

Caracterización genética de lotes de peces usados en programas de repoblamiento y su importancia en la conservación genética en la piscicultura

Nelson M. Lopera Barrero^{1*}, Ricardo Pereira Ribeiro¹, Jayme A. Povh², Patrícia C. Gomes¹, Lauro Vargas¹ y Sheila Nogueira de Oliveira¹

¹ Universidade Estadual de Maringá, Grupo de Pesquisa PeixeGen, Centro de Ciências Agrárias, Av. Colombo, 5790, Bloco J45, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil. *Correo electrónico: nelson.peixegen@gmail.com.

² Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Exatas e Naturais. Rodovia Rondonópolis-Guiratinga, km 06. CEP 78735-910. Rondonópolis, MT. Brasil.

RESUMEN

En las últimas décadas se ha verificado la desaparición de varias especies de peces debido principalmente a impactos generados por acciones humanas. Programas de repoblamiento vienen siendo cada vez más usados como métodos de conservación de la ictiofauna. Sin embargo, sin una correcta orientación genética y reproductiva de los lotes utilizados en estos programas, poblaciones naturales de peces y el ecosistema pueden ser afectados. El objetivo del siguiente estudio fue determinar la variabilidad genética de seis lotes de peces usados en programas de repoblamiento, mediante el marcador molecular RAPD. Se analizaron 180 alevines de tres especies de peces (*Leporinus elongatus*, *Piaractus mesopotamicus* y *Prochilodus lineatus*) en tres estaciones piscícolas, ubicadas en las ciudades de Rolândia, Andirá y Palotina en el estado de Paraná, Brasil. Los valores de variabilidad genética estimados por el porcentaje de fragmentos polimórficos y por el índice de diversidad de Shannon mostraron una alta variabilidad genética entre los lotes de *L. elongatus* y *P. lineatus*, debido posiblemente al efecto fundador y al manejo reproductivo adoptado en cada piscícola. Se determinó que existió baja diferenciación genética entre los lotes de *P. mesopotamicus*. Los resultados de este estudio posibilitaran el correcto manejo reproductivo y genético de los lotes de cada piscícola y la orientación objetiva de programas de repoblamiento, permitiendo la conservación de la variabilidad genética, factor de gran importancia en ambientes en cautiverio.

Palabras clave: *Leporinus elongatus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus*, repoblamiento, variabilidad genética.

Genetic characterization of fish stocks used in stocking programs and their importance in the fish farm genetic conservation

ABSTRACT

In the last decades it has been verified the decrease and extinction of fish several species mainly to impacts generated by human actions. Stocking programs are being used as conservation methods of the ichthyofauna. However, without a correct genetic and reproductive orientation of the stocks used in these programs, natural fish populations and the ecosystem can be affected. The objective of the following study was to determine the genetic variability of six fish stocks used in stocking programs, by means of the RAPD molecular marker. There were analyzed 180 juveniles of three fish species (*Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus*, and *Leporinus elongatus*) from three fish farms, located in the Rolândia, Andirá, and Palotina cities in Paraná state, Brazil. The genetic variability values estimated by the percentage of polymorphic fragments and by the Shannon diversity index showed a high genetic variability between the *P. lineatus* and *L. elongatus* stocks, due possibly

to the founder effect and the reproductive management adopted in each fish farm. It was determined that low genetic differentiation existed among the *P. mesopotamicus* stocks. The results of this study facilitated the correct reproductive and genetic management of the stocks of each fish farm and the objective orientation of stocking programs, allowing the conservation of the genetic variability, factor of great importance in captivity environments.

Keywords: genetic variability, *Leporinus elongatus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus*, stocking.

INTRODUCCIÓN

La deforestación y su consecuente reducción de las fuentes de alimento, la construcción de hidroeléctricas y drenajes para el área agrícola (Hatanaka *et al.*, 2006), la degradación de la calidad del agua en función de la contaminación (Hori *et al.*, 2006), el ecoturismo mal planeado (Sabino y Andrade, 2003) y la falta de conocimiento taxonómico (Agostinho *et al.*, 2005) han llevado a la disminución y extinción de varias especies de peces en los últimos años.

Entre esas especies, *Leporinus elongatus*, *Piaractus mesopotamicus* y *Prochilodus lineatus*, peces migratorios nativos brasileños conocidos regionalmente como piapara, pacu y curimba (Furuya, 2001), vienen presentando una reducción progresiva de sus poblaciones naturales en consecuencia de las mudanzas ambientales generadas principalmente por acciones humanas.

De las diversas herramientas empleadas para reducir esos impactos sobre las poblaciones de peces, la práctica de repoblamiento de los ríos viene tornándose cada vez más común (Hilsdorf *et al.*, 2006; Agostinho y Gomes, 2006). Sin embargo, sin un apoyo científico que permita su correcta orientación, estos programas pueden tornarse en una amenaza mayor para los ecosistemas y para las poblaciones naturales de peces (Agostinho *et al.*, 2005).

Los análisis genéticos de lotes de pisciculturas representan informaciones de gran importancia para conseguir resultados expresivos en la producción y en la conservación de peces (Lopera Barrero, 2007), ya que la pérdida de variabilidad genética en lotes de estaciones piscícolas debido al inadecuado manejo reproductivo (Frost *et al.*, 2006) o por deficiencias en el número efectivo de reproductores (Aho *et al.*, 2006) puede producir problemas de endogamia, adaptabilidad y supervivencia de progenies usadas en programas de repoblamiento (Povh *et al.*, 2008). Esos problemas pueden consecuentemente afectar

las poblaciones naturales de peces (Sønstebo *et al.*, 2007) y el ecosistema en general, pudiendo conducir la especie a la extinción (Agostinho *et al.*, 2005).

Por tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la variabilidad genética de seis lotes de peces usados en programas de repoblamiento, mediante el marcador molecular RAPD. Los resultados permitirán orientar objetivamente estos programas realizados en ríos brasileños y así evitar la pérdida de variabilidad genética en los lotes de reproductores, en las progenies usadas en programas de repoblamiento y en las poblaciones naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Muestras de aleta caudal (30 de cada lote) fueron recolectadas en seis lotes de alevinos de piscícolas ubicadas en las ciudades de Rolândia (dos lotes de *L. elongatus* y uno de *P. mesopotamicus* y *P. lineatus*), Palotina (un lote de *P. mesopotamicus*) y Andirá (un lote de *P. lineatus*), en el estado del Paraná, Brasil, los cuales son usados en programas de repoblamiento de los ríos Paraná y Paranapanema (Figura 1).

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó la metodología descrita por Lopera-Barrero *et al.* (2008). En microtubos conteniendo las aletas, se adicionaron 550 μ L de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl y 1% SDS) y 7 μ L de proteinasa K (200 μ g/mL). Se incubaron en baño-maría a 50°C por 12 h. El ADN se lavó con 600 μ L de solución de NaCl (5 M) y se centrifugó por 10 min a 12.000 rpm. El sobrenadante conteniendo el ADN se transfirió para nuevos micro-tubos, se precipitó con 700 μ L de alcohol etílico absoluto e se incubó por 1 h a -20°C. El ADN se centrifugó, se lavó con 700 μ L de alcohol etílico 70%, se suspendió en 80 μ L de tampón TE (10 mM Tris pH 8,0 y 1 mM EDTA) y se trató con

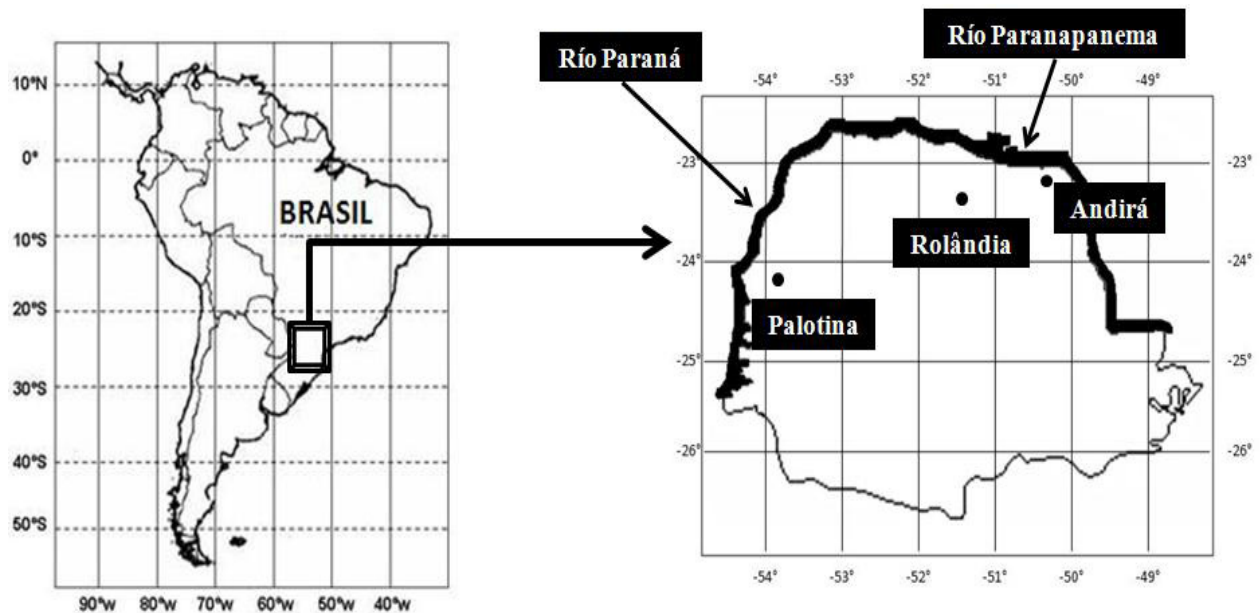


Figura 1. Ubicación de las piscícolas de las ciudades de Rolândia, Andirá y Palotina y de los ríos Paraná y Paranapanema (Paraná, Brasil).

7 μL de RNAsa (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en baño-maría a 37°C por 1 h. Se guardó en el congelador a -20°C.

Cuantificación y amplificación del ADN

El ADN se cuantificó en espectrofotómetro Shimadzu (UV 1601, EE.UU.) con amplitud de onda de 260 nm. Las muestras se diluyeron para una concentración de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Para confirmar la calidad del ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1%, conducida en tampón TBE 1X (500 mM Tris-HCl, 60 mM ácido bórico y 83 mM EDTA) por 1 h a 70 V.

Las condiciones de amplificación se basaron en los procedimientos descritos por Williams *et al.* (1990), con modificaciones. El ADN genómico se amplificó en un volumen de reacción de 15 μL , en el cual se utilizó tampón 1X Tris-KCl, 2,5 mM de MgCl_2 , 0,46 μM de iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, una unidad de Platinun Taq ADN Polimerasa (Invitrogen®, EE.UU.) y 10 ng de ADN. El ADN se desnaturó a 94°C por 4 min y enseguida se realizaron 40 ciclos, cada uno consistiendo de 1 min de desnaturación a 94°C, 90 seg de anelamiento del iniciador a 40°C y 2 min para extensión a 72°C. Después se realizó una extensión final a 72°C por 5 min. Las reacciones de RAPD

se amplificaron en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, EE.UU.).

Se evaluó la amplificación de 60 diferentes iniciadores de 10 bases de los kits OPA OPX y OPW (Operon Technologies Ltd., EE.UU.) siendo escogidos los que presentaron mejor definición y reproductibilidad. Los productos de amplificación se separaron en gel de agarosa 1,5%. Se utilizaron 15 μL del producto amplificado y 2 μL de tampón de muestra (40% sacarosa y 0,25% azul de bromofenol) en electroforesis horizontal. La electroforesis se condujo en tampón TBE 0,5X (45 mM Tris-Borato y 1 mM EDTA) por 4 h a 70 V. Los geles de cuantificación y amplificación se visualizaron sobre radiación UV, después de su exposición con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 1 h. La imagen se fotografió utilizando el programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5, EE.UU.).

Análisis estadístico

El tamaño de los fragmentos obtenidos con las amplificaciones se estimó por comparación con el padrón ladder 100 pb (Invitrogen®, EE.UU.). La presencia o ausencia de fragmentos de tamaños moleculares idénticos se usó para la construcción de una matriz con base en el cálculo del coeficiente de

similitud de Jaccard, codificando 1 como presencia de fragmento y 0 como su ausencia. La variabilidad genética se determinó por el porcentaje de fragmentos polimórficos y por el índice de diversidad genética de Shannon a través del programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ocho iniciadores seleccionados OPA16 (5'-AGCCAGCGAA-3'), OPW01 (5'-CTCAGTGTC-3'), OPW02 (5'-ACCCCGCCAA-3'), OPW03 (5'-GTCCGGAGTG-3'), OPW08 (5'-GACTGCCTCT-3'), OPW19 (5'-CAAAGCGCTC-3'), OPX01 (5'-CTGGGCACGA-3') y OPX03 (5'-TGCGCAGTG-3') produjeron un total de 70 fragmentos, con tamaños entre 200 a 1200 pb.

La variabilidad genética, estimada por el valor de fragmentos polimórficos (FP) y por el índice de diversidad genética de Shannon (IS), fue alta entre los lotes de *L. elongatus* y de *P. lineatus*. Por otro lado, fue encontrada baja diferenciación genética entre los lotes de *P. mesopotamicus* de las ciudades de Rolândia y Palotina (Figura 2 y 3).

Según Moreira *et al.* (2007), una pérdida de variabilidad genética en la piscicultura siempre es esperada cuando existe un mal manejo reproductivo debido al cruzamiento de individuos emparentados, lo que consecuentemente aumenta el coeficiente de endogamia (Kang *et al.*, 2006) y reducirá el número efectivo de reproductores (Frost *et al.*, 2006). Esta situación es bastante común en piscícolas, ya que el método más ampliamente usado en la formación de nuevos lotes es la selección de individuos con características visuales favorables (de mayor tamaño y con mejores condiciones reproductivas), involucrando de esa forma el efecto boca de botella (bottleneck effect) donde debido a esa selección intencional pueden presentarse problemas de endogamia por el alto relacionamiento genético entre los individuos, ocasionando pérdida de la variabilidad genética en los reproductores (Aho *et al.*, 2006) y en sus progenies.

En nuestros resultados observamos que este efecto no influenció los lotes de *L. elongatus* a pesar de pertenecer a la misma piscícola, siendo encontrados altos valores de variabilidad genética entre ellos (%FP = 86,96 y 76,74; IS = 0,444 y 0,425). Esto demuestra que hubo un buen manejo reproductivo, donde la formación de lotes con suficiente variabilidad genética

(efecto fundador), la introducción de reproductores genéticamente divergentes y de diferentes orígenes (Freitas y Galetti Jr, 2005) y la utilización de sistemas reproductivos y de cruzamientos eficientes (Lopera Barrero, 2007; Povh, 2007) posiblemente permitió mantener el pool genético de lotes mantenidos en ambientes controlados y así poder usarlos correctamente con fines de repoblamiento.

Igualmente, al analizar los lotes de *P. lineatus* de las piscícolas de las ciudades de Rolândia y Andirá se observó que hubo una alta diferenciación genética entre ellos (%FP=85,71 y 80; IS=0,498 y 0,448). Este resultado puede ser atribuido al efecto fundador, ya que las piscícolas fueron formadas a partir de poblaciones naturales de peces recolectadas en el río Paraná y Paranapanema, respectivamente, existiendo una diferenciación geográfica y de manejo. Gomes (2007) al analizar tres lotes de *L. elongatus* usados en programas de repoblamiento, encontró igualmente una alta variabilidad genética entre ellos debida principalmente al efecto fundador y al eficiente manejo reproductivo de los lotes.

Por otro lado, al analizar los lotes de *P. mesopotamicus* de las piscícolas de Rolândia y Palotina no fue verificada una alta variabilidad genética entre ellos (%FP=76,12 y 75; IS=0,438 y 0,425). Caso contrario al observado en los lotes de *P. lineatus*, los lotes de *P. mesopotamicus* fueron formados a partir de poblaciones naturales de peces recolectados en diferentes localidades del río Paraná, siendo posible que exista una similitud genética entre ellos por la existencia de flujo génico. Esta situación es común en poblaciones naturales, como fue verificado por Leuzzi *et al.* (2004), los cuales al analizar poblaciones de *Astyanax altiparanae* de dos reservorios del río Paranapanema encontraron que hubo flujo génico entre poblaciones separadas geográficamente. Entre tanto, no es posible hacer inferencias al respecto de la validez de esta teoría ya que no hay registros sobre el lugar exacto donde los reproductores fueron capturados. Otra explicación a estos resultados puede ser la pérdida de variabilidad genética que para algunos autores es normalmente irreversible (Wasko *et al.*, 2004; Sekino *et al.*, 2004), lo que consecuentemente aumentó la similitud genética entre los individuos de los dos lotes.

Los resultados encontrados en este estudio son de gran importancia, ya que a partir de ellos el manejo

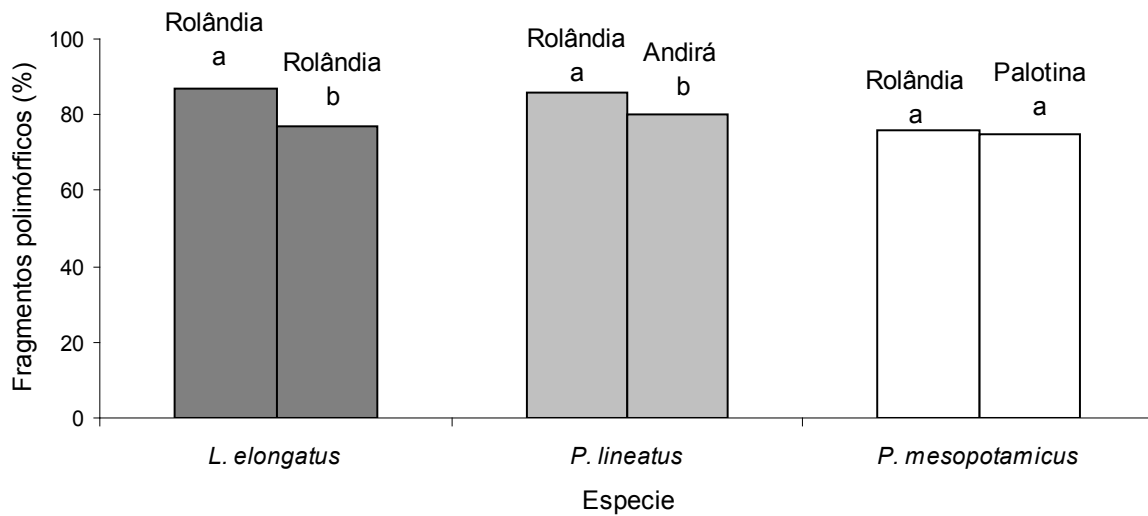


Figura 2. Fragmentos polimórficos obtenidos para los lotes de alevines de *L. elongatus* (Rolândia), *P. lineatus* (Rolândia y Andirá) y *P. mesopotamicus* (Rolândia y Palotina).

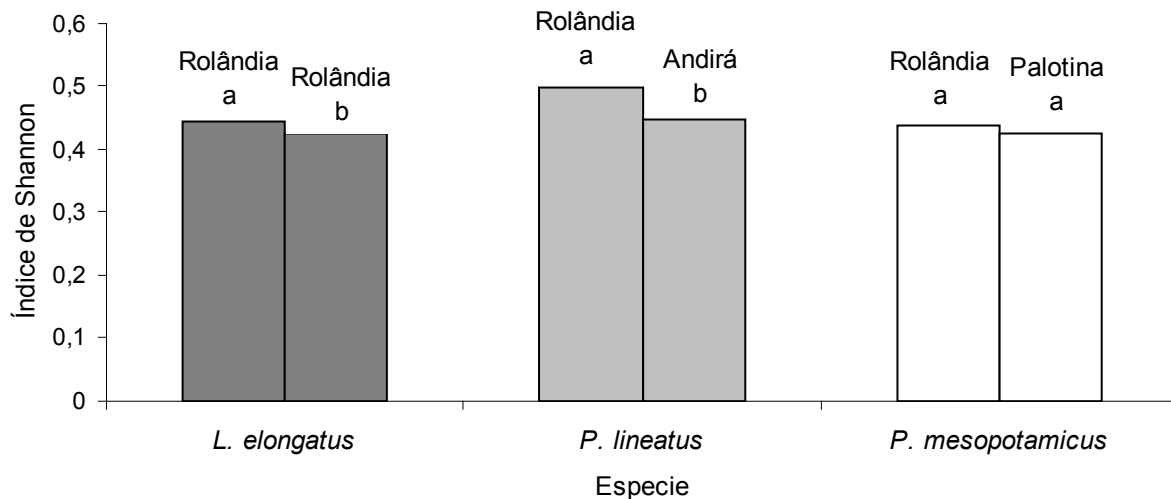


Figura 3. Índice de diversidad genética de Shannon obtenido para los lotes de alevines de *L. elongatus* (Rolândia), *P. lineatus* (Rolândia y Andirá) y *P. mesopotamicus* (Rolândia y Palotina).

reproductivo de esos lotes utilizados en programas de repoblamiento pueden ser orientados correctamente y con mayor objetividad. Las especies de importancia comercial y especialmente aquellas amenazadas de extinción como es el caso de las analizadas en este estudio, requieren un constante monitoreo genético de sus lotes mantenidos en las piscícolas y de sus poblaciones naturales. La disminución de la

variabilidad genética puede tornar un programa de repoblamiento ineficiente (baja supervivencia de los juveniles en el ambiente acuático) y proporcionar impactos genéticos irreversibles en las poblaciones nativas (Povh *et al.*, 2008) que pueden llegar a la extinción de especies. Según Sønstebø *et al.* (2007) y Melo *et al.* (2006), el cruzamiento de individuos genéticamente distintos a aquellos encontrados en

una población natural puede promover la pérdida de genes importantes de adaptabilidad al ambiente, que puede influenciar en la supervivencia de progenies en el ambiente natural.

A partir de estas evidencias y de los resultados de variabilidad genética, podemos sugerir que el manejo reproductivo, genético y de mejoramiento de los lotes de *P. mesopotamicus* de la región de Rolândia y Palotina deben ser realizados de manera homogénea, como unidades genéticamente iguales y no como lotes separados. Así mismo, para aumentar la variabilidad genética de esos lotes, es necesaria la introducción de nuevo material genético (reproductores), los cuales pueden ser capturados a partir de poblaciones naturales genéticamente diferentes de los ríos Paraná o Paranapanema o también con el intercambio de reproductores entre otras estaciones piscícolas, pudiendo contribuir con un pool genético que permita la preservación de la variabilidad genética. Es recomendable realizar esta introducción e intercambio de reproductores siempre basado en análisis genéticos, ya que puede ocurrir depresión exogámica cuando los individuos son muy diferentes. De esta forma, la correcta selección de los reproductores que serán usados en la formación del lote de una piscícola y el monitoreo genético de estos pueden ofrecer bases importantes para formular estrategias de manejo reproductivo (Sønstebø *et al.*, 2007), las cuales permitirán un intercambio de reproductores entre las estaciones piscícolas y de esa forma fragmentar ciclos de endogamia que son comunes en ambientes controlados (Moreira *et al.*, 2007) y que pueden definir la conservación de una especie y su futuro potencial biológico (Melo *et al.*, 2006). Por esta razón, la primera providencia a ser tomada en la implantación de una piscícola o de programas de repoblamiento, como es el caso para los lotes de *L. elongatus*, *P. lineatus* y *P. mesopotamicus* analizados en este estudio, es verificar la diversidad genética de ellos, de las progenies y de las poblaciones naturales en todos los periodos del año, evitando la pérdida de variabilidad genética y de adaptabilidad en los lotes y poblaciones naturales de peces y al mismo tiempo verificando la eficacia de este tipo de programa de conservación y sus posibles efectos adversos en la ictiofauna y en el ecosistema. Con ese objetivo, se recomienda la participación multidisciplinar junto con la participación de la sociedad, que permita

direccionar científicamente la conservación (Lopera-Barrero *et al.*, 2007).

De la misma forma, Sirol y Britto (2006) enfatizan también que la definición de cuales especies deben ser repobladas debe basarse en su importancia socio-cultural en el ambiente y principalmente en la capacidad de formar una población sustentable, que no afecte el ciclo de vida de otras especies y la biodiversidad presente en el ecosistema. Entre tanto, además del monitoreo de la variabilidad genética y de la estructura genética de todas las poblaciones de peces presentes en condiciones de cautiverio y en el ambiente natural, factores como la preservación de los bosques, la protección de los ríos, el control de la pesca y la participación de la sociedad y de las entidades publicas y privadas deben ser considerados para alcanzar la conservación del ecosistema y el éxito de los programas de repoblamiento (Lopera-Barrero *et al.*, 2007).

Con los resultados de este estudio fue posible obtener un perfil de los lotes de alevinos de estas piscícolas, su caracterización genética y la objetiva orientación genética y reproductiva que permitirá la correcta conservación de la variabilidad genética del *L. elongatus*, *P. lineatus* y *P. mesopotamicus*. Para eso, el marcador molecular RAPD se mostró eficaz y ofreció buenos resultados.

CONCLUSIONES

Los valores de variabilidad genética mostraron una alta variabilidad genética entre los lotes de *L. elongatus* y *P. lineatus*, debido posiblemente al efecto fundador y al manejo reproductivo adoptado en cada piscícola. Se determinó igualmente que existió baja diferenciación genética entre los lotes de *P. mesopotamicus*. Los resultados permitirán orientar objetivamente estos lotes de peces utilizados en programas de repoblamiento y así evitar la pérdida de variabilidad genética en los reproductores y en las progenies.

LITERATURA CITADA

- Agostinho A.A., S.M. Thomaz y L.C. Gomes. 2005. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conserv. Biol.*, 19(3): 646-652.
- Agostinho A.A. y L.C. Gomes. 2006. O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. *En Nogueira*

- M.G., R. Henry y A. Jorcin. (Eds). Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascatas. RiMA, São Carlos, Brasil. pp. 23-55.
- Aho T., J. Rönn, J. Piironen y M. Björklund. 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture*, 253(1-4): 244-248.
- Freitas P.D. y P.M. Galetti Jr. 2005. Assessment of the genetic diversity in five generations of commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *Afr. J. Biotechnol.*, 4(12): 1362-1367.
- Frost L.A., B.S. Evans y D.R. Jerry. 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 261(3): 1056-1064.
- Furuya W.M. 2001. Espécies nativas. *En* Moreira H.L.M., L. Vargas, R.P. Ribeiro y S. Zimmermann (Eds). Fundamentos da Moderna Aqüicultura. ULBRA, Canoas, Brasil, pp. 83-90.
- Gomes P.C. 2007. Diversidade genética de três populações de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando marcadores moleculares. Tesis M. Sc. Univ. Esta. Maringá. Maringá, Brasil.
- Hilsdorf A.W.S., E.K. Resende y D.K.S. Marques. 2006. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Embrapa Pantanal, Brasil.
- Hori T.S.F., I.M. Avilez, L.K. Inoue y G. Moraes. 2006. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 143 (1): 67-72.
- Hatanaka T., F. Henrique-Silva y P.M. Galetti Jr. 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126(1-2): 513-517.
- Kang J.H., J.K. Noh, J.H. Kim, J.H. Lee, H.C. Kim, K.K. Kim, B.S. Kim y W.J. Lee. 2006. Genetic relationship between broodstocks of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) using microsatellite markers. *Aquac. Res.*, 37(7): 701-707.
- Leuzzi M.S.P., F.S. Almeida, M.L. Orsi y L.M.K. Sodré. 2004. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, 27(3): 355-362.
- Lopera Barrero N.M. 2007. Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. Tesis PhD. Univ. Est. Maringá. Maringá, Brasil.
- Lopera-Barrero N.M., R.P. Ribeiro y J.A. Povh. 2007. O repovoamento de peixes: uma estratégia multidisciplinar?. *Pesca & Aqüicult.*, 30(1): 71-74.
- Lopera-Barrero N.M., J.A. Povh, R.P. Ribeiro, P.C. Gomes, C.B. Jacometo y T.S. Lopes. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sódio. *Cien. Inv. Agr.*, 35(1): 77-86.
- Melo D.C., D.A.A. Oliveira, L.P. Ribeiro, C.S. Teixeira, A.B. Souza, E.G.A. Coelho, D.V. Crepaldi y E.A. Teixeira. 2006. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58(1): 87-93.
- Moreira A.A., A.W.S. Hilsdorf, J.V. Silva y V.R. Souza. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. *Pesqui. Agrope. Bras.*, 42(4): 521-526.
- Povh J.A. 2007. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Tesis PhD. Univ. Est. Maringá. Maringá, Brasil.
- Povh J.A., N.M. Lopera Barrero, R.P. Ribeiro, E. Lupchinski Jr, P.C. Gomes y T.S. Lopes. 2008. Monitorio genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Cien. Inv. Agr.*, 35(1): 5-15.
- Sabino J. y L.P. Andrade. 2003. Uso e conservação da ictiofauna no ecoturismo na região de Bonito, Mato Grosso do Sul: o mito da sustentabilidade

- ecológica no rio Baía Bonita (Aquário natural de Bonito). *Biota Neotrop.*, 3(2): 1-9.
- Sekino M., T. Sugaya, M. Hara y N. Taniguchi. 2004. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult.*, 233(1-4): 163-172.
- Sirol R.N. y S.G. Britto. 2006. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. *En* Nogueira M.G., R. Henry y A. Jorcin (Eds.). *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascatas*. RiMA, São Carlos, Brasil, pp. 275-284.
- Sønstebø J.H., R. Borgstrøm y M. Heun. 2007. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. *Conserv. Genet.*, 8(1): 33-44.
- Wasko A.P., C. Martins, C. Oliveira, J.A. Senhorini y F. Foresti. 2004. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmers. *J. Appl. Ichthyol.*, 20(1): 48-52.
- Williams J.G.K., J.A. Rafalski, A.R. Kubelik, K.J. Livak y S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18(22): 6531-6535.
- Yeh F.C., T.Y.Z. Boyle y J.M. Xiyan. 1999. PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research. Alberta. Canada.