystoma Magdaleniatum* (TELEOSTEI: PIMELODIDAE) DEL RIO**
MAGDALENA, COLOMBIA.

Margarita María Barragán De Los Ríos
Pedro Manoel Galleti Junior. Ph.D
Manuel Ruiz Garcia. Ph.D.

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título

Bióloga

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGIA
Bogotá

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

DATOS PRELIMINARS DE LA SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LA ESPECIE
***Pseudoplatystoma Magdaleniatum* (TELEOSTEI: PIMELODIDAE) DEL RIO**
MAGDALENA, COLOMBIA.

MARGARITA MARÍA BARRAGÁN DE LOS RÍOS

APROBADO

Pedro Manoel Galetti Junior
Director

Manuel Ruiz Garzia Ph. D.
Codirector

Edgar Valbuena, P.h.D.
Jurado

Fernando Gallego, P.h.D.
Jurado

DATOS PRELIMINARS DE LA SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LA ESPECIE
***Pseudoplatystoma Magdaleniatum* (TELEOSTEI: PIMELODIDAE) DEL RIO**
MAGDALENA, COLOMBIA.

MARGARITA MARÍA BARRAGÁN DE LOS RÍOS

APROBADO

Ingrid Schuller, P.h.D.
Decana Académica

Andrea Forero Ruiz, B. Sc.
Directora de Carrera

DEDICATORIA

A mis papas porque soy el reflejo de todas las cosas buenas que cultivaron en mi, a mi hermano por ser el modelo a seguir como profesional y como persona. A mi tía Tatis por ser mi segunda mamá y darme tanto amor. A toda mi familia por su ayuda y comprensión a lo largo de toda mi carrera. A todas las personas que de alguna forma estuvieron presentes en el transcurso de toda mi vida y mi carrera y me ayudaron a crecer como persona y profesional

AGRADECIMIENTOS

A mis papas, por todo su amor, confianza y por dejarme volar lejos, porque gracias a ellos entendí que la felicidad no se encuentra donde tú quieras, sino donde te quieran A mi hermano porque nunca me ha desamparado, a pesar de la distancia. A mi abuelita, por ser el árbol que mantiene a la familia, porque sin ella mi vida no sería feliz. A mi tía Tatis por brindarme su amor incondicional y por creer en mí a pesar de todas las dificultades A mi familia, que es la fuente primaria de mi crecimiento como persona, gracias por estar ahí y por ayudarme cuando más lo necesito.

A mi director Pedro Manoel Galetti Junior Ph D, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por la confianza que tuvo en mí durante el desarrollo de este proyecto. A mi co-director Manuel García Ruiz Ph D, por su colaboración y conocimiento en el desarrollo del trabajo.

A Ligia Marlene, por su apoyo y colaboración a lo largo de toda mi carrera. A Mauricio Carrillo, Fernando Carvalho y Catalina Vásquez por el acompañamiento y asesoría en todos los aspectos del desarrollo del trabajo. A todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Biodiversidad Molecular y Citogenética de la Universidad Federal de São Carlos, Brasil.

A Néstor Gómez por su amistad y estar ahí cuando más lo necesite y nunca desampararme, a Carolina Torres, por ser la hermana que nunca tuve y por enseñarme que a pesar que en la vida las cosas no son fáciles siempre hay que salir adelante sin importar cuánto te duela el corazón.

TABLA DE CONTENIDO

1.	Introducción	1
2.	Marco teórico y revisión de literatura	4
3.	Formulación del problema y justificación	15
3.1.	Formulación del problema	15
3.2.	Pregunta de investigación	16
3.3.	Justificación de la investigación	16
4.	Objetivos	17
4.1.	Objetivo general	17
4.2.	Objetivos específicos.	17
5.	Materiales y métodos	17
5.1.	Diseño de la investigación.	17
5.2	Métodos	20
6.	Resultados	24
7.	Discusión	34
8.	Conclusiones	38
9.	Recomendaciones	40
10.	Referencias citadas	41
11.	Anexos	50

RESUMEN

En Colombia, son aun escasos los estudios relacionados con la diversidad genética de especies endémicas de gran importancia para el país y especialmente para el caso de los peces (Bejarano, 2001; Castiblanco, 2003). Partiendo de este hecho, los estudios que permitan comprender acerca de la genética de poblaciones naturales brindarían las bases necesarias relacionadas con los procesos biológicos de las especies naturales de valor económico y ecologico para nuestro país. A través de la genética de poblaciones se pueden conocer fenómenos como deriva genética, flujo de genes, migración, presión de selección, diversidad genética, filogenia y consanguinidad que en general son los fundamentos principales para conocer acerca del comportamiento de las especies naturales y los procesos de adaptación a un medio ambiente determinado.

En la actualidad las poblaciones de peces de agua dulce se ven enfrentadas a nuevos retos y bajo este conocimiento la presión de selección como efectos de contaminación y pesca llaman aun mas la atención por aumentar, proteger y conservar la supervivencia es cada vez es mas fuerte de tal manera que seguirá siendo una necesidad para los investigadores continuar en la búsqueda de la comprensión genética, taxonómica, ecológica y comportamiento de las poblaciones que representan gran importancia ictiología para el país.

En este sentido, el presente estudio preliminar describe los avances logrados sobre la sistémica molecular de la especie separada de *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, comparando los resultados otros individuos que pertenecen a las especies *Pseudoplatystoma Faciatum* y *Pseudoplatystoma Corruscan* que se distribuyen a lo largo de América del sur. Tres genes fueron empleados como marcadores moleculares para las pruebas de diversidad genética y comportamiento de las especies de estudios, lo gen Citocromo b (600 pb), el primer intron del gen Rag 1 (gen activador de recombinación) (600pb) y el primer intron del gen S7 (600 pb). Los resultados brindan una valiosa fuente información para el conocimiento técnico y académico sobre la caracterización genética de esta especie separada de *Pseudoplatystoma magdaleniatum* y acerca de la sistemática de este género que puede ser útil en futuros estudios de la ictiofauna Colombiana.

ABSTRACT

In Colombia, are still few studies concerning the genetic diversity of endemic species of great importance to the country and especially for fish (Bejarano, 2001; Castiblanco, 2003). Based on this fact, studies on understanding the genetics of natural populations would provide the necessary foundation on the biological processes of natural species of ecological and economic value for our country. Through population genetics phenomena are known as genetic drift, gene flow, migration, selection pressure, genetic diversity, phylogeny and consanguinity in general are the main reasons to learn about the behavior of the species and natural processes adaptation to a given environment.

At present, populations of freshwater fish are faced with new challenges and this knowledge under selection pressure as effects of pollution and fishing call further attention to increase, protect and preserve the survival is becoming stronger so that remains a need for researchers to continue the search for understanding genetic, taxonomic and ecological behavior of populations representing ichthyology great importance for the country.

In this regard, this preliminary study describes the progress made on the molecular system of separate species of *Pseudoplatystoma magdaleniatum* comparing the results to other individuals belonging to species and *Pseudoplatystoma Faciatum Pseudoplatystoma Corruscan* that are distributed throughout South America. Three genes were used as molecular markers for testing genetic diversity of species and behavior studies, the cytochrome b gene (600 bp), the first intron of the gene Rag 1 (recombination activating gene) (600pb) and the first intron S7 gene (600 bp). The results provide a valuable information source for academic and technical knowledge on the genetic characterization of this species separate from *Pseudoplatystoma magdaleniatum* and on the systematics of this genus that can be useful in future studies of the ichthyofauna Colombiana.

1. Introducción

El aun escaso conocimiento sobre la genética-poblacional de la ictiofauna neotropical, es en gran medida una limitante para el desarrollo de estudios comparativos de diferenciación poblacional, análisis de filogenia e historia biogeográfica de poblaciones de peces. Este hecho, se considera un punto de atención importante, como iniciativa en el desarrollo e implementación de estudios de investigación que brinden un soporte teórico para la conservación y el buen uso de los recursos ictiológicos del neotrópico.

Los peces, representan los vertebrados más diversificados y con mayor variación genética Lowe-McConnell (1999). En la actualidad existen aproximadamente 22.000 especies descritas taxonómicamente y la mayor parte de ellas habitan las aguas cálidas de los océanos tropicales, conformando un porcentaje de aproximadamente el 40%. Por otro lado, los peces de agua dulce constituyen entre el 20-25% de la biodiversidad de vertebrados y hay indicios que solo para Sur América se encuentran más de 8.000 especies.

Entre los principales representantes de la ictiofauna de agua dulce en Colombia, se destaca el bagre, perteneciente a la familia Pimelodidae cuyo género se conoce como *Pseudoplatystoma*. Este grupo se caracteriza por presentar más de 300 especies contemporáneas y cerca de 1750 especies (no descritas en su totalidad). Estos peces, están siendo objeto de estudios ecológicos, evolutivos y principalmente estudios biogeográficos, esto se debe a su gran importancia económica, ecológica y amplia distribución y diversidad en hábitats neotropicales dulceacuícolas.

Para el caso del género *Pseudoplatystoma* hace menos de una década se encontraba dividido en 3 especies *Pseudoplatystoma coruscans*, *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum*. Sin embargo, a partir de la publicación realizada por Buitrago-Suárez y Burr (2007), se reorganizó la clasificación en ocho especies válidas denominadas: *Pseudoplatystoma coruscans*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, *Pseudoplatystoma metaense*, *Pseudoplatystoma orinocoense*,

Pseudoplatystoma punctifer, *Pseudoplatystoma reticulatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum*. Según esta revisión taxonómica se elevó a categoría de especie a una población de *P. fasciatum* que habita la cuenca del Río Magdalena en Colombia, denominada como *P. magdaleniatum*.

No obstante, en la actualidad es poca la información relacionada con la caracterización genética de cada una de las especies, así como el conocimiento sobre la sistemática del género y esto es debido a que en gran parte las especies presentan una gran variación geográfica y morfológica, así como también a la carencia de análisis taxonómicos rigurosos que permitan delimitar con mayor claridad las respectivas especies.

En el presente estudio se emplearon dos tipos de genes con diferentes tasas de mutación, dado que en reportes recientes se ha verificado la importancia de su empleo en estudios filogeográficos. Marcadores basados en ADN mitocondrial (mtADN) y secuencias de un gen neutral del ADN nuclear (nADN) representan el material genético para la evaluación de individuos pertenecientes al género *Pseudoplatystoma*. El gen mitocondrial del Citocromo b (Cyt-*b*) se caracteriza por presentar en su secuencia diferentes tasas evolutivas una rápida y otra lenta, es decir, una región más conservada y otra más variable este ha sido un gen ampliamente usado en estudios genéticos de peces.

El gen nuclear que activa la recombinación (Rag1) compuesto de un exón, donde el tercer codón forma la región divergente que parece no estar directamente involucrado funcionalmente y que posee una alta tasa de sustitución. Adicionalmente se utilizó el primer intrón del gen nuclear que codifica la proteína ribosomal (S7). Este gen es altamente conservado aunque en vertebrados la longitud del primer intrón varía considerablemente por presentar secuencias degenerativas.

Con base en lo anterior, en esta investigación se planteó un estudio sistemático molecular de la especie *P. magdaleniatum*, con el fin de conocer el comportamiento genético de la especie utilizando las secuencias de tres marcadores moleculares: Citocromo b que

amplifico para un fragmento de aproximadamente (800 pb), Rag1 (660pb) y el gen S7 de (600 pb) con el propósito de obtener datos preliminares que nos permitan conocer acerca de la sistemática de la especie *P. magdaleniatum* y su posición en términos de distancia genética dentro del género.

2. Marco teórico y revisión de literatura

SISTEMAS HIDROGRÁFICOS COLOMBIANOS

RIO MAGDALENA

Colombia es un país de grandes ríos y enormes recursos hidrográficos el cual se divide en cinco grandes vertientes hidrográficas: Caribe, Catatumbo, Amazonas, Orinoco y Pacífico. La familia Pimelodidae se distribuye por varias de estas vertientes, pero los individuos de *Pseudoplatystoma magdaleniatum* presentan su distribución en la vertiente del Caribe.

La vertiente del Caribe tiene 435.000 km², se caracteriza por ser la más importante de Colombia, sus ríos son largos ya que nacen en el interior de las montañas y se dirigen a la costa donde están los puertos que comunican al país con Europa y América del Norte. El río principal es el río Magdalena que junto con el su afluente el río Cauca forman el sistema fluvial de mayor importancia de Colombia, uno de los complejos acuáticos más extensos de Sudamérica, tiene una longitud de 1.540 Km. y una cuenca que abarca 273.350 km (24% del territorio).

El río Magdalena nace en la laguna de la Magdalena, en el páramo de las Papas (Macizo Colombiano) a 3.685 m.s.n.m de altura. Su longitud es de 1.558 Km., de los cuales son navegables 1.290 interrumpidos en el salto de Honda. Recibe las aguas de cerca de 500 afluentes entre los que están el Cesar, San Jorge, Carare, Sogamoso, Lebrija, Saldaña, Bogotá, Negro, Sumapaz, Guarinó, Lagunilla, La Miel y Nus. Sus principales puertos son Barranquilla, La Dorada, Puerto Berrío, Barrancabermeja, Puerto Wilches, Magangué, el Banco y Girardot.

En la actualidad cuenta con una ictiofauna estimada entre 190 y 245 especies, diversidad muy inferior a la de las cuencas del Orinoco (>1.000 especies) y Amazonas (entre 2.500-

3.000), especies con las cuales compartió un legado común antes del aislamiento ocasionado por el levantamiento de la cordillera de los Andes en el terciario tardío (Gallo & Díaz-Sarmiento 2006).

En el río Magdalena, el bagre rayado es la especie de mayor tamaño y ocupa la posición trófica más alta entre los peces carnívoros. Presenta dos picos reproductivos bien definidos y sus migraciones estacionales aguas arriba en el canal principal del río, conocidas localmente como “subienda”, son evidentes en las capturas artesanales, las cuales se han constituido junto con las del bocachico *Prochilodus magdalenae* en la base de la pesquería artesanal de la cuenca (Gallo & Díaz-Sarmiento 2006).

SITUACIÓN TAXONÓMICA DE LA FAMILIA PIMELODIDAE CON ÉNFASIS EN EL GÉNERO *Pseudoplatystoma*

La familia *Pimelodidae* a la cual pertenecen los grandes bagres está compuesta por más de noventa especies distribuidas en 30 géneros y agrupados en más de 300 especies, representa uno de los taxones de agua dulce más grandes del neotrópico. Las especies se caracterizan por ser migradores de largas distancias que abarcan los grandes ríos del Amazonas y Orinoco (Coronel *et al.*, 2004). No obstante, la familia *Pimelodidae* presenta una situación taxonómica poco definida (Lundberg & Littmann 2003) lo que ha conllevado al desmembramiento de esa familia basándose en la ausencia de sinapomorfias (Carvalho & Galletti 2008).

Entre los Pimelodideos, *Pseudoplatystoma* (Bleeker 1862), se caracteriza porque el género presenta una amplia distribución geográfica que abarca las cuencas hidrográficas de América de Sur (Carvalho & Galletti 2008) y por mostrar una distribución cis/trans andina lo que evidencia la existencia de uniones pretéritas en las cuencas de drenaje del San Francisco, Paraná, Amazonia, Orinoco, Maracaibo y Magdalena (Lundberg & Littmann 2003). A pesar de su importancia económica y ecológica, existe un gran desconocimiento sobre la taxonomía y la sistemática molecular del grupo. Adicionalmente, el género se

encuentra en estado de amenaza según categorías UICN EN (en peligro) (Salinas & Agudelo 2007).

Pseudoplatystoma, es un género monofilético de bagres neotropicales que se encuentra ampliamente distribuido en América Latina, en una amplia región del bajo Amazonas, habitando la cabecera del río y afluentes, así como en los canales, planicies de inundación y a lo largo de los arroyos de la selva lluviosa tanto en aguas corrientes como tranquilas (Barthem & Goulding 1997, Buitrago-Suárez 2006). La distribución del *Pseudoplatystoma* incluye también los ríos Orinoco, Paraná, São Francisco, Magdalena, Rupununi, Essequibo y el río Suriname. De estas especies no se encuentran reportes en las cuencas del Pacífico (Buitrago-Suárez & Burr 2007). Esta amplia distribución hace pensar a los investigadores acerca del nivel de diversidad presente a lo largo de toda su área de distribución que va más allá de una aparente homogeneidad morfológica (Buitrago-Suárez & Burr 2007)

Hasta hace poco se creía que el género *Pseudoplatystoma* se encontraba dividido en tres especies *P. corruscans* (Spix y Agassiz 1829), *P. fasciatum* (Linnaeus 1766) y *P. tigrinum* (Valenciennes 1840). A partir de la publicación realizada por la investigación de Buitrago-Suárez y Brookz, se reorganizó la clasificación en ocho especies válidas: *P. corruscans* (Spix y Gassiz 1829), *P. fasciatum* (Linnaeus 1766), *P. magdaleniatum* (Buitrago-Suarez & Burr 2007), *P. metaense* (Buitrago-Suárez & Burr 2007), *P. orinocoense* (Buitrago-Suarez & Burr 2007), *P. punctifer* (Castelnau 1855), *P. reticulatum* (Eiggenmann & Eignmann 1889) y *P. tigrinum* (Valenciennes in Cuvier and Valenciennes 1840).

Esta clasificación fue dada a partir de comparaciones anatómicas de las diferentes especies estudiadas, basándose en caracteres morfológicos como los huesos, músculos y patrones de coloración. Según esta comparación se formaron nuevos clados que se basan en la presencia o ausencia de caracteres compartidos (Buitrago-Suarez 2006). El primer clado se denomina *P. fasciatum* que incluye *P. fasciatum*, *P. punctifer*, *P. orinocoense*, *P. magdaleniatum*, *P. reticulatum* y *P. corruscan*. Con este clado *P. fasciatum* y *P. punctifer* son especies hermanas y *P. orinocoense* es hermana del clado formado por estas dos especies (Buitrago-Suárez *et al.*, 2007). El otro clado es el denominado *P. tigrinum*, que incluye únicamente a *P. tigrinum* y *P. metaense* (Buitrago-Suárez *et al.*, 2007).

Las relaciones intergenericas están bien establecidas dado que este género forma un grupo monofilético, con *Sorubim*, *Sorubimichthys*, *Hemisorubim* y *Zungaro*. De estos géneros el *Hemisorubim*, es el que presenta una relación más cerrada con *Pseudoplatystoma* (Buitrago-Suárez & Burr 2006).

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Siluriforme

Familia: Pimelodidae

Subfamilia Sorubiminae

Género: *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862

CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES QUE PERTENECEN AL GÉNERO *Pseudoplatystoma*

Las especies pertenecientes al género *Pseudoplatystoma* son reconocidas por la presencia de una cabeza deprimida dorso-ventralmente, un proceso occipital extendido que alcanza a unir las placas predorsales de la aleta dorsal posteriormente y entran en contacto con la placa pre-dorsal y una larga fontanela en la región media del cráneo. Los individuos son generalmente reconocidos con los nombres vernáculos de: “Bagre Rayado”, “Pintadillo” y en Brasil “Caparari”. Estos bagres alcanzan tallas que sobrepasan los 1.3 m. y viven en diversos hábitats como grandes ríos y lagos y bosques inundados del neotrópico (Buitrago-Suarez & Burr 2007, Burgess 1989, Reid 1983).

Son depredadores crepusculares, nocturnos o matutinos y se caracterizan por cazar sus presas en los remansos y en las proximidades de las orillas de playas donde se abrigan los peces pequeños. Sus barbillones bien desarrollados funcionan como detectores de presas en un ambiente prácticamente sin luz (De Melo *et al.*, 2005, Salinas & Agúdelo 2007). Su

fuentes de alimento lo componen las palometas (*Mylossoma sp.*), viscaíno (*Potamorhina sp.*), bocachico (*Prochilodus sp.*), agujón (*Boulengerella sp.*), nicuro (*Pimelodus sp.*), mojarra (*Aequidens sp.*), dormilones (*Hoplias sp.*), lombrices, anfibios (ranas), arañas, semillas de yavarí (*Astrocarium vulgare*), canangucho (*Mauritia flexuosa*) y estructuras vegetales de la Familia Flacourtiaceae (*Ryania sp.*) (Salinas & Agúdelo 2007). También se alimentan de miembros de su propia clase, crustáceos e incorporan en su dieta algunas frutas o semillas (Buitrago-Suárez & Burr 2007, Reid 1983).

Los individuos que pertenecen al género *Pseudoplatystoma* tienen un importante papel ecológico como depredadores en los ecosistemas donde habitan (Miranda 1997). Estas especies presentan movimientos migratorios durante su ciclo de vida que se ven afectados por los cambios ambientales asociados con la contaminación del agua y la pesca masiva que ha aumentado la preocupación por la conservación de estas especies. Varios esfuerzos se han hecho tratando de proteger las especies en los parques nacionales y propagando estas especies en cautiverio (Miranda 1997) con el propósito de producir peces para los mercados y también para hacer liberaciones en ambientes naturales y de este modo aumentar las poblaciones en los ríos (Revalde *et al.*, 2005).

Las especies de *Pseudoplatystoma* representan un valor económico considerable ya que todos se venden en los mercados de pez abiertos a lo largo de América del Sur (Buitrago-Suárez & Burr 2007). Estos peces representan una valiosa fuente de alimentación para el consumo humano y están siendo sobreexplotados en algunas regiones y es posible que la pesca desenfrenada promueva la desaparición de especies de *Pseudoplatystoma* en algunos afluentes locales de la Amazonia, Orinoco y Magdalena (Buitrago-Suárez 2006).

Es así como los individuos de este género están expuestos a una alta presión de pesca dada por la gran demanda comercial que tiene en el mercado siendo cada vez mayor la captura de juveniles, esto impide cumplir con su papel reproductivo óptimo para la madurez sexual. La cuenca del río Magdalena ya se considera como una región en peligro crítico, mientras que su situación no es menos preocupante en el resto del país pues los volúmenes de captura han disminuido substancialmente (Mojica *et al.*, 2002).

Los individuos juveniles de *Pseudoplatystoma* presentan en apariencia diferencias marcadas en relación con los adultos, al presentar patrones de coloración diferente cada uno característico de cada etapa. Su pigmentación es distintiva y presentan bandas verticales oscuras y pálidas, bandas reticuladas y manchas circulares oscuras (Brito & Bazzoli 2003).

Las especies de *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, presentan bandas oscuras extensas verticales rectas en sus lados. La aleta pectoral no presenta ninguna mancha, la aleta dorsal puede presentar o no algún tipo de mancha. La aleta adiposa presenta de 6-7 manchas grande, presenta un rango máximo de longitud de 100 cm. (Buitrago-Suárez & Burr 2007).

INVESTIGACIONES SOBRE PECES DE AGUA DULCE

Las investigaciones moleculares sobre la sistemática de los peces de agua dulce en Sur América están siendo objeto de frecuentes estudios (eg: Farias *et al.* 2001, Hrbek & Larson 1999, Orti & Meyer 1997). Sin embargo, son relativamente pocos los estudios moleculares a nivel de filogeografía intraespecifica publicados hoy día (Hrbek & Larson 1999, Lovejoy & Araújo 2000, Sivasundar *et al.*, 2001).

Los análisis de filogenias a nivel de especies son esenciales para la reconstrucción de eventos filogeográficos y para comprender los procesos de especiación dentro de un contexto geográfico. Así mismo, los estudios intra-específicos de diversidad genética particularmente con referencia geográfica (filogeografía intra-especifica) proveen acerca de la estructura poblacional, flujo genético y especiación insipiente, dentro del rol de la geografía. Al unir las filogenias intra-específicas e inter-específicos el enfoque puede brindar información sobre hibridaciones e introgresiones, especies limítrofes y descubrir especies crípticas y polimórficas (Lovejoy & Araújo 2000).

Los datos de las secuencias de ADN proveen información sobre las relaciones filogenéticas y las distancias genéticas entre linajes evolutivos y permite hacer deducciones con respecto a la historia individual de taxones dentro de una región determinada (Bermingham *et al.*, 1996).

Por otro lado, los estudios biogeográficos en peces de agua dulce pueden ser empleados en la comprensión de los cambios históricos y los patrones de drenaje de los ríos, debido a que fisiológicamente los peces están restringidos a hábitats acuáticos y están directamente sujetos a aislamientos por barreras terrestres menores. De este modo, en las especies y en las poblaciones filogenéticas de peces es posible conocer el registro de las conexiones históricas y de los aislamientos de sistemas hídricos en una variada escala geográfica de tiempo y espacio (Willis *et al.*, 2007). Debido a que la distribución geográfica de las especies de *Pseudoplatystoma*, abarcan los principales drenajes de América del Sur, donde como consecuencia de los procesos geomorfológicos y fisiográficos han transformado drenajes fluviales de América del Sur a través de todo el Mioceno y el Plioceno, estos fenómenos naturales, generan una varianza secundaria de las poblaciones naturales (Montoya-Burgos 2003, Albert *et al.*, 2006, Lovejoy & Araujo 2000, Renno & Hubert 2006; Hubert *et al.*, 2007, Willis *et al.*, 2007) Este hecho ha fomentado una evaluación completa de los caracteres morfológicos y anatómicos en el género *Pseudoplatystoma* (Buitrago-Suárez 2006, Buitrago-Suárez & Burr 2007).

CONSIDERACIONES SOBRE DIVERSIDAD GENÉTICA EN PECES

Diversidad o variabilidad genética corresponde a la diferencia de alelos dentro de una población o especie, es dividida en variación intra e inter poblacional y bajo ambas connotaciones es importante el punto de vista conservacionista (Frankham *et al.*, 2002). Comprender acerca de este tipo de variación en peces de agua dulce es fundamental para descubrir la manera en que las poblaciones naturales están estructuradas genéticamente (Carvalho & Galletti 2008, Gallo & Díaz-Sarmiento 2003).

La ictiofauna neotropical y especialmente la colombiana presentan un estado muy pobre de conocimiento lo que crea barreras para el análisis y comparación poblacional. En ese sentido, estudios que contemplen la ictiofauna de las cuencas Colombianas, son importantes porque permiten establecer y aclarar sobre los procesos históricos involucrados en la evolución de los peces de agua dulce (Carvalho & Galleti 2008).

Entre los representantes de esta rica ictiofauna se destacan los bagres (Orden Siluriformes), un grupo diverso con más de 300 especies (Eschmeyer *et al.*, 2004). Estos peces están siendo objeto de estudios ecológicos y evolutivos principalmente biogeográficos en diferentes escalas, por su importancia económica y amplia distribución en ambientes neotropicales dulceacuícolas (Carvalho & Galleti 2008).

MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son definidos como cualquier fenotipo molecular oriundo de un gen que es expresado a partir de un segmento de ADN (Ferreira & Grattapaglia 1996). El uso de las técnicas moleculares desarrolladas hasta el día de hoy, han permitido evaluar varios aspectos genéticos de las especies silvestres, como la variación genética de poblaciones disminuidas demográficamente, la existencia de flujo génico entre poblaciones, la estructura genética y la definición de unidades genéticas para conservación (Lamprea *et al.*, 2004, Smith & Wayne 1996).

La importancia de los marcadores moleculares, radica en que estos fragmentos de ADN (codificante y no codificante) ofrecen la posibilidad de estudiar las poblaciones de organismos a nivel genético para seleccionar aquellas que presentan rasgos de interés para la conservación. Las frecuencias genotípicas obtenidas a partir de diferentes marcadores pueden proporcionar información sobre la identificación sistemática de las especies, la estructura de las poblaciones, la hibridación y el flujo de genes, entre otras (Ferreira & Grattapaglia 1998).

GENES NUCLEARES Y MITOCONDRIALES

Los genes nucleares y mitocondriales son constituyentes esenciales de la fisiología celular de cualquier organismo y algunos de ellos actúan en los procesos de síntesis de proteínas. Estas secuencias de ADN, presentan diferencias evolutivas que son el reflejo de la cantidad de variación presente a nivel de la secuencia de nucleótidos. Además, se ha demostrado que ciertas regiones de estos genes presentan una tasa de conservación significativa, incluso entre especies filogenéticamente distantes (Willis *et al.*, 2007). Por otro lado, el ADN presente en organelos de las células como la mitocondria está constituido por genes de copia única que codifican para proteínas que son esenciales para el buen desempeño en las funciones como degradación de azúcares, grasas y en procesos de respiración celular. En la expresión génica mitocondrial se presentan ciertas características como: herencia uniparental generalmente de tipo materna y la ausencia de recombinación. Las altas tasas evolutivas presentes en el genoma de la mitocondria comparadas con el genoma nuclear, hacen que este componente genético sea una herramienta importante en estudios poblacionales (Willis *et al.*, 2007)

DNA MITOCONDRIAL

El ADN mitocondrial (mtADN) se caracteriza por presentar rápidas tasas de evolución lo que permite la detección de diferenciación genética en distancias geográficas relativamente pequeñas y corta escala de tiempo evolutivo (Avice *et al.*, 1998). Su estructura es bien conocida, no posee intrones, pseudogenes y transposones por lo tanto la detección de diferencias entre los haplotipos de mtADN en este nivel taxonómico facilita la comparación inter e intra poblacional (Avice *et al.*, 1987, Frankham *et al.*, 2002). Es una herramienta molecular empleada comúnmente para inferir sobre los procesos evolutivos de las poblaciones y especies en áreas de estudio como la ecología molecular y fitogeografía (Ballard & Whitlock 2004).

El mtADN posee herencia materna y normalmente no sufre recombinación (Matioli 2001). Su tasa de mutación media puede ser mayor que las secuencias nucleares de copia única, lo

que puede explicar su alto polimorfismo intra e interespecifico (Fernández 2008). La mayoría de sus variaciones son generadas por substitución de pequeños fragmentos originadas por inserciones o deleciones, el orden de genes es altamente conservado a lo largo cortos periodos evolutivos, además dependiendo del tejido cada célula tiene múltiples copias de un único genoma mitocondrial, lo que ofrece una técnica fácil de obtención (Avise 2000, Avise *et al.*, 1987, Frankham *et al.*, 2002, Hillis *et al.*, 1996.)

Gen Citocromo b (Cyt b)

El gen del Citocromo b, representa uno de los genes más utilizados en estudios de filogenia probablemente por ser el gen mitocondrial cuya estructura y función tiene mayor conocimiento (Esposti *et al.*, 1993, Avise *et al.*, 1987). Este gen, contiene una región conservada y una región variable, de este modo estas regiones han sido ampliamente utilizadas en los estudios de peces (Martín & Bermingham 1998). Adicionalmente sus secuencias presentan diferentes tasas evolutivas (e.g., Meyer & Wilson 1990, Irwin *et al.*, 1991, Normark *et al.*, 1991, Cantatore *et al.*, 1994; Lydeard & Roe 1997, Kumazawa & Nishida 2000, Farias *et al.*, 2001) lo que hace de este gen un idóneo marcador molecular en estudios de diversidad y sistemática molecular.

DNA NUCLEAR

El producto de una proteína de origen nuclear está formada por dos grupos de secuencias: intrones y exones. Los intrones representan las regiones de las secuencias nucleotídicas no codificantes, es decir que no se traducen a una proteína funcional. Los intrones deben eliminarse del pre-mRNA para que el transcrito pueda convertirse en mRNA maduro. La parte de los genes que corresponde al RNA maduro y que tiene secuencias de nucleótidos codificantes se llaman exones (Russell 1992). En los marcadores nucleares el número efectivo en términos de polimorfismo genético es cuatro veces mayor que los marcadores citoplasmáticos (DNA mitocondrial y DNA de cloroplasto) porque son de carácter diploide y

biparental. De esta forma, el tiempo de coalescencia para marcadores nucleares es cerca de tres veces mayor de que marcadores mitocondriales (Hare 2001).

Gen S7

El gen S7 es un gen nuclear que codifica para la proteína ribosomal S7 que constituye una única copia nuclear de tipo funcional (Annilo *et al.*, 1995). Este gen estructuralmente se encuentra conformado por siete exones que así mismo están separados por seis intrones (Annilo *et al.*, 1998). Es un gen altamente conservado en organismos vertebrados y la longitud de los intrones varía considerablemente principalmente en el primer intron (PP1) que posee secuencias degenerativas y que además compromete procesos de evolución cuantificables (Cecconi *et al.*, 1994, 1996, Lavoué *et al.*, 2003). Estudios reportados por Chow & Hazama (1998) utilizan este gen S7 en especies de peces distantes para determinar su versatilidad a nivel de diferenciación en los fragmentos amplificados.

Gen RAG 1

El gene nuclear Rag1, que activa la recombinación (Rag1), es reconocido por presentar una tasa de evolución moderada (Lechtova 2007). El gen Rag 1, es una única copia del gen de aproximadamente 3120 pares de bases que consta de un único exón, donde el tercer codón forma la región divergente y parece no estar directamente involucrado en la interacción funcional con el ADN, adicionalmente posee una alta tasa de sustitución (Fugmann *et al.*, 2000, Scott *et al.*, 2003). Estructuralmente está constituido por dos intrones, los cuales parecen sufrir menos restricciones selectivas, pues es posible alterar en gran parte sus secuencias sin afectar la función del gen (Hassan *et al.*, 2002). Los dos intrones acumulan mutaciones rápidamente y frecuentemente presentan una alta variabilidad genética, incluyendo polimorfismo de tamaño. Este gen representa un marcador útil para analizar aspectos que van desde la estructura poblacional hasta la reconstrucción de relaciones entre especies estrechamente relacionadas (He & Haymer 1997).

3. Formulación del problema y justificación

3.1. Formulación del problema

Durante cerca de 200 años, los científicos han investigado acerca de los muchos aspectos biológicos, genéticos, evolutivos, taxonómicos y fisiológicos de las especies de plantas y animales que habitan nuestro planeta (Buffon 1761, Candolle 1820, Darwin 1859, Darlington 1957, Wallace 1894). Los resultados de los fósiles encontrados tienen una estrecha relación de términos de espacio y tiempo y esto ha permitido la comparación biogeográfica dada la diversidad encontrada en los organismos (Wegener 1966).

En Colombia son aún escasos los estudios de diversidad genética de especies endémicas importantes y especialmente cuando se trata de los peces (Lamprea *et al.*, 2004). El estado de la información genético-poblacional actual de la ictiofauna neotropical se convierte en una limitante para establecer análisis comparativos de poblaciones de peces Colombianos. En este sentido, aquellos estudios que contemplen la ictiofauna de las cuencas hidrográficas Colombianas son importantes, porque ayudarían a esclarecer los procesos históricos de la evolución de los peces de agua dulce.

Para el género *Pseudoplatystoma*, los estudios respecto a la sistemática son limitados en gran parte por la carencia de análisis taxonómicos que permitan delimitar las especies pertenecientes a este género y porque adicionalmente su taxonomía es confusa y no existe acuerdo en el número de especies presentes (Burgués 1989). Hace menos de una década el género *Pseudoplatystoma* se encontraba dividido en 3 especies *P. corruscans*, *P. fasciatum* y *P. tigrinum*. Pero a partir de los reportes realizados por Buitrago-Suárez y Brooks (2007) se reorganizó la clasificación en ocho especies válidas: *P. corruscans*, *P. fasciatum*, *P. magdaleniatum*, *P. metaense*, *P. orinocoense*, *P. punctifer*, *P. reticulatum*, y *P. tigrinum* (Buitrago-Suárez & Brook 2007). No obstante, continúa siendo escasa la información que se tiene sobre estas especies, debido a que su separación es reciente y en adición son pocos los estudios genéticos que se han realizado sobre este género (Carvalho & Galleti 2008).

3.2. Pregunta de investigación

¿Existe una divergencia genética significativa entre los individuos pertenecientes a la especie *Pseudoplatystoma magdaleniatum* colectados en dos regiones de la cuenca hidrográfica del Río Magdalena en Colombia?

3.3. Justificación de la investigación

El río Magdalena es uno de los ríos más importantes dentro del sistema hidrográfico de Colombia, no solo porque permite el transporte fluvial, sino porque constituye una de las principales fuentes de la industria pesquera en el país. El género *Pseudoplatystoma* es uno de los géneros de peces de mayor consumo nacional, así mismo se convierte en uno de los recursos de mayor explotación pesquera que a largo plazo podría generar su extinción como consecuencia de una pesca indiscriminada sin control. Estas son razones que argumentan el estudio genético del género *Pseudoplatystoma*, especialmente aquellas investigaciones que contribuyan a la formulación de estrategias para la conservación y buen uso de las especies.

En este sentido, el estudio del comportamiento genético a través del empleo de herramientas moleculares nos permitió profundizar sobre la dinámica poblacional, sobre los procesos evolutivos que desarrollan las poblaciones en su hábitat natural y en adición la comprensión de los procesos ecológicos y evolutivos. Con base en lo anterior, el presente estudio preliminar, plantea la caracterización genética de la especie *Pseudoplatystoma magdaleniatum* utilizando el gen mitocondrial del Citocromo b y dos genes nucleares Rag 1 y S7, para determinar las características genéticas de estas especies con el fin de aportar conocimiento a futuros estudios de conservación.

En estudios recientes se ha demostrado que independientemente de la verificación de los resultados filogeográficos basados en mtADN, se requieren análisis de un gen neutral de la región de ADN nuclear (Morrison *et al.*, 2006). Las técnicas moleculares basadas en fragmentos de ADN (mtADN o nADN) representan novedosas herramientas para el desarrollo de estudios que nos permitan conocer acerca de la variabilidad genética de

poblaciones naturales en las especies de peces (Nielsen *et al.*, 1997, Bielawski & Puma 1997, Pérez- Enrique *et al* 1999, Koh *et al.*, 1999, Iguchi *et al.*, 1999, Sivasundar *et al*, 2001).

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Caracterizar genéticamente la especie *Pseudoplatystoma magdaleniatum* proveniente del río Magdalena, mediante el uso de un gen mitocondrial citocromo b y dos genes nucleares: Rag 1 y S7.

4.2. Objetivos específicos.

- Evaluar los marcadores moleculares Citocromo b, Rag 1 y S7 como secuencias informativas y específicas para la caracterización genética de la especie *P. magdaleniatum*.
- Caracterizar genéticamente las poblaciones de *Pseudoplatystoma* mediante métodos de distancia y de máxima parsimonia.
- Analizar las relaciones filogenéticas de *P. magdaleniatum* con otras especies de *Pseudoplatystoma*.

5. Materiales y métodos

5.1. Diseño de la investigación.

El presente proyecto es un trabajo de investigación básica experimental. El factor de diseño es el tipo de marcador molecular, los niveles del factor de diseño son marcador nuclear y marcador mitocondrial. La variable de respuesta es la estructura poblacional, la unidad de

respuesta es cada individuo dentro de la población y la unidad de muestreo es cada individuo dentro de la población.

5.1.1. Población de estudio y muestra.

Se trabajó con 7 individuos que pertenecen a la especie de *P. magdaleniatum*, tomando dos importantes puntos de muestreo (**Figura 1**). La primera captura se realizó en la ciudad de Honda departamento del Tolima ubicada en la coordenada 2°59'55" N, 75°18'16" O y a 437 metros sobre el nivel del mar y la segunda captura se realizó en Gamarra, departamento del Cesar, con coordenadas geográficas de 8°19'45" N, 73°44'53" y a 37 metros sobre el nivel del mar.

Las especies de *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, presentan bandas oscuras extensas verticales rectas en sus lados. La aleta pectoral no presenta ninguna mancha, la aleta dorsal puede presentar o no algún tipo de mancha. La aleta adiposa presenta de 6-7 manchas grande. Presenta un rango máximo de longitud de 100 cm. (Buitrago-Suárez & Brook 2007).

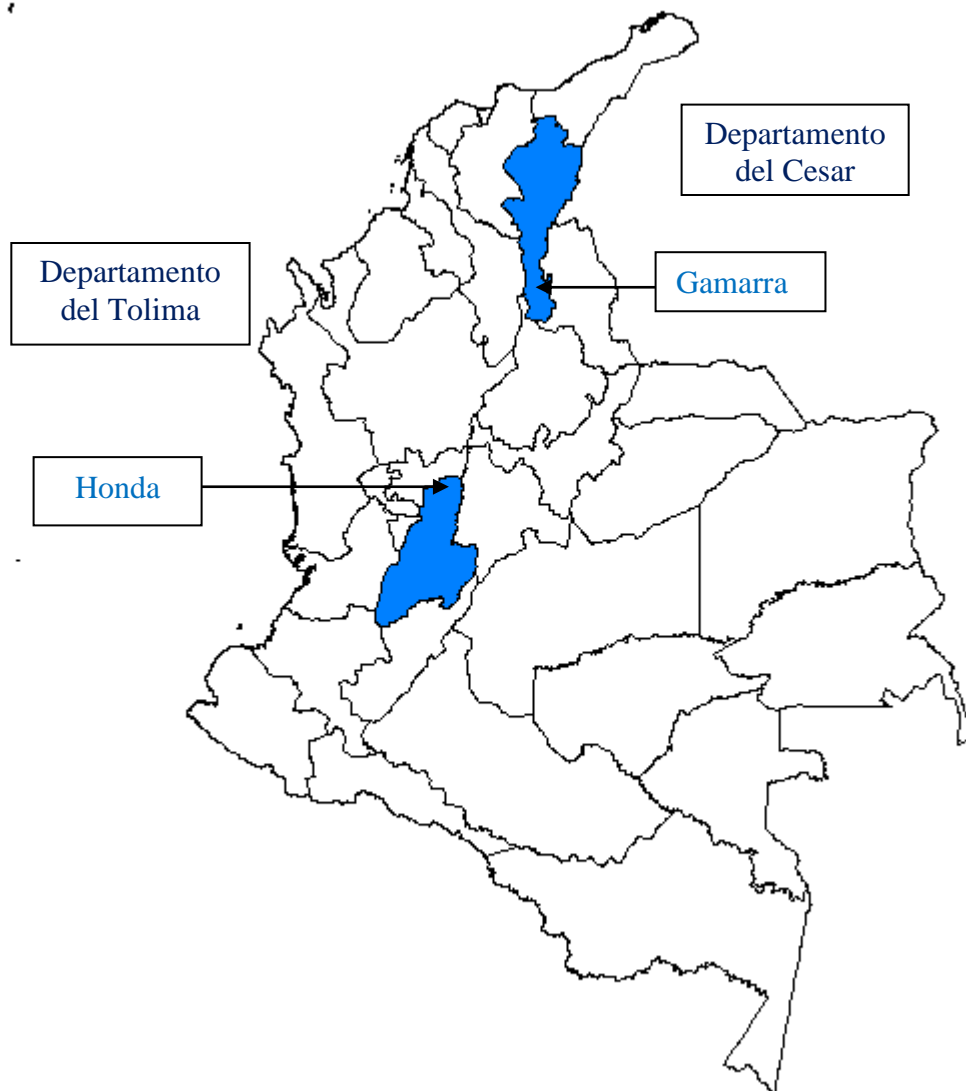


Figura 1. Mapa de Colombia, resaltando en color azul, los dos departamentos y los sitios específicos donde se realizó la captura de los individuos de *Pseudoplatystoma magdaleniatum*.

Los individuos fueron colectados mediante una atarraya por los pescadores de la región. Después de capturados, de cada uno de los individuos se cortó un fragmento de músculo de

aproximadamente 0.5 cm.de longitud y las muestras fueron preservadas en etanol al 100%, refrigeradas, llevadas al laboratorio y a partir de estas se realizó la extracción de ADN.

Para el estudio de las poblaciones de bagres se realizó la extracción del ADN mediante el protocolo del Método de Tampón Salino (Aljanabi & Martínez 1997) con algunas modificaciones (**Anexo 1**).

Luego de extraerse el ADN se efectuó una electroforesis con un gel de agarosa al 1% para verificar la calidad del ADN extraído y también se utilizó para cuantificar la cantidad de ADN en nano gramos/micro litros obtenidos de cada uno de los individuos con los cuales se trabajó.

5.1.2. Variables del estudio.

Variable Independiente: Especie *Pseudoplatystoma Magdaleniatum*

Variable Dependiente: Diferencias de nucleótidos y de haplotipos identificados.

5.2 Métodos

Amplificación de Genes

Se hizo la amplificación de los tres genes (Citocromo b, Rag 1 y S7) de interés por medio de la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR). Todas las reacciones de amplificación se realizaron con el Equipo (PTC-100 TM) MJ Research INC. Posterior a la amplificación todos los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio y utilizando marcador de peso molecular (1kb plus).

Amplificación del Gen del Citocromo b (Cyt b)

La amplificación del DNA en una región de aproximadamente 800 pares de bases del gen mitocondrial Citocromo b se realizó con el siguiente programa: una denaturación inicial por 5 min. a 95°C; seguida de 35 ciclos de tres pasos: denaturación inicial por 35 segundos a 94°C, seguida de alineamiento por 40 segundos a 49°C y finalmente, extensión por 40 segundos a 72°C y terminando con una extensión por 5 minutos a 72 °C (Calcagnotto *et al.*, 2005).

La mezcla de reacción para PCR contiene 0.3 U de Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 1.25 mM de dNTP, 0.75 µM de 10x PCR Buffer Minus Mg, 1.75 mM de MgCl₂, 1,25 de cada iniciador y 50 ng de ADN, en un volumen final de 30 µl. Las secuencias de los iniciadores son: corriente arriba, 5' Glud G` AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAG 3' (Palumbi *et al.*, 1991 y Irwing *et al.*, 1991) y corriente abajo, 5' TGA CTTGAARAACCA YCGTTG 3' (Kocher *et al.*, 1989).

Amplificación del Gen RAG 1

La amplificación de ADN en una región de 660 pares de bases del gen nuclear Rag 1 se realizó con el programa para la amplificación: denaturación inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos constituidos de denaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 35 segundos, extensión a 72°C por 40 segundos y elongación fina a 72°C por 5 minutos descrito por (Calcagnotto *et al.*, 2005).

La mezcla de reacción para PCR contiene 0,3 U de Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 4 µl de 1.25 mM de dNTP, 0.75 µM de 10x PCR Buffer Minus Mg, 1.75 mM de MgCl₂, 2 µl de 10 pmol de cada uno de los iniciadores y 50 ng de ADN en un volumen final

de 30 μ l. Las secuencias de los iniciadores fueron: corriente arriba, 5`GCTGGCAGACAAGTGGATCT3`` (Carvalho, datos no publicados) y corriente abajo, 5`AGGCCATCTAGAAGCCTTGC3`` (Carvalho, datos no publicados).

Amplificación del Gen S7

La amplificación del ADN en una región de 600 pares de bases del gen nuclear S7 se realizó según lo describe Chow S & Hazama K (1998) con algunas modificaciones, el cual tiene una denaturación inicial de 94°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de amplificación (denaturación a 95°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 1 minuto, y una extensión a 72°C por 2 minutos) con una extensión final de 72°C por 10 minutos.

La mezcla de reacción para PCR contiene .5 U de Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 10 mM dNTP mezcla, 10x PCR Buffer Minus Mg, 2 mM de $MgCl_2$, 10 pmol de cada iniciador (corriente arriba y corriente abajo) y 50 ng de ADN, en un volumen final de 30 μ l. Las secuencias de los iniciadores fueron: corriente arriba (S7RPEX1F) 5'-TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC-3' (Chaow & Hazama 1998) y corriente abajo (S7RPEX2R) 5'-AACTCGTCTGGCTTTTCGCC-3' (Chaow & Hazama 1998).

Purificación del producto de Amplificación

Se utilizó el protocolo de purificación polietilenoglicol (PEG) de Lis J & Schleif (1995) con algunas modificaciones, con el fin de remover los restos de iniciadores y dNTPs restantes de la reacción de PCR (**Anexo 2**).

Secuenciamiento de los genes

Un volumen de 20 µl de cada uno de los 7 productos de PCR obtenidos con los tres marcadores provenientes de individuos de *P. magdaleniatum* fueron enviados a la empresa Magrogen Inc Corea, donde se realizó la secuenciación utilizando el equipo MegaBACE 1000, GE Healthcare (antiga Amersham Biosciences). Las reacciones de secuenciamiento se realizaron de acuerdo con el protocolo para el MegaBACE 1000, utilizando el DYEnamic ET Dye Terminator Kit (con Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). Adicionalmente fueron empleados en las comparaciones de las secuencias.

5.2.1 Análisis de información

Análisis estadístico

Las 7 secuencias obtenidas con los tres marcadores provenientes de 7 individuos de *P. magdaleniatum*, fueron llevadas a la herramienta BLASTX, de Altschul [*et al*] (1990) para comparar con la secuencias presentes en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Las secuencias fueron editadas, alineadas y verificadas por el análisis individual de sus electroferogramas con el fin de minimizar los posibles errores de alineamiento y diferencias entre las secuencias que no fueran reales. El alineamiento fue realizado con el programa ClustaW (Tompson *et al.*, 1997) presente en BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999).

A partir de los fragmentos de 800 pares de bases para el gen del Citocromo b, 660 pares de bases para Rag 1 y 660 pares de bases para el gen S7, fueron analizadas las composiciones nucleotídicas en términos de porcentaje para cada una de las bases A, T, C y G determinando la frecuencia de cada par nucleotídico, ii: pares idénticos, si: pares transicionales, sv: pares transversionales, R: radio transición/tranvesion, a través del programa Mega 3.1 (Kumar *et al*, 2004)

Con las secuencias debidamente alineadas, se realizó el análisis de diversidad del ADN utilizando el programa DnaSP Rozas J *et al.*, (2003). Se analizó el número de haplotipos (h), su distribución entre las poblaciones, la diversidad haplotípica (H), la diversidad nucleotídica (π) y el número medio de diferencias nucleotídicas (k).

El desvío de la premisa de neutralidad selectiva fue verificado por medio de las pruebas de Tajima (Tajima 1989), F^* y D^* (Fu & Li 1993), incorporados en el programa DNASP 4.50 (Rozas & Rozas 1999).

Análisis Filogenéticos

Las relaciones entre los individuos de *P. magdaleniatum* y el grupo externo fueron dilucidadas a través de árboles de filogenia empleado el método de distancias genéticas implementado en Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), bajo los supuestos de UPGMA y se obtuvieron los respectivos árboles consenso por la distancia de 2 parámetros de Kimura1 (1980) (Vásquez 2001).

6. Resultados

Los resultados obtenidos de las secuencias parciales de los tres genes utilizados en el análisis molecular de la especie *P. magdaleniatum* se presentan a continuación:

Gen del Citocromo b (Cyt b)

Los resultados de la caracterización del polimorfismo del gen mitocondrial Citocromo b, amplificado en 7 individuos de la especie *P. magdaleniatum* se presentan en la **Tabla 1**. En

las secuencias se identificaron 10 de sitios polimórficos, 10 mutaciones, un número medio de diferencias nucleotídicas pareadas (k) de 4,09524, una diversidad nucleotídica con un valor de (Pi) 0,00512 y diversidad haplotípica de (Hd=1,00). Estos valores sugieren cierto grado de diversidad genética entre los individuos muestreados. No obstante, el limitado número de individuos empleados en el análisis obliga a una interpretación cautelosa de las estimaciones de diversidad poblacional.

Tabla 1. Resultados del análisis de diversidad de la secuencia del Gen Citocromo b.

Población	(S)	(Eta)	(h)	(Hd)	(Vda)	(π)	(k)
<i>P. magdaleniatum</i>	10	10	7	1,00	0,00583	0,00512	4,09524

S: número de sitios segregantes. Eta número de mutaciones, h: número de haplotipos, Hd: diversidad haplotípica, (Vda): Varianza de la diversidad haplotípica, π: diversidad nucleotídica y k número promedio de diferencias nucleotídicas.

Las secuencias corresponden a siete haplotipos distintos denominados como (*singletons*), que mostraron una diversidad haplotípica de 1,0 con valor de razón transición/transversión de 2,9.

En la **Tabla 2**, se presentan los resultados de las frecuencias nucleotídicas por pares de bases de los 7 individuos estudiados de *P. magdaleniatum*. La composición nucleotídica encontrada en las secuencias de *P. magdaleniatum* para el gen del Citocromo b son las siguientes: Timina 29,5%, Citocina 14,4%, Adenina 25,3% y Guanina 30,7%. Estos datos son analizados con base en la relación que se establece entre los pares de cambios dados por transiciones y transversiones a lo largo de las secuencias, estos valores pueden ser comparados con resultados obtenidos en estudios realizados con el gen del Citocromo b para diferentes taxas donde se observa proporciones similares a las encontradas en este estudio lo que nos permite sugerir cierto grado de similitud entre las frecuencias nucleotídicas entre los peces (Meyer 1993, Avise & Walked 1998).

En las dos primeras posiciones el valor de R es superior a 1.0 y en la tercera posición no se observa ninguna R, lo que sugiere que las transversiones en tercera posición no son indicadores confiables para establecer relaciones evolutivas (Izeni *et al.*, 2001).

Tabla 2. Frecuencia nucleotídica por pares de bases para los individuos de *P. magdaleniatum* con el gen del Citocromo b.

	ii	si	sv	R	TT	TA	CT	CC	CG	AC	AA	AG	GC	GA	GG	Total
						TC	TG		CA	AT			GT			
Avg	796	3	1	2.9	236	0	0	115	0	0	201	1	0	1	244	800
1st	265	1	0	2.4	123	0	0	13	0	0	26	1	0	1	103	267
2nd	265	1	1	2.0	54	0	0	28	0	0	114	0	0	0	69	267
3rd	265	1	---		59	0	0	74	0	0	60	1	0	0	72	266

ii: pares idénticos; si: pares transicionales; sv: pares transversionales; R:si/sv

Los valores obtenidos al aplicar el test de neutralidad para los individuos de *P. magdaleniatum*, basados en los estadísticos de Tajima, Fu and Li's D y Fu and Li's F se presentan en la **Tabla 3**. En todos los casos, no se encontró evidencias de selección afectando esas secuencias.

Tabla 3. Resultados del Test de Neutralidad para los 7 individuos de *P. magdaleniatum*.

	Valor del Test	Probabilidad	Significancia estadística
Tajima's D	0,01789	P > 0.10	Estadísticamente No significativo
Fu and Li's D*	-0,07744	P > 0.10	Estadísticamente No significativo
Fu and Li's F	-0,06148	P > 0.10	Estadísticamente No significativo

Relaciones Filogenéticas para el Gen Citocromo b

A partir de los datos de la composición nucleotídica, fueron elaborados árboles de filogenia basados en diferentes tipos de distancias genéticas entre las correspondientes secuencias de Citocromo b. De este modo, se utilizaron los métodos de UPGMA (**Figura 2**) y Máxima Parsimonia (**Figura 3**), con la distancia de 2 parámetros de Kimura (1980).

En el árbol filogenético representado en la (**Figura 2**) se observan 3 clados bien definidos con altos valores de bootstrap. El primero de ellos conformado por los individuos que pertenecen a la especie de *P. magdaleniatum* con un valor de bootstrap de 100%. El segundo clado está constituido por los individuos *P. corruscan* con un valor de bootstrap de 100% que los separa del resto de individuos. Finalmente el último clado lo conforman los individuos de Amazonas, Maranhao y Paraguay con un bootstrap de 100% definido como un tercer grupo separado en términos de distancia genética.

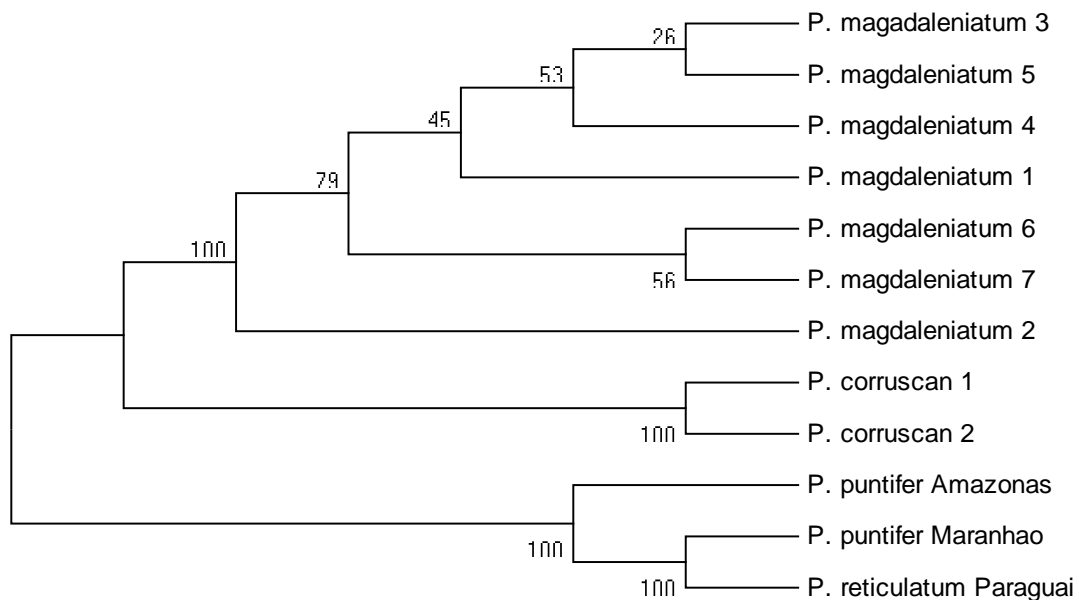


Figura 2. Árbol construido con el método UPGMA con Bootstrap (500 réplicas) y modelo Nucleotide Kimura2 parameter para el gen citocromo b comparando por distancias genéticas los individuos de *P. magdaleniatum* con el grupo externo: *P. corruscan*, *P. punctifer* provenientes de Amazonas y Maranhão y *P. reticulatum* proveniente de Paraguay

Se construyó un segundo árbol aplicando el método de Máxima Parsimonia (**Figura 3**) y se observa la formación de 3 clados diferentes en comparación con el método de UPGMA. El primero grupo integrado por los individuos que pertenecen a la especie de *P. magdaleniatum*

con un bootstrap de 99%, definido como un valor alto, lo que representa la separación de este grupo del resto de individuos estudiados. El segundo clado lo conforman los individuos de Amazonas, Maranhao y Paraguay agrupados con un valor de bootstrap de 99%, un último grupo de individuos de *P. corruscan* 1 y 2 se separan completamente de los otros individuos.

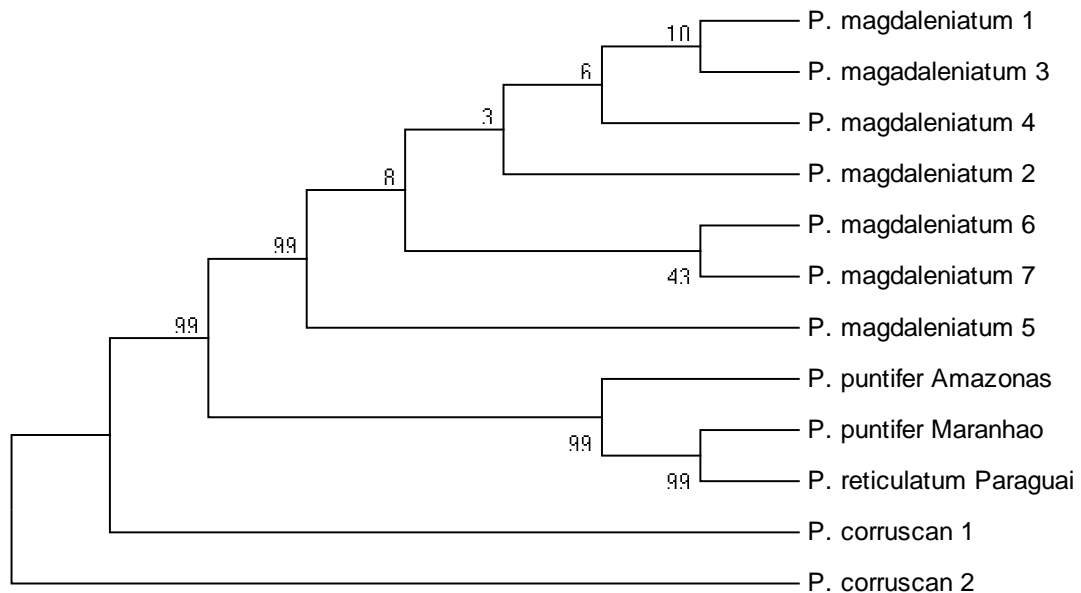


Figura 3. Árbol construido con el método Máxima Parsimonia con Brootstrap (500 replicas) y el modelo Nucleotide Kimura2 parameter para el gen citocromo b, comparando por distancias genéticas los individuos de *P. magdaleniatum* con el grupo externo: *P. corruscan*, *P. punctifer* provenientes de Amazonas y Maranhão y *P. reticulatum* proveniente de Paraguay

Al utilizar los dos métodos de construcciones filogenéticas de UPGMA y Máxima Parsimonia se observa una clara separación de los individuos de la especie de estudio, *P. magdaleniatum* con respecto a los individuos del grupo externo. Adicionalmente, se observa que ambos árboles presentan valores altos para bootstrap, lo que nos genera un grado mayor de confiabilidad, dado que los valores se encuentran entre 99 % y 100%.

Resultados del Gen RAG 1

Los análisis del intrón Rag 1 fueron obtenidos a partir de una secuencia parcial de 766 pares de bases amplificada en los 7 individuos pertenecientes a la especie *P. magdaleniatum*. En las secuencias se encontraron 5 haplotipos representados en la **Tabla 4**, los haplotipos fueron definidos por 9 sitios polimórficos segregantes (S), 3 sitios parsimoniosamente informativos y 5 mutaciones (n).

Los estimadores de polimorfismo y de diversidad genética presentados en la **Tabla 4**, muestran el numero de sitios polimórficos (segregantes) con un numero de 5 mutaciones, un valor medio de diferencias nucleotídicas pareadas (k) de 3,429 un valor de diversidad nucleotídica (Pi) 0,00451 y una diversidad haplotipica de (Hd=0,905). Los resultados sugieren un bajo valor de diversidad genética para el gen del Rag1.

Tabla 4. Resultados del análisis de diversidad de la secuencia del intrón Rag 1.

Población	(S)	(Eta)	(h)	(Hd)	(Vda)	(Pi)	(k)
<i>P. magdaleniatum</i>	3	9	5	0,905	0,01067	0,00451	3,429

S: número de sitios segregantes, Eta número de mutaciones, h: número de haplotipos, Hd: diversidad haplotipica, (Vda): Varianza de la diversidad haplotipica, π : diversidad nucleotídica y k número promedio de diferencias nucleotídicas

Adicionalmente, en la **Tabla 5** se presentan los resultados de las frecuencias nucleotídicas por pares de bases para los 7 individuos estudiados de la especie *P. magdaleniatum*. Los valores porcentuales de la composición nucleotídica para todas las secuencias fueron de: Timina 29%, Citosina 19.2%, Adenina 30.9% y Guanina 20.9%.

Al considerar la composición nucleotídica de las secuencias del intrón Rag1 para los individuos de *P. magdaleniatum* se encontró un total de 7 transiciones y 7 transversiones y un valor de R transición/transversión de 1, estos datos son presentados en la **Tabla 5**. En la primera posición se observan 2 transiciones y 1 transversión con un valor de R de 1,5 y en la segunda posición se observa el mayor número de transiciones y transversiones con 3 para los dos, presentando un radio de 1. En la tercera posición se observa que el valor de transición es de 2 y la transversión es de 3 mostrando un radio de 0,7.

Tabla 5. Resultados de la Frecuencia nucleotídica para los individuos de *P. magdaleniatum* con el gen Rag 1.

	li	si	sv	R	TT	TC	TA	CT	CC	CG	AT	AC	AA	AG	GC	GA	GG	Total
							TG			CA				GT				
Avg	760	2	1	2	218	1	0	1	142	0	1	0	237	1	0	1	163	764,4
1st	254	1	--	--	66	0	0	0	46	0	0	0	82	0	0	0	60	254,4
2nd	254	0	0	0	78	0	0	0	41	0	0	0	82	0	0	0	53	254
3rd	253	1	1	1,7	74	1	0	0	55	0	0	0	73	0	0	0	50	255

ii: pares idénticos; si: pares transicionales; sv: pares tranversionales; R:si/sv

Los índices negativos obtenidos con el de Fu and Li's y Tajima's (**Tabla 6**) para el intrón Rag 1 en los individuos de *P. magdaleniatum* podrían estar indicando un exceso de variantes en baja frecuencia. Esto es debido posiblemente a la presencia de mutaciones nuevas como un indicador de expansión de la población. Sin embargo, no se alcanzó un valor estadísticamente significativo, luego no se puede concluir ningún efecto de selección o expansión poblacional en las secuencias estudiadas.

Tabla 6. Resultados obtenidos del Test de neutralidad para los individuos de *P. magdaleniatum* para el gen Rag 1.

	Valor del Test	Probabilidad	Significancia estadística
Tajima's D	-0,35433	P > 0.10	Estadísticamente no significativo
Fu and Li's D*	-0,61333	P > 0.10	Estadísticamente no significativo
Fu and Li's F	-0,60809	P > 0.10	Estadísticamente no significativo

Relaciones Filogenéticas para el Gen Rag1

A partir de los datos de la composición nucleotídica fueron elaborados los árboles de filogenia basados en diferentes tipos de distancias genéticas entre las secuencias del gen

Rag 1. Se utilizaron los métodos UPGMA (**Figura 3**) y Máxima Parsimonia (**Figura 4**) con la distancia de 2 parámetros de Kimura (1980).

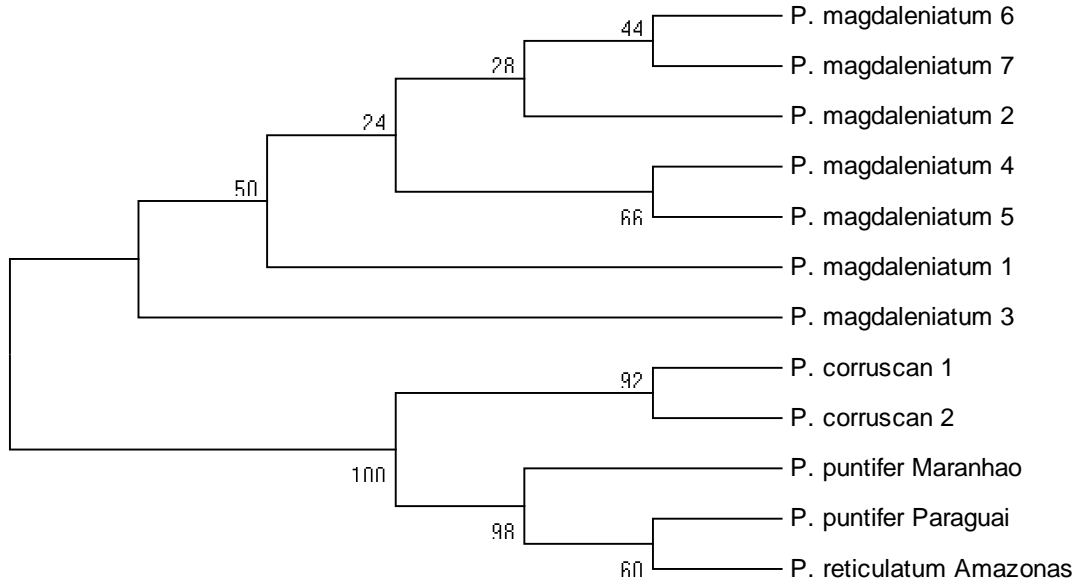


Figura 4. Árbol construido con el método UPGMA con Brootstrap (500 replicas) y modelo de Nucleotide Kimura2 parameter, para el gen Rag 1 comparando por distancias genéticas los individuos de *P. magdaleniatum* con el grupo externo: *P. corruscan*, *P. puntifer* provenientes de Amazonas y Maranhão y *P. reticulatum* proveniente de Paraguai

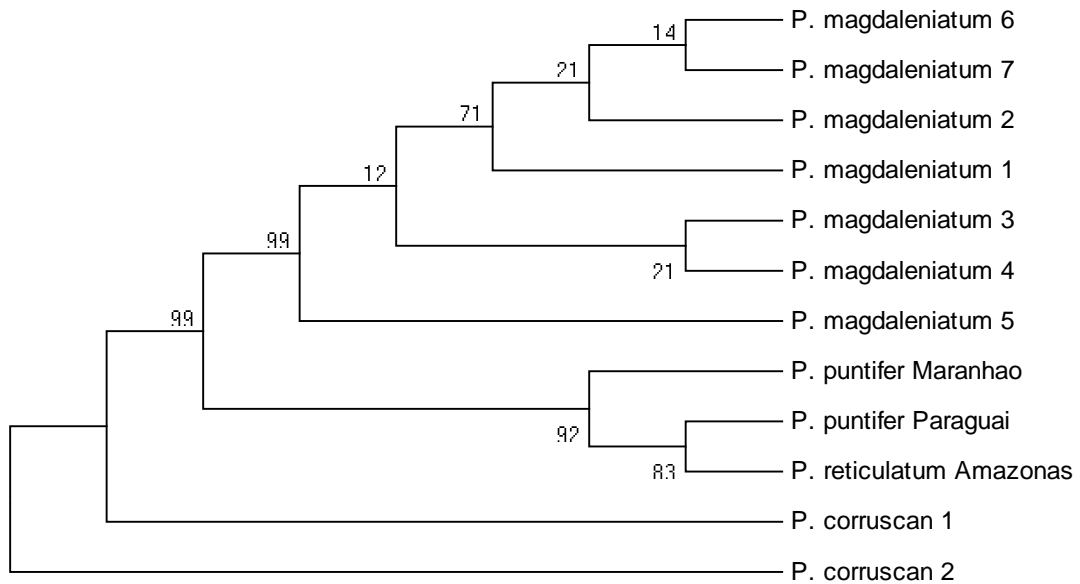


Figura 5. Árbol construido con el método de Máxima Parsimonia con Brootstrap (500 réplicas) y el modelo Nucleotide Kimura2 parameter, para el gen Rag 1 comparando por distancias genéticas los individuos de *P. magdaleniatum* con el grupo externo: *P. corruscan*, *P. punctifer* provenientes de Amazonas y Maranhão y *P. reticulatum* proveniente de Paraguay

Relaciones filogenéticas establecidas entre los genes de Citocromo b y Rag 1

Se establecieron análisis comparativos a nivel de relaciones filogenéticas entre los dos genes Citocromo b y Rag 1 utilizando los dos métodos empleados en los análisis por separado: Máxima parsimonia (**Figura 6**) y UPGMA (**Figura 7**). Estos análisis permitieron la comparación de los individuos de *P. magdaleniatum* y los individuos del grupo externo para los dos genes Citocromo b y Rag 1 simultáneamente así como el comportamiento de los grupos en un mismo contexto.

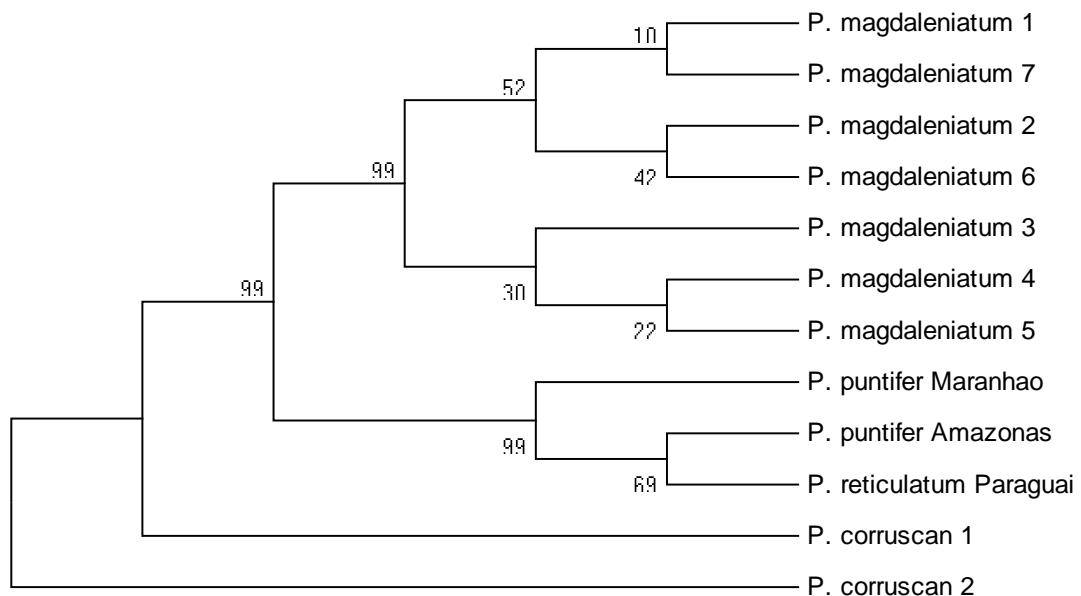


Figura 6. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia (Construc Phylogeny) con los genes Rag 1 y Citocromo b para comparar comparando por distancias genéticas los individuos de *P. magdaleniatum* con el grupo externo: *P. corruscan*, *P. punctifer* provenientes de Amazonas y Maranhão y *P. reticulatum* proveniente de Paraguay

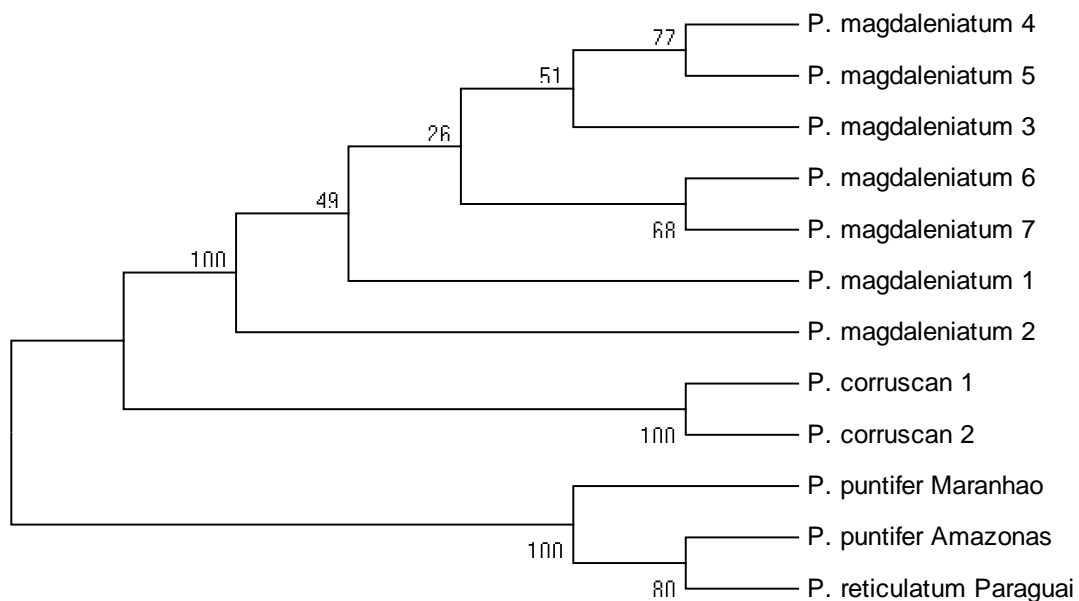


Figura 7. Árbol construido con el método de UMPG con Brootstrap (500 réplicas) utilizando el modelo Nucleotide1 Kimura2 parameter, con los genes Rag 1 y Citocromo comparando por distancias genéticas los individuos de *P. magdaleniatum* con el grupo externo: *P. corruscan*, *P. punctifer* provenientes de Amazonas y Maranhão y *P. reticulatum* proveniente de Paraguay

Las relaciones de los grupos fueron similares en los análisis obtenidos en las **Figuras 2, 3, 4, 5, 6 y 7** descritas anteriormente. Es decir en todos los resultados se observa una separación de los individuos de *P. magdaleniatum* con respecto a los individuos que componen el grupo externo, de manera similar a los reportes de Li (1997) y Hall (2001).

Resultados del Gen S7

Los análisis para el primer intrón del gen nuclear S7, se realizaron con una secuencia parcial de 601 p. b. amplificada en los 7 individuos de *P. magdaleniatum*. Sin embargo, estos resultados no fueron aplicados en los análisis de diversidad porque no presentaron diferenciación en términos variabilidad y polimorfismo por lo tanto no fueron comparables con los resultados de diversidad obtenidos con los genes Citocromo b y Rag 1. Es decir, este marcador resultó monomórfico para este gen en la especie analizada.

7. Discusión

Diversidad genética de los genes Citocromo b y Rag 1

Los resultados en términos de varianza genética para el gen Citocromo b analizados en los individuos pertenecientes a la especie de *P. magdaleniatum* presentan un polimorfismo relativamente alto aunque la muestra fue pequeña, debido a que se encontraron diferencias en el número de nucleótidos entre los individuos estudiados. Adicionalmente los resultados de los análisis de diversidad haplotípica con un valor de 1,0 son inferiores en comparación con la tasa de 3,9 obtenida por Batista & Alves-Gomes (2006) en los individuos de *Brachyplatystoma rousseauxii* y están por debajo de la taxa (10) que potencialmente permite la acumulación de homoplasias, que es el cambio evolutivo paralelo que hace que dos organismos presenten un mismo carácter adquirido independientemente y esto puede dificultar reconstrucciones filogenéticas (Brown *et al.*, 1982, Carvalho & Galetti 2008). La diversidad haplotípica para este estudio fue representada por cada individuo, es decir un haplotipo diferente relaciona a cada individuo como muestra de estudio, de este modo los 7 individuos colectados representan individualmente un haplotipo diferente.

Respecto a los valores de frecuencia nucleotídica por pares de bases para los individuos de *P. magdaleniatum* con Citocromo b, se analizaron con base en la relación que se establece entre los pares de cambios dados por transiciones y transversiones a lo largo de las secuencias. De este modo, el valor de R superior a 1.0 sugiere una distribución uniforme de los cambios debidos a transiciones y transversiones, este hecho es explicado porque en la mayoría de los sitios la distribución es intermedia y solo pocos sitios tienen tasas o muy altas o muy bajas de mutaciones debidas a transiciones y transversiones (Yang 1995).

Adicionalmente, los valores observados de las mutaciones debidas a transiciones y transversiones muestran que las transiciones son más comunes que las transversiones, siendo las primeras 10 veces más frecuentes, esto es similar a lo descrito para otros genes mitocondriales (Brown *et al.*, 1982). También se observa que la tasa de sustitución entre las

posiciones del codón exhiben una variación que es comparable con los reportes en otros estudios en otros genes mitocondriales (Irwin *et al.*, 1999 Lydeard & Roe 1997).

Los valores más elevados de los contenidos de los nucleótidos de Adenina y Timina son semejantes a los encontrados por Faber & Stepien (1997). También se encontró que la composición nucleotídica media y el contenido de Guanina – Citosina y Adenina – Timina son semejantes a los reportes realizados por Batista & Alves-Gomes (2006) para la región control de *Brachyplatystoma rousseauxii*.

Con los resultados obtenidos del Test de neutralidad, se puede sugerir que no existe selección natural y que los individuos estudiados presentan baja diversidad genética. Los resultados muestran que todos los valores de los test de neutralidad son negativos, lo que indica un exceso de variantes en baja frecuencia, pudiendo este ser el resultado de nuevas mutaciones, lo que podría ser un indicador de expansión de la población (Calvo *et al.*, 2004), aunque nunca se alcanzó la significancia estadística.

Los valores de diversidad nucleotídica y haplotípica fueron similares para los dos genes Citocromo b y Rag 1, aunque la diversidad haplotípica es más alta que la nucleotídica en donde se observaron solo 2 nucleótidos diferentes por cada 1000 pares de bases.

Las investigaciones relacionadas con el gen Rag 1, se basan principalmente en el funcionamiento del gen dentro de procesos de inmunodeficiencia relacionados con especies de mamíferos, anfibios y humanos (Meijden *et al.*, 2004, Corropio *et al.*, 2007, Brinkmann *et al.*, 2004, Dunham 1999). De este modo aun continúan siendo limitadas las investigaciones que involucren al gen Rag 1 como marcador molecular en estudios de diversidad genética, por lo tanto los resultados producidos en esta investigación representan nuevos datos acerca del comportamiento genético, molecular y su óptimo empleo en el análisis de diversidad para poblaciones pertenecientes al género *Pseudoplatystoma*.

Los valores porcentuales de la composición nucleotídica para las secuencias del gen Rag 1 fueron similares a los encontrados en un estudio filogenético que involucra individuos pertenecientes a la familia Chichid (Izeni *et al.*, 2001). Sin embargo, para este caso los resultados del gen Rag 1 muestran un alto grado de homogeneidad dada la composición nucleotídica del taxón (Groth & Barrowclough 1998).

Los intrones son secuencias que se encuentran al interior de los genes y que son removidas por *splicing*, después de la transcripción a RNA, al no codificar proteínas y no ser expresados en el fenotipo, las mutaciones presentes en la región del intrón son probablemente neutras (se debe tener una cierta precaución pues existen pocos casos donde los intrones interfieren en la expresión del gen). La neutralidad de las mutaciones en los intrones es sustentada por evidencias moleculares de que los intrones evolucionan más rápidamente que las partes que son traducidas (exones) (Stearns & Hokstra 2003). Esto explica el valor de los índices negativos obtenidos con el Test de Fu and Li's y Tajima's para Rag 1, que podrían estar indicando un exceso de variantes en baja frecuencia, debido posiblemente a la presencia de mutaciones nuevas como un indicador de la expansión de la población, aunque no se encontró significancia. Adicionalmente, el componente de la muestra es muy bajo y esto hace difícil definir claramente el comportamiento de la población.

Análisis de filogenia

A partir de los datos reportados por Buitrago & Brook (2007) donde se establece la separación de *P. fasciatum* en ocho especies válidas, aislando a *P. magdaleniatum* como una especie endémica del río Magdalena, los resultados encontrados en este estudio corroboran la información dado que los individuos analizados se agruparon en un clado distinto en términos de distancia genética, reiterando con datos recientes que individuos de *P. magdaleniatum* capturados en dos puntos distantes de la cuenca del Magdalena se separan de individuos de *P. fasciatum*.

Adicionalmente, Torrico *et al.*, (2007) describen la separación de la población de *P. magdaleniatum* del resto de individuos pertenecientes al género *Pseudoplatystoma*,

confirmando una vez más los datos obtenidos en nuestro estudio con los reportes realizados por otros investigadores.

Utilizando altos valores de bootstrap del 99%, en las pruebas de máxima parsimonia y UPGMA en las secuencias analizadas para el gen Citocromo b, se observó la separación de los individuos de *P. magdaleniatum* del grupo externo. De este modo el grupo externo se separa completamente de los individuos de *P. magdaleniatum* y forman dos clados con altos valores de bootstrap. El primer clado está compuesto por los individuos de Maranhao, Paraguay y Amazonas y el segundo clado lo conforman los individuos de *P. corruscan* 1 y 2. Para el gen Rag 1, los dos métodos UPGMA y Máxima Parsimonia, confirmar de nuevo la separación de los individuos de *P. magdaleniatum* del grupo externo. Adicionalmente, se observa que ambos árboles presentan altos valores de bootstrap, lo que nos genera un grado mayor de confiabilidad.

Considerando que la variabilidad genética en las poblaciones naturales es el resultado de la interacción medio ambiente y genotipo y que además este componente está sujeto a la presión de selección dado por procesos evolutivos que generan cambios y adaptación al medio, resulta útil e interesante para nuestra investigación analizar los resultados en función de algunos factores relacionados con la historia geológica de la cuenca del Rio Magdalena con la biología de la especie *P. magdaleniatum* y la influencia antrópica sobre el comportamiento genético de las poblaciones de individuos. En este sentido, el levantamiento tectónico de la cordillera de los Andes, hace 10.5 millones de años, ocasionó no sólo cambios en los factores generadores de heterogeneidad en el paisaje de la cuenca (pendiente, sustrato mineral, barreras geográficas), sino que de manera fundamental se aisló reproductivamente de la población de *P. fasciatum*, que ahora es conocida como *P. magdaleniatum* con otras poblaciones de las cuencas de la Amazonia y Orinoquia.

Este aislamiento que erosionó la diversidad ictiológica del Magdalena (Lundberg *et al.*, 1998, Lundberg & Chernoff 1992) sometió a las poblaciones de peces remanentes a la necesidad de adaptación a nuevas condiciones (ej.: hábitat, aspectos demográficos, relaciones interespecíficas), lo cual fue logrado exitosamente por *P. fasciatum*, pero no por otras especies que compartían su rango de distribución original (*Arapaima* sp., *Colossoma* sp.,

Brachyplatystoma sp.), que se extinguieron localmente del Magdalena, pero que persisten actualmente en el Amazonas y el Orinoco (Lundberg & Chernoff 1992).

A pesar de que existen evidencias de múltiples extinciones locales en la cuenca del río Magdalena (Lundberg & Chern 1992), especies como el bagre rayado, *P. magdaleniatum* (Linnaeus 1766), persisten como evidencia de una adaptación exitosa a las condiciones ambientales sufridas a lo largo de su historia geológica reciente.

Considerando que la fragmentación del hábitat es un factor determinante en el establecimiento de la variabilidad genética (Chakravorty & Leimar 1987, Hartl & Clark 1989), la interrupción del flujo génico con individuos que hacían parte de un paisaje mucho más amplio y diverso como la cuenca del Magdalena, puede haber propiciado un proceso de erosión genética, que es el evidencia en los resultados obtenidos.

Al realizarse la comparación de las secuencias de los dos genes Citocromo b y Rag 1, se observó que los dos métodos de construcción filogenética utilizados separan a los individuos de *P. magdaleniatum* que forman un clado con respecto al grupo externo. Por otro lado, los individuos de *Pseudoplatystoma corrucan* estudiados con Rag 1 no formaron ningún clado entre ellos y se separaron del resto de los individuos estudiados, lo que permite concluir que son los individuos que presentan mayor número de diferencias en relación a la población estudiada.

La misma topología fue obtenida en los análisis de los árboles filogenéticos que contenían los individuos de *P. magdaleniatum* y el grupo externo, que reafirman la diferenciación también reportada por otros investigadores (Li 1997, Hall 2001).

8. Conclusiones

Los resultados de esta investigación contribuyen al conocimiento sistemático y el comportamiento genético de un pequeño pool de individuos muestreados de la especie *Pseudoplatystoma magdaleniatum*.

Estos resultados preliminares sobre la sistémica molecular de la especie *P. magdaleniatum* revelan gran importancia desde el punto de vista molecular para los genes mitocondriales y nucleares porque nos brindan un conocimiento sobre el comportamiento genético de una especie de importancia económica y ecológica para Colombia.

El intrón nuclear S7, es un gen monomórfico, que para el caso de la especie *P. magdaleniatum* no fue útil para la caracterización molecular dado que los resultados no mostraron ninguna diferenciación genética entre los individuos y por lo tanto no eran comparables con los resultados de diversidad obtenidos con los genes del Cyt b y RAG 1.

El polimorfismo identificado en el gen mitocondrial citocromo b, lo convierte en un marcador informativo para la discriminación molecular entre individuos pertenecientes a la especie *P. magdaleniatum* versus los individuos de la especie antigua *P. fasciatum*.

A partir de los análisis de filogenia de las secuencias de los genes de citocromo b y Rag 1 se observó la separación por distancia genética de los individuos evaluados de la especie de *P. magdaleniatum* con los individuos del grupo externo *P. fasciatum*.

Los análisis de diversidad haplotípica permitieron identificar un nivel de variación a nivel de secuencia entre los individuos de *P. magdaleniatum* estos datos hacen pensar que existe una variabilidad importante que debe ser estudiada más a fondo en esta especie.

La importancia de estos resultados para la especie *P. magdaleniatum* es el aporte al conocimiento de la genética molecular, dada la escasa información que existe y la

importancia económica, ecológica y de preservación natural que representa esta especie para el país.

Con base en los resultado, se sugiere que el comportamiento de la especie *P. magdaleniatum* es simplemente el resultado de una especiación simpátrica a través del tiempo y el espacio como producto del levantamiento de la cordillera de los Andes, la especie debió desarrollar mecanismos de adaptación que muestran cierto grado de diferenciación y variación genética.

9. Recomendaciones

Se debe ampliar el número de puntos de muestro a lo largo del Río Magdalena y de la misma manera debe ser ampliado en número poblacional con el fin de brindar un mayor soporte de los resultados estadísticos.

Utilizar otros marcadores moleculares idealmente de tipo codominante que puedan brindar una mayor información sobre la diversidad genética de las poblaciones de estudio, como Microsatélites, AFLPs, y otros genes mitocondriales.

Se podría realizar réplicas de los puntos de muestreo para comparar los datos obtenidos en términos de tiempo y espacio y de esta forma hacer un estudio más completo sobre la biología y la genética de las especies pertenecientes al género *Pseudoplatystoma*.

10. Referencias citadas

Aljanabi S. M, Martínez I. 1997. Universal and rapid SALT-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25 (22): 4694-693.

Avice J. C, Arnold J, Ball R. M, Bermingham E, Lamb T, Neigel J. E, Reeb C. A, Saunders N. C. 1987. Intra-specific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. v.18, p. 489-522.

Avice J.C, Walker, D, Johns, G. C. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London*. v.265, p.1707-1712.

Avice J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press: Cambridge.

Ballard. W., Whitlock M. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*. 13, 729–744.

Barthem R, Goulding M. 1997. *The Catfish Connection. Ecology, Migration and Conservation of Amazon Predators*. Columbia University, New York. USA. 144 p.

Batista J. S. & J. A. Alves-Gomes. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of "homing" for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research*, 5(4): 723-740.

Bermingham G, Seutin R, Ricklefs. R. 1996. Regional approaches to conservation biology: RFLPs, DNA sequence, and Caribbean birds. In: T.B. Smith and R.K. Wayne, Editors, *Molecular Genetic Approaches in Conservation*, Oxford University Press, New York pp. 104–124.

Brinkmann. H., Venkatesh B., Brenner.S., Meyer A., 2004. Nuclear protein-coding genes support lungfish and not the coelacanth as the closest living relatives of land vertebrates *The National Academy of Sciences of the USA* Vol 101 No 4 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0400609101.

Brito M. F. G, Bazzoli N. 2003. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **55** (5).

Bo Feng, Sarada Bulchand, Emre Yaksi, Rainer W Friedrich and Suresh Jesuthasan 2005 The *recombination activation gene 1 (Rag1)* is expressed in a subset of zebrafish olfactory neurons but is not essential for axon targeting or amino acid detection This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/6/46>.

Brown W. M, George M, Wilson A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **76**: 1967-1971.

Brown, W.M.,; Prager, E. M., Wang, A., Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, **18**: 225-239.

Burgess W. E. 1989. An Atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes. T. F. H Publications, Inc., Neptune City, N. Jersey.

Buitrago-Suárez U. A. 2006, Anatomía comparada y evolución de las especies de *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 (Siluriformes: Pimelodidae). *Revista de la Academia Colombiana De Ciencias* **30** (114):117-141.

Buitrago-Suárez, U. A, Burr Brooks M. 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa* **1512**: 1-38.

Carvalho F, Galetti P. 2008. Estudo da diversidade genética e Filogeografía do género *Pseudoplatystoma* Bleeker, 1862 (Teleostei: Pimelodidae) em diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. Departamento de Genética e Evolução. São Carlos.

Calcagnotto D, Schaefer S, Desalle R. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**, 135–153.

Calvo J. H, Calvete C, Martínez-Royo A, Estrada R, Miranda M.A, Borrás D, Sarto I, Monteys V, Pages N, Delgado J.A, Collantes F, Lucientes J. 2004. Expansión de la población de culicoides imicola en España y análisis filogenético de la misma, basado en el análisis del gen de la citocromo oxidasa subunidad I (COI).

- Chakraborty R., & O. Leimar. 1987. Genetic variation within a subdivided population. Pp. 89-120. in N. Ryman, and F. Uttereds. Population genetics and fisheries management. University of Washington Press, Seattle.
- Chow S., Hazama K. 1998. Universal PCR Primers for S7 Ribosomal Protein Gene Introns in Fgish. Blackwell Science Ltd, *Molecular Ecology* 7, 1247-1263.
- Coronel J.S, Maes G.E, Claus S, Van Damme P.A, Volckaert A.M. 2004. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum*(Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *Journal of Fish Biology* 65 (3).
- Corripio-Miyar Y., Bird. S., Treasurer J. W., Secombes C.J. 2007. RAG-1 and IgM genes, markers for early development of the immune system in the gadoid haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, L. *Fisch & Sellfish Immunology Fish & Shellfish Immunology* 23 (2007) 71e85.
- De Melo. C, Lima J, De Melo, T Pinto, V. 2005. Peixes do rio das mortes: Identificacao e ecologia das espécies mais comuns Primera Edición UNEMAT.
- Dunham. M., 1999. Ika1 and rag1 as Markers for the Development of the Zebrafish Immune System B u g journal vol. 2, 1999 49-53 p
- Eschmeyer W..N, Ferraris J.R, C.J Hoang, M.D, Long, D.J. 2004. The Catalog of Fishes online. Internet address: <http://www.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/intro.html>.
- Esposti M.D, De Vries, S. Crimi, M. Ghelli, A. Patarnello, T. & Meyer, A. 1993. Mitochondrial Cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et biophysica acta*, 26: 243-271.
- Farias Izeni P, Ortí Guillermo, Sampaio Iracilda, Schneider Horacio, Meyer Axel. 2001. The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *J Mol Evol* 53:89–93.
- Faber, J.E. & Stepien, C.A. 1997. The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships. *In*: Kocher, T.D. & Stepien, C.A. (Eds). *Molecular Systematics of Fishes*, Academic Press. 314 pp.

Fernández A.A.M. 2008. Determinación de la estructura genética de 10 comunidades indígenas del territorio Colombiano, Mediante análisis de marcadores RFLPs de mtADN y las relaciones genéticas con poblaciones indígenas del continente americano. Universidad Del Tolima Facultad De Ciencias Básicas Programa De Biología Ibagué-Tolima 2008.

Ferreira M & Gratapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen 220p.

Frankham R, Ballou, J.D, Briscoe D.A. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.

Fu Y-X Li W-H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693-709.

Fu Y-X. & Li W-H. 1999. Coalescing into the 21st century: an overview and prospects of coalescent theory. *Theoretical Population Biology*, 56: 1-10.

Gallo H. J. Díaz-Sarmiento. 2003. Variabilidad genética del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum*, (Pises: Pimelodidae) en el río Magdalena (Colombia). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 27 (105): 599-605. ISSN 0370-3908.

Groth. J., G., Barrowclough F. G.1998 Basal Divergences in Birds and the Phylogenetic Utility of the Nuclear RAG-1 Gene *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 12, No. 2, July, pp. 115–123, 1999 Article ID mpev.1998.0603, available online at <http://www.idealibrary.com> on

Hall, B.G. 2001. *Phylogenetic trees made easy: a how-to manual for molecular biologists*. Sunderland: Sinauer Associates.

Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.

Hare, M.P. 2001. Prospects for nuclear phylogeography. *Trends Ecol. Evol.* 16:700-706.

Hartl, D. L., & A. G. Clark. 1989. *Principles of population genetics*. 2 ed. Sinauer Associates

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: 334–340.

He. M, Haymer D. S. 1997. Polymorphic intron sequences detected within and between populations of the Oriental fruit fly (*Diptera: Tephritidae*). *Annals of the Entomological Society of America*, 90: 825–831.

Hillis M.H, Mable B.K, Larson A, Davis S.K, Zimmer E. 1996. Nucleic Acid IV: Sequencing and Cloning. In Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (Eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer: Sunderland.

Hrbek T, Larson A. 1999. The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): a molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution*, 53: 1200–1216.

Irwin D.M, Kocher T.D, Wilson A.C. 1991. Evolution of the Cytochrome *b* gene in mammals. *J. Mol. Evol.* 32, 128–144.

Izeni P, Farias Guillermo Orti, Iracilda Sampaio, Horacio Schneider, Axel Meyer. 2001. The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Journal Molecular Ecology* *J Mol Evol* (2001) 53:89–103 DOI: 10.1007/s002390010197.

Kapitonov VV, Jurka J (2005) RAG1 Core and V (D)J Recombination signal sequences were derived from Transib transposons. *PLoS Biol* 3(6): e181.

Kocher T.D, Thomas W.K, Meyer A, Edwards S.V, Paabo S, Villablanca F.X, Wilson A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial-DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 6196-6200.S.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163.

Lamprea N, Lopez L, Santacruz D, Guerrero J, Burbano C. 2004. Modificaciones técnicas en el uso de microsatélites y AFLP para el estudio poblacional de diversas especies de peces en el río Sinú, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol 6, No 1.

Lavoué S, Sullivan J, Hopkins C. 2003. Phylogenetic utility of the first two introns of the S7 ribosomal protein gene in African electric fishes (Mormyroidea: Teleostei) and congruence with other molecular markers. *Biological Journal of the Linnean Society*, 78, 273–292.

Lechtova V, Bohlen J, Tan Hc. 2007. Families of Cobitoidea (Teleostei; Cypriniformes) as revealed from nuclear genetic data and the position of the mysterious genera *Barbucca*, *Psilorhynchus*, *Serpenticobitis* and *Vaillantella*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, 1358–1365.

Li, W.-H. (1997) *Molecular Evolution*. Sunderland, MA, Sinauer Associates.

Lis J.T., Schleif R. 1995. Size Fractionation of Double Stranded DNA by Precipitation with Polyethylene Glycol. *Nucleic Acids Research*. 383-389.

Lovejoy N. R. & Araújo M. L. G. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology*, 9: 259–268.

Lowe-McConnell, R. H. 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. Edusp-(Editora da Universidade de Sao Paulo), Sao Paulo, 535 p.

Lundberg J .G and B Chernoff. 1992. A fossil of the Amazon fish *Arapaima* (Teleostei: Arapaimidae) from the Miocene La Venta fauna of Colombia, South America. *Biotropica*. 24(1):2-14.

Lundberg J.G, L.G Marshall, J. Guerrero, B. Horton, M. C. Malabarba and F. Wesselingh. 1998. The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. Chapter 1. *In* L.R. Malabarba, R.E.Reis, R.P.Vari, C.A.S.Lucena and Z.M.S.Lucena eds. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS. Porto Alegre, Brazil.

Lundberg. J. G & Littmann M.W. 2003. Family Pimelodidae (long whiskered catfishes). *In*: Reis, R.E. & Kullander, S.O. (Eds.). *Checklist of the freshwater fish of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 432–446

Lydeard, C., and Roe, K. 1997. The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome *b* gene for inferring relationships among actinopterygian fishes. *In*. T. Kocher and C. Stepien (eds.), *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press.

Martin A, Bermingham E. 1998. Comparative mtDNA phylogeography the neotropical Freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower central America. *Molecular Ecology* 7, 499-517.

Matioli S.R. 2001. Biología molecular e evolução. Ribeirão Preto, SP: Holos, Editora.

Meyer, A. & Wilson, C. 1990. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *Journal of Molecular Evolution*, 31: 359–364.

Meijden. A., Vences M., Meyer. A., 2004 Novel phylogenetic relationships of the enigmatic brevicipitine and scaphiophrynine toads as revealed by sequences from the nuclear Rag-1 gene The royal society. Biology letter. *Recd* 20.01.04; *Accepted* 09.03.04; *Published online* 05.05.04

Miranda, M.O.T. 1997. *Surubim*. Belo Horizonte: IBAMA.

Morrison C, Lemarie D, Wood R & King T. 2006. Phylogeographic analyses suggest multiple lineages of *Crystallaria asprella* (Percidae: Etheostominae). *Conservation Genetics*. 7, 129–147.

Nielsen, E.E., M.M. Hansen, y V Loeschcke. 1997 Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon: A comparasion of genetic composition over sixty years. *Mol. Ecol.* 6:487-492

Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillan W.O, Stice L, Grabowski G. 1991. The Simple Fool's Guide to PCR. University of Hawai, Honolulu.

Reid, S. 1983. La Biología de los Bagres Rayados *Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. tigrinum* en la cuenca del río Apure, Venezuela. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora. Serie: Prod. Agric. Año 1/No. 1/ Barinas, Diciembre de 1983.

Revaldaves E, Pereira L.H, Foresti F, Oliveira C. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* 5 (3), 463–465 doi:10.1111/j.1471-8286.2005.00883.

Rozas J, Sánchez-Delbarrio J.C, Messeguer X and Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19: 2496.

Russell, Peter. 1992. Genetics, 3rd edition. Harper Collins Publishers.

Salinas & Agudelo E. 2000. Peces de importancia económica en la cuenca amazónica colombiana Primera edición Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI y Ministerio del Medio Ambiente.

Salinas Coy Y., Córdoba Agudelo E., Alonso González J. C., Prieto Piraquive E. F., Bonilla O.. 2007. *Pseudoplatystoma fasciatum*(Linnaeus, 1766). <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=603&method=displayAAT>

Scott J, Steppan Brian L, Storz and Robert S. Hoffmann. 2003. Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and RAG1 *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30(2004)703-709.

Smith T, Wayne R. 1996. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. New York: Oxford University Press Inc 332.

Sivasundar A, Bermingham E. & Ortí. G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407–417.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.

Templeton A.R, Routman E, Phillips C. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*. v.140, p.767-782.

Torrico J.P, Hubert N, Desmarais E, Duponchelle F, Nuñez Rodriguez J, Montoya-Burgos J, Garcia Davila C, Carvajal-Vallejos F.M, Grajales A.A, Bonhomme F, Renno J-F. 2008. Molecular Phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and Evolutionary implications *Molecular Phylogenetics and Evolution* doi: 10.1016/j.ympev. 11.019

Vásquez C.C. 2006. Estructura poblacional y filogenética del Jaguar (*Panthera Onca*) a partir del ge mitocondrial NADH5. Tesis para pregrado para Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad De Ciencias. Departamento de Biología. Bogota 73.

Willis S, Nunes M, Montaña C, Farias I & Lovejoy N. Ballard. W & Whitlock M. 2007. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, 291–307.

Yang, Z. 1995. A space-time process model for the evolution of DNA sequences. *Genetics* 139:993-1005.

11. Anexos

Anexo 1. Método para extracción de ADN por Tampón Salino

1. Homogenizar el tejido (50-100mg) en 400µl de tampón salino (NaCl 0,4 M, Tris-HCl 100 Mm, pH=8,0 y EDTA 2 mM pH=8,0) en micro-túbulos de 2ml.
2. Adicionar 40µl de SDS (Sulfato Duodecil de Sodio) 20% y 8µl de Proteinase K (20 mg/ml) y mezclar bien.
3. Incubar las muestras a 55-65C° de 1 a 4 horas hasta que se digieran bien los pedasos de musculo.
4. Adicionar 300µl de NaCl 6M y mezclar bien.
5. Mover las muestras por 30 segundos a velocidad máxima.
6. Centrifugar por 30 minutos a 10.000 rpm.
7. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo.
8. Adicionar igual volumen de Isopropanol al 100%, agitar vigorosamente las muestras para que se consiga la precipitación de ADN.
9. Incubar a -20 C° por 1 hora.
10. Centrifugar por 20 minutos a 1000 rpm.
11. Lavar el *pellet* con etanol al 70%.
12. Centrifugar por 5 minutos.
13. Descartar el sobrenadante y dejar secar en estufa a 37°C por 15 minutos.
14. Resuspender en 300-500 µl de TE (Tris-HCl-EDTA) y adicionar 10-20 µL RNAsa (20mg/mL) almacenar en el refrigerador a -20°C.

(Aljanabi & Martínez 1997)

Anexo 2. Purificación del ADN protocolo PEG

1. Para 30 μ l en reacción de PCR, adicionar un volumen igual de PEG. (polietilenglicol 800 20%, NaCl 2,5 M (Sigma) e incubar a 37 °C durante 15 min.
2. Centrifugar a revoluciones elevadas (~15,000 x g) por 15 min.
3. A temperatura ambiente, con ayuda de pipeta retirar el sobrenadante y adicionar al tubo 125 μ l de etanol (JT Baker) 80% frío y centrifugar durante 2 minutos, con la ayuda de una pipeta se descarta el etanol.
4. Repetir este paso por 3 veces.
5. Dejar secar el tubo en un Thermostat plus a 50°C de 5 a 10 minutos (hasta que el etanol esté totalmente evaporado).
6. Disolver los productos de PCR en 25 μ l de agua millique, pipeteando lentamente durante un tiempo con el fin de homogenizar el ADN dentro de la solución y dejar 12 horas a temperatura ambiente (Lis & Schleif 1975)

Anexo 3: Secuencias alineadas

Citocromo b

```

.....| .....| .....| .....| .....|
      10    20    30    40    50
Ptm 8 H159 TTAGTTTTCT AGTTTTTCTG CTAGGGGGTT ???GAAGAT TACGAATAGT
Ptm 9 H159 TTAGATTCT GGTTTTTCTG CTAAGGGGTT ???GAAGAT TACGAATAGT
Ptm 10 H15 TTAGATTCT AGTTTTTCTG CTAGGGGGTT ???GAAGAT TACGAATAGT
Ptm 11 H15 TTAGTTTTCT AGTCTTTCTG CTAGGGGGTT ???GAAGAT TACGAATAGT
Ptm 12 H15 TTAGTTTTCT GGTCTTTCTG CTAGGGGGTT ???GAAGAT TACGAATAGT
Ptm 13 H15 TTAGATTCT GGTTTTTCTG CTAGGGGGTT ???GAAGAT TACGAATAGT
Ptm 14 H15 TTAGTTTTCT GGTCTTTCTG CTAGGGGGTT ???GAAGAT TACGAATAGT
Maranhao CTACACTTCT GATATCTCAA CCGCATTTTC ATCAGTAGCC CACATCTGCC
Amazonas CTACACTTCT GATATCTCAA CCGCATTTTC ATCAGTAGCC CACATCTGCC
Paraguai CTACACTTCT GATATCTCAA CCGCATTTTC ATCAGTAGCC CACATCTGCC
Pin 1 H159 ?????????? ?????????? ???GGGGTT ???GAAAAT TACGAATAGC
Pin 2 H159 ?????????? ?????????? ???GGGGTT ???GAAAAT TACGAATAGC

.....| .....| .....| .....| .....|
      60    70    80    90   100
Ptm 8 H159 GAGAAGTA?? ?TAGGATGGA G?????GCG ACTTGT??C CGATGATAAT
Ptm 9 H159 GAGAAGTA?? ?TAGGATGGA G?????GCT ACTTGT??C CGATGATAAT
Ptm 10 H15 GAGAAGTA?? ?TAGGATGGA G?????GCG ACTTGT??C CGATGATAAT
Ptm 11 H15 GAGAAGTA?? ?TAGGATGGA G?????GCG ACTTGT??C CGATGATAAT
Ptm 12 H15 GAGAAGTA?? ?TAGGATGGA G?????GCG ACTTGT??C CGATGATAAT
Ptm 13 H15 GAGAAGTA?? ?TAGGATGGA G?????GCT ACTTGT??C CGATGATAAT
Ptm 14 H15 GAGAAGTA?? ?TAGGATGGA G?????GCG ACTTGT??C CGATGATAAT
Maranhao GAGACGTAAA CTACGGCTGA GTTATCCGCA ACCTACACGC CAACGGTGCT
Amazonas GAGACGTAAA CTACGGCTGA GTTATCCGCA ACCTACACGC CAACGGTGCT
Paraguai GAGACGTAAA CTACGGCTGA GTTATCCGCA ACCTACACGC CAACGGTGCC
Pin 1 H159 GAGAAGTA?? ?TAGAACGGA G?????GCA ATTTGT??C CGATGATGAT
Pin 2 H159 GAGAAGTA?? ?TAGAACGGA G?????GCA ATTTGT??C CGATGATGAT

.....| .....| .....| .....| .....|
     110   120   130   140   150
Ptm 8 H159 GAATGGGTGT TCAACGG?GC ATGCCTCCGA TTCAGGTGAG G?????ATGG
Ptm 9 H159 GAATGGGTGT TCAACGG?GC ATGCCTCCGA TTCAGGTGAG G?????ATGG
Ptm 10 H15 GAATGGGTGT TCAACGG?GC ATGCCTCCGA TTCAGGTGAG G?????ATGG
Ptm 11 H15 GAATGGGTGT TCAACGG?GC ATGCCTCCGA TTCAGGTGAG G?????ATGG
Ptm 12 H15 GAATGGGTGT TCAACGG?GC ATGCCTCCGA TTCAGGTGAG G?????ATGG
Ptm 13 H15 GAATGGGTGT TCAACGG?GC ATGCCTCCGA TTCAGGTGAG G?????ATGG
Ptm 14 H15 GAATGGGTGT TCAACGG?GC ATGCCTCCGA TTCAGGTGAG G?????ATGG
Maranhao TCATTCTTCT TCATCTGCAT CTACCTCCAC ATCGGACGAG GCCTTTACTA
```

Amazonas TCATTCTTCT TCATCTGCAT CTACCTCCAC ATCGGACGAG GCCTATACTA
Paraguai TCATTCTTCT TCATCTGCAT CTACCTCCAC ATCGGACGAG GCCTATACTA
Pin 1 H159 GAATGGGTGT TCGACGG?GC ATGCCTCCAA TTCAAGTGAG G?????ATGG
Pin 2 H159 GAATGGGTGT TCGACGG?GC ATGCCTCCAA TTCAAGTGAG G?????ATGG

....|....||....||....||....||....|
 160 170 180 190 200

Ptm 8 H159 CGACGTCTGC TACTAGGGTT CAGAATAAGA A??TTGTGCT AGGGGTCGGA
Ptm 9 H159 CGACGTCTGC TACTAGGGTT CAGAATAAGA A??TTGTGCT AGGGGTCGGA
Ptm 10 H15 CGACGTCTGC TACTAGGGTT CAGAATAAGA A??TTGTGCT AGGGGTCGGA
Ptm 11 H15 CGACGTCTGC TACTAGGGTT CAGAATAAGA A??TTGTGCT AGGGGTCGGA
Ptm 12 H15 CGACGTCTGC TACTAGGGTT CAGAATAAGA A??TTGTGCT AGGGGTCGGA
Ptm 13 H15 CGACGTCTGC TACTAAGGTT CAGAATAAGA A??TTGTGCT AGGGGTCGGA
Ptm 14 H15 CGACGTCTGC TACTAAGGTT CAGAATAAGA A??TTGTGCT AGGGGTCGGA
Maranhao CGGCTCCTAC CTTTACAAAG AAACATGAAA CA?TTGGAGT TGTGCTCCTA
Amazonas CGGCTCCTAC CTTTACAAAG AAACATGAAA CATTGGAGTT GTGCTCCTAC
Paraguai CGGCTCCTAC CTTTACAAAG AAACATGAAA CA-TTGGAGT TGTGCTCCTA
Pin 1 H159 CGACGTCTGC TACTAGAGTT CAGAATAAGA A??TTGTGCT AGGGGTCGGA
Pin 2 H159 CGACGTCTGC TACTAGAGTT CAGAATAAGA A??TTGTGCT AGGGGTCGGA

....|....||....||....||....||....|
 210 220 230 240 250

Ptm 8 H159 AGGCTAGTCC TTGT?????T GTTTGGAGG? TGTGTAGTAG GGGCACAATT
Ptm 9 H159 AGGCTAGTCC TTGT?????T GTTTGGAGG? TGTGTAGTAG GGGCACAATT
Ptm 10 H15 AGGCTAGTCC TTGT?????T GTTTGGAGG? TGTGTAGTAG GGGCACAATT
Ptm 11 H15 AGGCTAGTCC TTGT?????T GTTTGGAGG? TGTGTAGTAG GGGCACAATT
Ptm 12 H15 AGGCTAGTCC TTGT?????T GTTTGGAGG? TGTGTAGTAG GGGCACAATT
Ptm 13 H15 AGGCTAGTCC TTGT?????T GTTTGGAGG? TGTGTAGTAG GGGCACAATT
Ptm 14 H15 AGGCTAGTCC TTGT?????T GTTTGGAGG? TGTGTAGTAG GGGCACAATT
Maranhao CTACTAGTTA TAATAACCGC ATTCGTAGGC TATGTGCTAC CATGAGGACA
Amazonas TACTAGTTAT AATAACCGCA TTCGTAGGT ATGTACTACC ATGAGGACAA
Paraguai CTACTAGTTA TAATAACCGC ATTCGTAGGT TATGTACTAC CATGAGGACA
Pin 1 H159 AAGTTAGTCC TTGT?????T GTTTGGAGG? TGTGTAGTAG GGAACAAC
Pin 2 H159 AAGTTAGTCC TTGT?????T GTTTGGAGG? TGTGTAGTAG GGAACAAC

....|....||....||....||....||....|
 260 270 280 290 300

Ptm 8 H159 ATTAGTACTA GGATGGAGAA TAATAAGGCT AACACTCCGC CTAGTT?TGT
Ptm 9 H159 ATTAGTACTA GGATGGAGAA TAATAAGGCT AACACTCCGC CTAGTT?TGT
Ptm 10 H15 ATTAGTACTA GGATGGAGAA TAATAAGGCT AACACTCCGC CTAGTT?TGT
Ptm 11 H15 ATTAGTACTA GGATGGAGAA TAATAAGGCT AACACTCCGC CTAGTT?TGT
Ptm 12 H15 ATTAGTACTA GGATGGAGAA TAATAAGGCT AACACTCCGC CTAGTT?TGT
Ptm 13 H15 ATTAGTACTA GGATGGAGAA TAATAAGGCT AACACTCCGC CTAGTT?TGT
Ptm 14 H15 ATTAGTACTA GGATGGAGAA TAATAAGGCT AACACTCCGC CTAGTT?TGT
Maranhao AATGTCATTT TGAGGCGCAA CAGTAATCAC AAATCTACTA TCAGCAGTCC

Amazonas ATGTCATTTT GAGGCGCAAC AGTAATCACA AATCTACTAT CAGCAGTCCC
Paraguai AATGTCATTT TGAGGCGCAA CAGTAATCAC AAATCTACTA TCAGCAGTCC
Pin 1 H159 ATTAGTACTA GGATAGAGAA TAGCAGGGCT AATACTCCGC CTAGTT?TGT
Pin 2 H159 ATTAGTACTA GGATAGAGAA TAGCAGGGCT AATACTCCGC CTAGTT?TGT

.....|||||
 310 320 330 340 350

Ptm 8 H159 TAGGGATGGA TCGTAGGATG GCGTAGGCAA ATAGGAAGTA TCACTCTGGT
Ptm 9 H159 TAGGGATGGA TCGTAGGATG GCGTAGGCAA ATAGGAAGTA TCACTCTGGT
Ptm 10 H15 TAGGGATGGA TCGTAGGATG GCGTAGGCAA ATAGGAAGTA TCACTCTGGT
Ptm 11 H15 TAGGGATGGA TCGTAGGATG GCGTAGGCAA ATAGGAAGTA TCACTCTGGT
Ptm 12 H15 TAGGGATGGA TCGTAGGATG GCGTAGGCAA ATAGGAAGTA TCACTCTGGT
Ptm 13 H15 TAGGGATGGA TCGTAGGATG GCGTAGGCAA ATAGGAAGTA TCACTCTGGT
Ptm 14 H15 TAGGGATGGA TCGTAGGATG GCGTAGGCAA ATAGGAAGTA TCACTCTGGT
Maranhao CACATAGG CGACATACTT GTTCAATG?A ATCTGAGGTG GCTTCTCCGT
Amazonas ATACATAGGC GACATACTTG TTCAATGGAA TCTGAGGTGG CTTCTCCGTA
Paraguai CACATAGG CGACATACTT GTTCAATG?A ATCTGAGGTG GCTTCTCCGT
Pin 1 H159 TTGGGATGGA TCGTAGGATG GCGTAGGCAA ATAGGAAGTA TCATTCTGGT
Pin 2 H159 TTGGGATGGA TCGTAGGATG GCGTAGGCAA ATAGGAAGTA TCATTCTGGT

.....|||||
 360 370 380 390 400

Ptm 8 H159 TTAATGTGTG GTGGTGTAC TAATGGATTG GCGGGGGTGA AGTTTT??CT
Ptm 9 H159 TTAATGTGTG GTGGTGTAC TAATGGATTG GCGGGGGTGA AGTTTT??CT
Ptm 10 H15 TTAATGTGTG GTGGTGTAC TAATGGATTG GCGGGGGTGA AGTTTT??CT
Ptm 11 H15 TTAATGTGTG GTGGTGTAC TAATGGATTG GCGGGGGTGA AGTTTT??CT
Ptm 12 H15 TTAATGTGTG GTGGTGTAC TAATGGATTG GCGGGGGTGA AGTTTT??CT
Ptm 13 H15 TTAATGTGTG GTGGTGTAC TAATGGATTG GCGGGGGTGA AGTTTT??CT
Ptm 14 H15 TTAATGTGTG GTGGTGTAC TAATGGATTG GCGGGGGTGA AGTTTT??CT
Maranhao AGACAATGCA AACTAACCC ????GATTCT TCGCATTCCA CTTCTACTG
Amazonas GACAATGCA AACTAACCC? ????GATTCT TCGCATTCCA CTTCTACTG
Paraguai AGACAATGCA AACTAACCC ????GATTCT TCGCATTCCA CTTCTACTG
Pin 1 H159 TTAATGTGTG GTGGTGTAC TAGTGGGTTG GCGGGGGTGA AATTTT??CT
Pin 2 H159 TTAATGTGTG GTGGTGTAC TAGTGGGTTG GCGGGGGTGA AATTTT??CT

.....|||||
 410 420 430 440 450

Ptm 8 H159 GGGTCACCTA GC???????? ?AGGTTTGGT GAGAATAGGG CTAGTGATGC
Ptm 9 H159 GGGTCACCTA GC???????? ?AGGTTTGGT GAGAATAGGG CTAGTGATGC
Ptm 10 H15 GGGTCACCTA GC???????? ?AGGTTTGGT GAGAATAGGG CTAGTGATGC
Ptm 11 H15 GGGTCACCTA GC???????? ?AGGTTTGGT GAGAATAGGG CTAGTGATGC
Ptm 12 H15 GGGTCACCTA GC???????? ?AGGTTTGGT GAGAATAGGG CTAGTGATGC
Ptm 13 H15 GGGTCACCTA GC???????? ?AGGTTTGGT GAGAATAGGG CTAGTGATGC
Ptm 14 H15 GGGTCACCTA GC???????? ?AGGTTTGGT GAGAATAGGG CTAGTGATGC
Maranhao CCCTTCCTA? ?????????? ?ATTGTAGCA GCCACAATCC TCCACGCACT

Amazonas CCCTTCCTA? ????????? ?ATTGTAGCA GCCACAATCC TCCACGCACT
Paraguai CCCTTCCTAC TGCCCTTCT AATTGTAGCA GCCACAATCC TCCACGCACT
Pin 1 H159 GGGTCTCCTA GT???????? ?AGGTTTGGT GAGAATAGAG CTAGTGACGC
Pin 2 H159 GGGTCTCCTA GT???????? ?AGGTTTGGT GAGAATAGAG CTAGTGACGC

....|....||....||....||....||....|
460 470 480 490 500

Ptm 8 H159 CAAGGCTGTG AGAAGTGCAA TAAATC???C TAGTAGGTCT ???TTGTAGG
Ptm 9 H159 CAAGGCTGTG AGAAGTGCAA TAAATC???C TAGTAGGTCT ???TTGTAGG
Ptm 10 H15 CAAGGCTGTG AGAAGTGCAA TAAATC???C TAGTAGGTCT ???TTGTAGG
Ptm 11 H15 CAAGGCTGTG AGAAGTGCAA TAAATC???C TAGTAGGTCT ???TTGTAGG
Ptm 12 H15 CAAGGCTGTG AGAAGTGCAA TAAATC???C TAGTAGGTCT ???TTGTAGG
Ptm 13 H15 CAAGGCTGTG AGAAGTGCAA TAAATC???C TAGTAGGTCT ???TTGTAGG
Ptm 14 H15 CAAGGCTGTG AGAAGTGCAA TAAATC???C TAGTAGGTCT ???TTGTAGG
Maranhao ATTTCTACAC GAAACAGGAT CAAACAACCC AATCGGCCTA AACTCCGACG
Amazonas ATTTCTACAC GAAACAGGAT CAAACAACCC AATCGGCCTA AACTCCGACG
Paraguai ATTTCTACAC GAAACAGGAT CAAACAACCC AATCGGCCTA AACTCCGACG
Pin 1 H159 TAGGGCTGTG AGAAGCACGA TAAAGC???C TAATAGGTCT ???TTGTATG
Pin 2 H159 TAGGGCTGTG AGAAGCACGA TAAAGC???C TAATAGGTCT ???TTGTATG

....|....||....||....||....||....|
510 520 530 540 550

Ptm 8 H159 AGAAGTAGGG GTGGAATGAA ATTTTATCTG CGTCAGAGTT TAGGCCGATT
Ptm 9 H159 AGAAGTAGGG GTGGAATGAA ATTTTATCTG CGTCAGAGTT TAGGCCGATT
Ptm 10 H15 AGAAGTAGGG GTGGAATGAA ATTTTATCTG CGTCAGAGTT TAGGCCGATT
Ptm 11 H15 AGAAGTAGGG GTGGAATGAA ATTTTATCTG CGTCAGAGTT TAGGCCGATT
Ptm 12 H15 AGAAGTAGGG GTGGAATGAA ATTTTATCTG CGTCAGAGTT TAGGCCGATT
Ptm 13 H15 AGAAGTAGGG GTGGAATGAA ATTTTATCTG CGTCAGAGTT TAGGCCGATT
Ptm 14 H15 AGAAGTAGGG GTGGAATGAA ATTTTATCTG CGTCAGAGTT TAGGCCGATT
Maranhao CAGATAAAAT TTCATTCCAC CCCTACTTCT CCTACAA??? AGACCTACTA
Amazonas CAGATAAAAT TTCATTCCAC CCCTACTTCT CCTACAA??? AGACCTACTA
Paraguai CAGATAAAAT TTCATTCCAC CCCTACTTCT CCTACAA??? AGACCTACTA
Pin 1 H159 AGAAGTAGGG GTGGAATGAA ATTTTATCTG CGTCAGAGTT TAGGCCGATT
Pin 2 H159 AGAAGTAGGG GTGGAATGAA ATTTTATCTG CGTCAGAGTT TAGGCCGATT

....|....||....||....||....||....|
560 570 580 590 600

Ptm 8 H159 GGGTTGTTTG ACCCTGTTTC GTGCAGAAAT AGTGCGTGGA GGATTGTGGC
Ptm 9 H159 GGGTTGTTTG ACCCTGTTTC GTGCAGAAAT AGTGCGTGGA GGATTGTGGC
Ptm 10 H15 GGGTTGTTTG ACCCTGTTTC GTGCAGAAAT AGTGCGTGGA GGATTGTGGC
Ptm 11 H15 GGGTTGTTTG ACCCTGTTTC GTGCAGAAAT AGTGCGTGGA GGATTGTGGC
Ptm 12 H15 GGGTTGTTTG ACCCTGTTTC GTGCAGAAAT AGTGCGTGGA GGATTGTGGC
Ptm 13 H15 GGGTTGTTTG ACCCTGTTTC GTGCAGAAAT AGTGCGTGGA GGATTGTGGC
Ptm 14 H15 GGGTTGTTTG ACCCTGTTTC GTGCAGAAAT AGTGCGTGGA GGATTGTGGC
Maranhao GG??GTTT?A TTGTACTTCT TACAGCCCTC GCATCACTAG CCCTGTTCTC

Amazonas GG??GTTT?G TTGTA CTCT TACAGCCCTC GCATCACTAG CCCTGTTCTC
Paraguai GG??GTTT?A TTGTA CTCT TACAGCCCTC GCATCACTAG CCCTGTTCTC
Pin 1 H159 GGGTTATTG ATCCAGTTTC GTGTAGAAAT AGTGCGTGGA GGATTGTGGC
Pin 2 H159 GGGTTATTG ATCCAGTTTC GTGTAGAAAT AGTGCGTGGA GGATTGTGGC

....|....||....||....||....||....|
610 620 630 640 650

Ptm 8 H159 TGCGACA ACT AGGAAGGGCA GTAGGAAGTG GAAT????GC AAAGAATCGA
Ptm 9 H159 TGCGACA ACT AGGAAGGGCA GTAGGAAGTG GAAT????GC AAAGAATCGA
Ptm 10 H15 TGCGACA ACT AGGAAGGGCA GTAGGAAGTG GAAT????GC AAAGAATCGA
Ptm 11 H15 TGCGACA ACT AGGAAGGGCA GTAGGAAGTG GAAT????GC AAAGAATCGA
Ptm 12 H15 TGCGACA ACT AGGAAGGGCA GTAGGAAGTG GAAT????GC AAAGAATCGA
Ptm 13 H15 TGCGACA ACT AGGAAGGGCA GTAGGAAGTG GAAT????GC AAAGAATCGA
Ptm 14 H15 TGCGACA ACT AGGAAGGGCA GTAGGAAGTG GAAT????GC AAAGAATCGA
Maranhao ACCAAACCTT CTAGGAGACC CAGAAA ACTT CACCCCGCC AACCCACTAG
Amazonas ACCAAACCTT CTAGGAGACC CAGAAA ACTT CACCCCGCC AACCCACTAG
Paraguai ACCAAACCTT CTAGGAGACC CAGAAA ACTT CACCCCGCC AACCCACTAG
Pin 1 H159 TGCTACA ATT AGGAAGGGTA ATAGGAAGTG GAAT????GC GAAGAATCGA
Pin 2 H159 TGCTACA ATT AGGAAGGGTA ATAGGAAGTG GAAT????GC GAAGAATCGA

....|....||....||....||....||....|
660 670 680 690 700

Ptm 8 H159 GT??CAGTGT TGCATTGTCT ACGGAGAAGC CACCTCAGAT TCATTGA?AC
Ptm 9 H159 GT??CAGTGT TGCATTGTCT ACGGAGAAGC CACCTCAGAT TCATTGA?AC
Ptm 10 H15 GT??CAGTGT TGCATTGTCT ACGGAGAAGC CACCTCAGAT TCATTGA?AC
Ptm 11 H15 GT??CAGTGT TGCATTGTCT ACGGAGAAGC CACCTCAGAT TCATTGA?AC
Ptm 12 H15 GT??CAGTGT TGCATTGTCT ACGGAGAAGC CACCTCAGAT TCATTGA?AC
Ptm 13 H15 GT??CAGTGT TGCATTGTCT ACGGAGAAGC CACCTCAGAT TCATTGA?AC
Ptm 14 H15 GT??CAGTGT TGCATTGTCT ACGGAGAAGC CACCTCAGAT TCATTGA?AC
Maranhao TAACACCACC ACACATCAAA CCAGAATGAT ACTTCCTATT TGCCTACGCC
Amazonas TAACACCACC ACACATCAAA CCAGAATGAT ACTTCCTATT TGCCTACGCC
Paraguai TAACACCACC ACACATCAAA CCAGAATGAT ACTTCCTATT TGCCTACGCC
Pin 1 H159 GT??TAGTGT TGCATTGTCT ACGGAGAAGC CACCTCAGAT TCATTGA?AC
Pin 2 H159 GT??TAGTGT TGCATTGTCT ACGGAGAAGC CACCTCAGAT TCATTGA?AC

....|....||....||....||....||....|
710 720 730 740 750

Ptm 8 H159 TAGTATGTCG CCTATGTATG GAACCGCTGA TAGTAGGTTT GTG??ATTAC
Ptm 9 H159 TAGTATGTCG CCTATGTATG GAACCGCTGA TAGTAGGTTT GTG??ATTAC
Ptm 10 H15 TAGTATGTCG CCTATGTATG GAACCGCTGA TAGTAGGTTT GTG??ATTAC
Ptm 11 H15 TAGTATGTCG CCTATGTATG GAACCGCTGA TAGTAGGTTT GTG??ATTAC
Ptm 12 H15 TAGTATGTCG CCTATGTATG GAACCGCTGA TAGTAGGTTT GTG??ATTAC
Ptm 13 H15 TAGTATGTCG CCTATGTATG GAACCGCTGA TAGTAGGTTT GTG??ATTAC
Ptm 14 H15 TAGTATGTCG CCTATGTATG GAACCGCTGA TAGTAGGTTT GTG??ATTAC
Maranhao ATCCTACGAT CCATCCAAA CAAGCTAGGC GGAGTGTTAG CCCTATTATT

Amazonas ATCCTACGAT CCATCCCAA CAACTAGGC GGGGTGTTAG CCCTATTATT
Paraguai ATCCTACGAT CCATCCCAA CAACTAGGC GGAGTGTTAG CCCTATTATT
Pin 1 H159 TAGT?TGTCG CCTATGTATG GGACTGCTGA TAGTAGGTTT GTG??ATTAC
Pin 2 H159 TAGT?TGTCG CCTATGTATG GGACTGCTGA TAGTAGGTTT GTG??ATTAC

....|....||....||....||....||....|

760 770 780 790 800

Ptm 8 H159 TGTTGCGCCT CAGAATGACA TTTGTCCTCA TGGTA?GTAC AT??AGCCTA
Ptm 9 H159 TGTTGCGCCT CAGAATGACA TTTGTCCTCA TGGTA?GTAC AT??AACCTA
Ptm 10 H15 TGTTGCGCCT CAGAATGACA TTTGTCCTCA TGGTA?GTAC AT??AGCCTA
Ptm 11 H15 TGTTGCGCCT CAGAATGACA TTTGTCCTCA TGGTA?GTAC AT??AGCCTA
Ptm 12 H15 TGTTGCGCCT CAGAATGACA TTTGTCCTCA TGGTA?GTAC AT??AGCCTA
Ptm 13 H15 TGTTGCGCCT CAGAATGACA TTTGTCCTCA TGGTA?GTAC AT??AGCCTA
Ptm 14 H15 TGTTGCGCCT CAGAATGACA TTTGTCCTCA TGGTA?GTAC AT??AGCCTA
Maranhao CTCCATCCTA GTACTAATAG TTGTACCCT ACTACACACC TCCAAGCAAC
Amazonas CTCCATCCTA GTACTAATAG TTGTACCCT ACTACATACC TCCAAGCAAC
Paraguai CTCCATCCTA GTACTAATAG TTGTACCCT ACTACATACC TCCAAGCAAC
Pin 1 H159 TGTTGCGCCT CA?AATGACA TTTGTCCTC? TGGTA?GTAC GT???ACCTA
Pin 2 H159 TGTTGCGCCT CA?AATGACA TTTGTCCTC? TGGTA?GTAC GT???ACCTA

....|....||....||....||....||....|

810 820 830 840 850

Ptm 8 H159 CGAATGCAGT TATTATAACT AGTAGTAGGA GTACAACTCC AATGTTT??
Ptm 9 H159 CGAATGCAGT TATTATAACT AGTAGTAGGA GTACAACTCC AATGTTT??
Ptm 10 H15 CGAATGCAGT TATTATAACT AGTAGTAGGA GTACAACTCC AATGTTT??
Ptm 11 H15 CGAATGCAGT TATTATAACT AGTAGTAGGA GTACAACTCC AATGTTT??
Ptm 12 H15 CGAATGCAGT TATTATAACT AGTAGTAGGA GTACAACTCC AATGTTT??
Ptm 13 H15 CGAATGCAGT TATTATAACT AGTAGTAGGA GTACAACTCC AATGTTT??
Ptm 14 H15 CGAATGCAGT TATTATAACT AGTAGTAGGA GTACAACTCC AATGTTT??
Maranhao AAGGACTAAC TTTCCGACCC CTAGCACAAT TCCTATTCTG AACCCTAGTA
Amazonas AAGGGCTAAC TTTCCGACCC CTAGCACAAT TCCTATTCTG AACCCTAGTA
Paraguai AAGGACTAAC TTTCCGACCC CTAGCACAAT TCCTATTCTG AACCCTAGTA
Pin 1 H159 CGAATGCAGT TATTATGACT AGTAGTAGGA GCACAACTCC AATTGTT??
Pin 2 H159 CAAATGCAGT TATTATGACT AGTAGTAGGA GCCACACTCC AATTGTT??

....|....||

860

Ptm 8 H159 ??CATGTTTC TTTGT
Ptm 9 H159 ??CATGTTTC TTTGT
Ptm 10 H15 ??CATGTTTC TTTGT
Ptm 11 H15 ??CATGTTTC TTTGT
Ptm 12 H15 ??CATGTTTC TTTGT
Ptm 13 H15 ??CATGTTTC TTTGT
Ptm 14 H15 ??CATGTTTC TTTGT
Maranhao GCAGATGTCG CCAT?

Amazonas GCAGACGTCG CCAT?
Paraguai GCAGACGTCG CCAT?
Pin 1 H159 ?TCATGTTTC TTTAT
Pin 2 H159 ?TCATGTTTC TTTAT

RAG 1

.....|||||
 10 20 30 40 50

Ptm 8 rag GTAAACAGAA GATGCCTTCC AGTTAGAGAT CTTGGAAATA TTATTGTGAC
Ptm 9 rag GAAGATGCCT TCCAGTTAGA GATCTTGGAA ATATTATTCG ACAATTATGA
Ptm 10 rag GAAGATGCCT TCCAGTTAGA GATCTTGGAA ATATTATTTG ACAATTATGA
Ptm 11 RAG GAAGATGCCT TCCAGTTAGA GATCTTGGAA ATATTATTTG ACAATTATGA
Pt 12 Rag GAAGATGCCT TCCAGTTAGA GATCTTGGAA ATATTATTTG ACAATTATGA
Ptm 13 Rag GAAGATGCCT TCCAGTTAGA GATCTTGGAA ATATTATTTG ACAATTATGA
Ptm 14 Rag GAAGATGCCT TCCAGTTAGA GATCTTGGAA ATATTATTTG ACAATTATGA
Paraguai R ??????TGCCT TCCAGTTAGA GATCTTGGAA ATATTATTTA ACAATTATGA
Maranhao ???ATGCCT TCCAGTTAGA GATCTTGGAA ATATTATTTG ACAATTATGA
Amazonas R ???ATGCCT TCC?GTTAGA GATCTTGGAA ATATTATTTA ACAATTATGA
Pin 1 RAG ?????????? ?????????? ??????????AA ATATCATTG ACAATTATGA
Pin 2 RAG ?????????? ?????????? ??????????AA ATATTATTTG ACAATTATGA
Pin 3 Rag ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????

.....|||||
 60 70 80 90 100

Ptm 8 rag AATTATGAGT GTAAGATTTG TAAAAGGTTT TAACTCGTGA ATCAGGTTGA
Ptm 9 rag GTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTCTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Ptm 10 rag GTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTTTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Ptm 11 RAG GTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTCTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Pt 12 Rag GTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTCTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Ptm 13 Rag GTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTCTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Ptm 14 Rag GTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTCTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Paraguai R GTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTCTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Maranhao GTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTCTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Amazonas R GTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTCTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Pin 1 RAG CTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTCTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Pin 2 RAG CTGTAAGATT TGTAAGGTT TAACTCTGAA TCAGGTTGAA GCAGATTTAT
Pin 3 Rag ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ?????TTTTAG

.....|||||
 110 120 130 140 150

Ptm 8 rag AGCAGATTTA TGTGTACTAA ACCACTGAAT ACCAGAAAAT ACCTGGATCA
Ptm 9 rag GTGTACTAAA CACTGAATAC CAGAAAAACT GGATCACCAG TCTAATACTT
Ptm 10 rag GTGTACTAAA CACTGAATAC CAGAAAA?CT GGATCACCAG TCTAATACTT
Ptm 11 RAG GTGTACTAAA CACTGAATAC CAGAAAA?CT GGATCACCAG TCTAATACTT

Pt 12 Rag GTGTAATAA CACTGAATAC CAGAAAA?CT GGATCACCAG TCTAATACTT
Ptm 13 Rag GTGTAATAA CACTGAATAC CAGAAAAACT GGATCACCAG TCTAATACTT
Ptm 14 Rag GTGTAATAA CACTGAATAC CAGAAAAACT GGATCACCAG TCTAATACTT
Paraguai R GTGTAATAA CACTGAATAC CAGAAAAACT GGATCACCAG TCTAATACTC
Maranhao GTGTAATAA CACTGAATAC CAGAAAAACT GGATCACAAG TCTAATACTC
Amazonas R GTGTAATAA CACTGAATAC CAGAAAAACT GGATCACCAG TCTAATACTC
Pin 1 RAG GTGTAATAA CACTGAATAC CAGAAAAACT GGATCACCAG TCTAATACTT
Pin 2 RAG GTGTAATAA CACTGAATAC CAGAAAAACT GGATCACCAG TCTAATACTT
Pin 3 Rag GTGTATATAA CACTGAATAC CAGATAAAAA GGATCACCAG TATATTACTT

.....|||||
 160 170 180 190 200

Ptm 8 rag CCAGTCTAAT ACTTGGTAGG TCCCCTATGG GACTCCACAA GCTTGTGGAA
Ptm 9 rag GGTAGGTCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT GTGGAAATAT TCTGTAGGCA
Ptm 10 rag GGTAGGTCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT GTGGAAATAT TCTGTAGGCA
Ptm 11 RAG GGTAGGTCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT GTGGAAATAT TCTGTAGGCA
Pt 12 Rag GGTAGGTCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT GTGGAAATAT TCTGTAGGCA
Ptm 13 Rag GGTAGGTCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT GTGGAAATAT TCTGTAGGCA
Ptm 14 Rag GGTAGGTCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT GTGGAAATAT TCTGTAGGCA
Paraguai R GGTAGGTCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT ?????????? ?CTGTAGGCA
Maranhao GGTAGGTCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT ?????????? ?CTGTAGGCA
Amazonas R GGTAGGTCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT ?????????? ?CTGTAGGCA
Pin 1 RAG GGTAGATCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT GTGGAAATAT TCTGTAGGCA
Pin 2 RAG GGTAGATCCC CTATGGGACT CCACAAGCTT GTGGAAATAT TCTGTAGGCA
Pin 3 Rag GGTAGATCCC GAATGGGTCT CCGCAAGAGA GTGGAAATAT TAGGTAGGCA

.....|||||
 210 220 230 240 250

Ptm 8 rag ATATTCTGTA GGCAATAAAC ACCAACTTC CTGCAGAAAG GTCCATACAT
Ptm 9 rag ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Ptm 10 rag ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Ptm 11 RAG ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Pt 12 Rag ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Ptm 13 Rag ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Ptm 14 Rag ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Paraguai R ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Maranhao ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Amazonas R ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Pin 1 RAG ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Pin 2 RAG ATAAACACCA AACTTCCTGC AGAAAGGTCC ATACATCTGT TGTATTTAAA
Pin 3 Rag TTAACAACA AATTCCTGC AGAATGGTCC ATACATCTGT TGTAGTTAAA

.....|||||
 260 270 280 290 300

Ptm 8 rag CTGTTGTATT TAAAGGTGTA GGATTTCTGT GTCCAACAGC ACATTGCATG
Ptm 9 rag GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGATGTG
Ptm 10 rag GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGATGTG
Ptm 11 RAG GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGATGTG
Pt 12 Rag GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGATGTG
Ptm 13 Rag GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGATGTG
Ptm 14 Rag GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGATGTG
Paraguai R GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGATGTG
Maranhao GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGATGTG
Amazonas R GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGATGTG
Pin 1 RAG GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGATGTG
Pin 2 RAG GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC AACAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGAAGTG
Pin 3 Rag GGTGTAGGAT TTCTGTGTCC ATCAGCACAT TGCATGTCAT CCCAGAAGTG

.....|||||
 310 320 330 340 350

Ptm 8 rag TCATCCCAGA TGTGTTGAAT AATGTTGAAA TCTGGTCACT TAGGTGGGAA
Ptm 9 rag TTGAATAATG TTGAAATCTG GTCACCTAGG TGGGAATAGT AAAAACCCAA
Ptm 10 rag TTGAATAATG TTGAAATCTG GTCACCTAGG TGGGAATAGT AAAAACCCAA
Ptm 11 RAG TTGAATAATG TTGAAATCTG GTCACCTAGG TGGGAATAGT AAAAACCCAA
Pt 12 Rag TTGAATAATG TTGAAATCTG GTCACCTAGG TGGGAATAGT AAAAACCCAA
Ptm 13 Rag TTGAATAATG TTGAAATCTG GTCACCTAGG TGGGAATAGT AAAAACCCAA
Ptm 14 Rag TTGAATAATG TTGAAATCTG GTCACCTAGG TGGGAATAGT AAAAACCCAA
Paraguai R TTGAATAATG TTGAATTCTG GTCACCTCAGG TGGGAATAGT AAAAACCCAA
Maranhao TTGAATAATG TTGAATTCTG GTCACCTCAGG TGGGAATAGT AAAAACCCAA
Amazonas R TTGAATAATG TTGAATTCTG GTCACCTCAGG TGGGAATAGT AAAAACCCAA
Pin 1 RAG TTGAATAATG TTGAATTCTG GTCACCTCAGG TGGGAAAGGT AAAAACCCAA
Pin 2 RAG TTGAATAATG TTGAATTCTG GTCACCTCAGG TGGGAAAGGT AAAAACCCAA
Pin 3 Rag TTGAATAATG TTGAATTCTG GTCACCTCAGG TGGGAAAGGT AAAAACCCAA

.....|||||
 360 370 380 390 400

Ptm 8 rag TAGTAAAAAC CCAAACCTCAT CTGTAGACGT GCATGGTGGT GCACTGTCCT
Ptm 9 rag ACTCATCTGT AGACGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCCTGTTG AAAGAGACCA
Ptm 10 rag ACTCATCTGT AGACGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCCTGTTG AAAGAGACCA
Ptm 11 RAG ACTCATCTGT AGACGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCCTGTTG AAAGAGACCA
Pt 12 Rag ACTCATCTGT AGACGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCCTGTTG AAAGAGACCA
Ptm 13 Rag ACTCATCTGT AGACGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCCTGTTG AAAGAGACCA
Ptm 14 Rag ACTCATCTGT AGACGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCCTGTTG AAAGAGACCA
Paraguai R ACTCATCTGT AGATGTGCAT GGTGGTACAC TGTCCTTTTG GAAGAGACCA
Maranhao ACTCATCTGT AGATGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCCTTTTG GAAGAGACCA
Amazonas R ACTCATCTGT AGATGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCCTTTTG GAAGAGACCA
Pin 1 RAG ACTCATCTGT AGATGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCCTTTTG GAAGAGACCA
Pin 2 RAG ACTCATCTGT AGATGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCCTTTTG GAAGAGACCA
Pin 3 Rag ACTCATCTGT AGATGTGCAT GGTGGTGCAC TGTCGTTTTG GAAGAGACCA

....|....||....||....||....||....|

410 420 430 440 450

Ptm 8 rag GTTGAAAGAG ACCAAACCCA TCAGAATGAA TGCAGGACAT GAACTGGTGT
Ptm 9 rag AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Ptm 10 rag AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Ptm 11 RAG AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Pt 12 Rag AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Ptm 13 Rag AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Ptm 14 Rag AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Paraguai R AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Maranhao AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Amazonas R AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Pin 1 RAG AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Pin 2 RAG AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT
Pin 3 Rag AACCCATCAG AATGAATGCA GGACATGAAC TGGTGTACCT CATCATAAAT

....|....||....||....||....||....|

460 470 480 490 500

Ptm 8 rag ACCTCATCAT AAATAGTGTT CATTGGTCAG ATACATTTGT AGATGTACCA
Ptm 9 rag AGTGTTTCATT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Ptm 10 rag AGTGTTCACT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Ptm 11 RAG AGTGTTCACT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Pt 12 Rag AGTGTTCACT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Ptm 13 Rag AGTGTTTCATT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Ptm 14 Rag AGTGTTTCATT GGTCAGATAC ATT-GTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Paraguai R AGTGTTCACT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Maranhao AGTGTTTCATT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Amazonas R AGTGTTCACT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Pin 1 RAG AGTGTTCACT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Pin 2 RAG AGTGTTCACT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG
Pin 3 Rag AGTGTTCACT GGTCAGATAC ATTTGTAGAT GTACCAGGGG TCCCATGGAG

....|....||....||....||....||....|

510 520 530 540 550

Ptm 8 rag GGGGTCCCAT GGAGTGCCTG TTAACCAAC CCCTGCCTAT GTATTTTTCA
Ptm 9 rag TGCCTGTAA ACCAACCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA
Ptm 10 rag TGCCTGTAA ACCAACCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA
Ptm 11 RAG TGCCTGTAA ACCAACCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA
Pt 12 Rag TGCCTGTAA ACCAACCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA
Ptm 13 Rag TGCCTGTAA ACCAACCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA
Ptm 14 Rag TGCCTGTAA ACCAACCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA
Paraguai R TGCCTGTAA ACCAACCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA
Maranhao TGCCTGTAA ACCAACCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA

Amazonas R TGCCTGTAA ACCAACCCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA
Pin 1 RAG TGCCTGTAA ACCAACCCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA
Pin 2 RAG TGCCTGTAA ACCAACCCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA
Pin 3 Rag TGCCTGTAA ACCAACCCCT GCCTATGTAT TTTTCATAGG CTTGTCTGTA

....|....||....||....||....||....|

560 570 580 590 600

Ptm 8 rag TAGGCTTGTC TGTACCAGTT TTTCTGGCAC GTCAGTGTAT TCAGTGGCAT
Ptm 9 rag CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Ptm 10 rag CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Ptm 11 RAG CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Pt 12 Rag CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Ptm 13 Rag CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Ptm 14 Rag CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Paraguai R CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Maranhao CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Amazonas R CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Pin 1 RAG CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Pin 2 RAG CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT
Pin 3 Rag CCAGTTTTTC TGGCACGTCA GTGTATTCAG TGGCATATAA GAAGCATATT

....|....||....||....||....||....|

610 620 630 640 650

Ptm 8 rag ATAAGAAGCA TATTAAGAC AATTGAAAA TCATATAAAA CATTCAAGAA
Ptm 9 rag AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC TAAAAAATTC
Ptm 10 rag AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC TAAAAAATTC
Ptm 11 RAG AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC TAAAAAATTC
Pt 12 Rag AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC TAAAAAATTC
Ptm 13 Rag AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC TAAAAAATTC
Ptm 14 Rag AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC TAAAAAATTC
Paraguai R AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC CTAAAAATTC
Maranhao AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC CTAAAAATTC
Amazonas R AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC CTAAAAATTC
Pin 1 RAG AAACACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC CTAAAAATTC
Pin 2 RAG AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC CTAAAAATTC
Pin 3 Rag AAAGACAATT GAAAAATCAT ATAAAACATT CAAGAAACCC CTAAAAATTC

....|....||....||....||....||....|

660 670 680 690 700

Ptm 8 rag ACCCTTAAAA ATTCACGTTA TACAATTCTG TTCAGGTCTT TATGCCGCTT
Ptm 9 rag ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGCG??TTCT
Ptm 10 rag ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGCG??TTCT
Ptm 11 RAG ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGCG??TTCT
Pt 12 Rag ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGCG??TTCT

Ptm 13 Rag ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGCG??TTCT
Ptm 14 Rag ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGCG??TTCT
Paraguai R ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGTG??TTCT
Maranhao ATGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGTG??TTCT
Amazonas R ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGTG??TTCT
Pin 1 RAG ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGGTGTTTCT
Pin 2 RAG ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGGTGTTTCT
Pin 3 Rag ACGTTATACA ATTCTGTTCA GGTCTTTATG CCGCTTATGT GGTG??TTAT

....|....||....||....||....||....|
 710 720 730 740 750

Ptm 8 rag ATGTGGCGTT CTTCTGAGAA AAGCAAAGG TCGAGAGCAT GAAGTCCAGG
Ptm 9 rag TCTGAGAAAA GCAAAAGGTC GAGAGCATGA AGTCCAGGGC GAGCTGGATG
Ptm 10 rag TCTGAGAAAA GCAAAAGGTC GAGAGCATGA AGTCCAGGGC GAGCTGGATG
Ptm 11 RAG TCTGAGAAAA GCAAAAGGTC GAGAGCATGA AGTCCAGGGC GAGCTGGATG
Pt 12 Rag TCTGAGAAAA GCAAAAGGTC GAGAGCATGA AGTCCAGGGC GAGCTGGATG
Ptm 13 Rag TCTGAGAAAA GCAAAAGGTC GAGAGCATGA AGTCCAGGGC GAGCTGGATG
Ptm 14 Rag TCTGAGAAAA GCAAAAGGTC GAGAGCATGA AGTCCAGGGC GAGCTGGATG
Paraguai R TCTGAGAAAA GCAAAAGGTC GAGAGCATGA AGTCCAGGGC GACCTGGATG
Maranhao TCTGAGAAAA GCAAAAGGTC GAGAGCATGA AGTCCAGGGC GACCTGGATG
Amazonas R TCTGAGAAAA GCAAAAGGTC GAGAGCATGA AGTCCAGGGC GACCTGGATG
Pin 1 RAG TCTGACAAAA AAAAAA???? ?????????? ?????????? ??????????
Pin 2 RAG TCTGAGAAAA GCAAAA???? ?????????? ?????????? ??????????
Pin 3 Rag TGTGAGAAAA GCAAAA???? ?????????? ?????????? ??????????

....|....||....|
 760 770

Ptm 8 rag GCGAGCTGGA TGAGTCCAGC AAAP
Ptm 9 rag AGTCCAGCAA ATATGCT...
Ptm 10 rag AGTCCAGCAA ATATGCT...
Ptm 11 RAG AGTCCAGCAA ATATGCT...
Pt 12 Rag AGTCCAGCAA ATATGCT...
Ptm 13 Rag AGTCCAGCAA ATATGCT...
Ptm 14 Rag AGTCCAGCAA ?TATCT?...
Paraguai R AGTCCAGCAA ATATGCT...
Maranhao AGTCCAGCAA ATATGCT...
Amazonas R AGTCCAGCAA ATATGCT...
Pin 1 RAG ?????????? ????????...
Pin 2 RAG ?????????? ????????...
Pin 3 Rag ?????????? ????????...