

Diversidad genética de *Brycon orbignyanus* en el sistema reproductivo semi-natural, utilizando el marcador RAPD

Nelson Mauricio Lopera Barrero^{1*}, Ricardo Pereira Ribeiro², Jayme Aparecido Povh³, Lauro Vargas², Darci Carlos Fornari², Rodolfo Nardez Sirol⁴ y María del Pilar Rodríguez Rodríguez²

¹ Pesquisador do Aquapeq e do Núcleo de Pesquisa PeixeGen. Universidad Federal de Mato Grosso. Rodovia Rondonópolis-Guiratinga, km 06 (MT-270), 78735-910, Rondonópolis, MT, Brasil. *Correo Electrónico: nelson.peixegen@gmail.com.

² Universidade Estadual de Maringá, Núcleo de Pesquisa PeixeGen, Centro de Ciências Agrárias, Av. Colombo, 5790, Bloco J57, Sala 8b, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil..

³ Universidade Federal de Mato Grosso. Rodovia Rondonópolis-Guiratinga, km 06 (MT-270), 78735-910, Rondonópolis, MT, Brasil.

⁴ Gerente de Meio Ambiente, CPFL Geração, SP, Brasil.

RESUMEN

Los programas de repoblamiento de ríos vienen siendo usados con mayor frecuencia como métodos de conservación de la ictiofauna. Sin embargo, el monitoreo genético y evaluación de procedimientos reproductivos son necesarios para obtener resultados viables en los ecosistemas impactados negativamente por el hombre. El objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética de *Brycon orbignyanus* utilizado en programas de repoblamiento, en el sistema reproductivo semi-natural (SRSN), con el marcador RAPD. Fueron analizados 15 reproductores (Rp; 10 machos y 5 hembras) y 95 larvas de la progenie. El SRSN permitió la obtención de una baja mortalidad de los Rp utilizados en el cruzamiento y todos presentaron desova/espermiación. Los 9 iniciadores utilizados produjeron 90 fragmentos (fg), de los cuales 73,33% fueron polimórficos. Encontrándose diferencias ($P < 0,05$) en la frecuencia de 17 fg, sin la presencia de fg exclusivos. El índice de diversidad genética de Shannon y porcentaje de fg polimórficos fueron inferiores en los individuos de la progenie. La similitud genética fue mayor en la progenie. El análisis de variancia molecular mostró que la mayor parte de la variación está dentro de cada lote (81,49%) y no entre los lotes (18,51%). La identidad y distancia genética fue 0,953 y 0,049, respectivamente. A pesar que el SRSN permitió la obtención de una baja mortalidad y adecuado comportamiento reproductivo de los Rp, hubo disminución de la variabilidad genética en la progenie por el efecto del bajo número de Rp utilizados durante la reproducción y por la baja variabilidad genética existente entre ellos.

Palabras clave: Brasil, conservación genética, peces, programas de repoblamiento, RAPD-PCR, variabilidad genética.

Genetic diversity of *Brycon orbignyanus* in the semi-natural reproductive system, using the RAPD marker

ABSTRACT

The stock enhancement programs are being used more frequently as methods of fish conservation. However, the genetic monitoring and the reproductive procedures evaluation are necessary to achieve viable and reliable results. The purpose of this study was to analyze the genetic diversity of *Brycon orbignyanus* used in stock enhancement programs, in the semi-natural reproductive system, with the RAPD marker. Fifteen broodstocks (10 male and 5 female) and 95 larvae of the offspring were analyzed. The semi-natural reproductive system allowed

the obtaining of a low mortality of the broodstocks using in the mating and all presented spawning/spermiation. The nine primers used yielded 90 fragments, of which 73,33% were polymorphic. Differences ($P < 0,05$) in the frequency of 17 fragments were observed, without the presence of exclusive fragments. The Shannon genetic diversity index and percentage of polymorphic fragments were lower in the offspring individuals. Genetic similarity was higher in the offspring. The analysis of molecular variance results showed that the major part of the genetic variation is within the groups (81,49%) and not between them (18,51%). The identity and genetic distance among the groups were 0,953 and 0,049; respectively. In spite of the semi-natural reproductive system to allow the decrease of mortality and an appropriate reproductive broodstocks behavior, was decrease of the genetic variability in the offspring for the effect of the small number of broodstocks used during the reproduction and for the low existent genetic variability among them.

Keywords: Brazil, fish, genetic conservation, genetic variability, RAPD-PCR, stock enhancement programs.

INTRODUCCIÓN

La deforestación, reducción de las fuentes de alimento, construcción de hidroeléctricas y sistemas de drenajes para agricultura (Hatanaka *et al.*, 2006), degradación de la calidad del agua en consecuencia de la contaminación (Hori *et al.*, 2006) y la falta de conocimiento taxonómico (Agostinho *et al.*, 2005) son algunas de las principales causas que han llevado a la disminución y extinción de varias especies de peces en las últimas décadas.

Una de las especies que ha despertado un gran interés de investigadores y productores debido a su drástica reducción es el *Brycon orbignyanus*. Conocido regionalmente en el Brasil como Piracanjuba o Bracanjuba (Orden Characiformes, familia Characidae, subfamilia Bryconinae), este pez migratorio característico de las cuencas del río Paraná y Uruguay (Zaniboni-Filho *et al.*, 2006) es catalogado como especie en vía de extinción (Machado, 2005).

De las diversas herramientas utilizadas para reducir los impactos negativos provocados sobre las poblaciones de peces, la práctica del repoblamiento de los ríos viene tornándose cada vez más común (Hilsdorf *et al.*, 2006; Agostinho y Gomes, 2006). Entretanto, sin un soporte científico que permita su correcta orientación, estos programas pueden volverse una amenaza mayor para el ecosistema y la ictiofauna (Agostinho *et al.*, 2005; Lopera-Barrero *et al.*, 2007).

El abordaje genético de lotes mantenidos en cautiverio monitoreados por marcadores moleculares, por ejemplo, el RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), representa informaciones importantes para conseguir avances en su

conservación, manejo y producción. Según Aho *et al.* (2006), debido al inadecuado manejo reproductivo ha ocurrido una pérdida de variabilidad genética de los lotes de peces en la piscicultura, intensificando su efecto de forma que el componente genético de los descendientes se va homogenizando, hasta diferenciarse de las poblaciones naturales (Pineda-Santis, 2004).

La pérdida de variabilidad genética en consecuencia puede llevar a problemas de adaptabilidad y sobrevivencia de progenie usadas en programas de repoblamiento (Lopera-Barrero *et al.*, 2008a). Esos problemas pueden consecuentemente afectar las poblaciones naturales de peces (Sønstebo *et al.*, 2007) y el ecosistema en general, pudiendo conducir una especie a la extinción (Agostinho *et al.*, 2005).

En adición a los análisis genéticos, la optimización del manejo reproductivo debe ser también realizada, ya que prácticas de cruzamientos con un número insuficiente de reproductores (Rp) o con diferentes sistemas reproductivos (SR) puede ocasionar problemas al promover la pérdida de variabilidad genética (Melo *et al.*, 2006; Povh, 2007).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue analizar la diversidad genética de *Brycon orbignyanus* utilizado en programas de repoblamiento del río Paranapanema con el marcador molecular RAPD, en el sistema reproductivo semi-natural (SRSN).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron 15 Rp (10 machos y 5 hembras) de *B. orbignyanus* seleccionados de un lote de 136 individuos, mantenidos en cautiverio hace 6 años

en las instalaciones de la Estación de Acuicultura e Hidrología de la Duke Energy International (Geração Paranapanema), ubicada en la ciudad de Salto Grande - SP, Brasil. Esos individuos son originarios de la primera generación de un lote perteneciente a una piscicultura ubicada en la ciudad de Castilho (SP), los cuales son utilizados en programas de repoblamiento realizados en el río Paranapanema (Figura).

Inducción hormonal y reproducción

El experimento se realizó en las instalaciones de la Duke Energy International. Los Rp fueron trasladados para el laboratorio e inducidos a reproducción con extracto de hipófisis de carpa. Las hembras recibieron 5,5 mg/kg, divididos en 2 aplicaciones, siendo 10% del total en la primera aplicación y 12 h después los 90% restantes. Los machos recibieron 2,5 mg/kg en dosis única. Utilizándose el SRSN.

Después de la inducción hormonal, los Rp se colocaron en un estanque circular con un radio de 5,1 m y 1,85 m de profundidad media, abastecido por un flujo de agua continuo (131 l/s) en dos sentidos. El direccionamiento del agua en la porción central del estanque mediante un tubo de 6 pulgadas permitió

el traslado de los huevos para una estación colectora, donde los mismos fueron vertidos en una incubadora cilindro-cónica de captación de 200 l con flujo continuo de agua (7 l/s) y enseguida fueron llevados a incubadoras individuales cilindro-cónicas de 60 l aproximadamente 6 h después de la última inducción (160 h-grado, 27 °C) se inició la colecta de huevos. Estableciéndose un período de colecta máximo 6 h, con la retirada de los huevos de la incubadora de captación a cada h, ubicándolos en las incubadoras de 60 l donde ocurrió la incubación.

Después de las 6 h fue verificado por presión abdominal si los machos y hembras utilizados desovaron completamente (la falta de salida de gametos indicaba que ocurrió liberación total de gametos). De todos los individuos se colectaron muestras de aleta caudal (0,5 cm² aproximadamente) y fueron almacenadas en microtubos de 1,5 ml conteniendo alcohol etílico absoluto para la posterior extracción y amplificación del ADN. El porcentaje de mortalidad de los Rp usados en los cruzamientos se definió un día después de la reproducción.

Tres días más tarde de la eclosión de los huevos, aproximadamente 200 larvas se recolectaron de

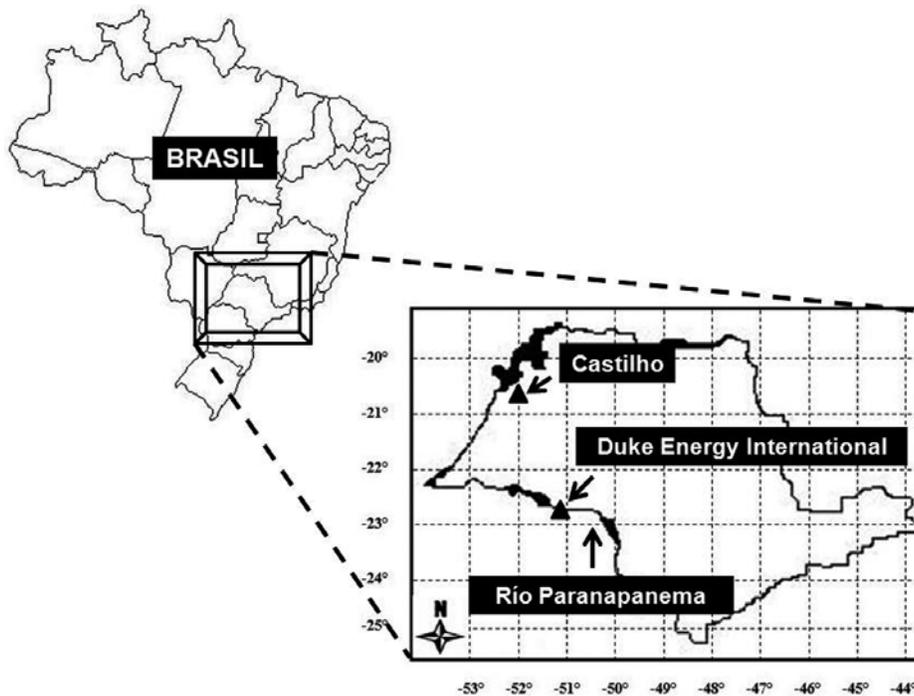


Figura. Ubicación de la ciudad de Castilho y de la Estación de Acuicultura e Hidrología de la Duke Energy Internacional (Geração Paranapanema) en el Estado de São Paulo, Sur Oeste del Brasil.

forma aleatoria de todas las incubadoras en todos los horarios, siendo almacenadas en microtubos de 1,5 ml conteniendo alcohol etílico absoluto. De esas larvas 95 se escogieron aleatoriamente para posterior extracción y amplificación del ADN.

Extracción, cuantificación e integridad del ADN

Para la extracción de ADN se utilizó la metodología descrita por Lopera-Barrero *et al.* (2008b). En microtubos conteniendo separadamente las aletas y larvas, se adicionaron 550 μ L de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS) y 7 μ L de proteinasa K (200 μ g/ml). Las muestras se incubaron en baño-maría a 50 °C por 12 h. El ADN se precipitó 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 microtubos, precipitándose con 700 μ L de alcohol etílico absoluto helado y se incubó por 1 h a -20 °C. El ADN fue centrifugado, lavado con 700 μ L de alcohol etílico 70%, suspendido en tampón TE - 10 mM Tris pH 8,0 y 1 mM EDTA (80 μ L para aleta y 35 μ L para larva), y tratado con 7 μ L de RNasa (30 μ g/ml) en baño-maría a 37 °C por 1 h.

Las muestras se conservaron a -20 °C. El ADN se cuantificó en espectrofotometro Shimadzu (UV 1601 - EE.UU.) en la amplitud de onda de 260 nm y se diluyó en TE para una concentración de 10 - 5 ng/ μ L (aletas y larvas respectivamente). La integridad del ADN se verificó por electroforesis horizontal empleando un gel de agarosa 1%, con 70 V por 60 min, en tampón 1X TBE (500 mM Tris-HCl, 60 mM ácido bórico y 83 mM EDTA).

Amplificación y electroforesis

Las condiciones de amplificación utilizadas siguieron la metodología descrita por Williams *et al.* (1990), con algunas modificaciones. El ADN genómico se amplificó para un volumen de reacción de 15 μ L, utilizándose tampón Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 y KCl 50 mM), 2,5 mM MgCl₂, 0,46 μ M de iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, una unidad de Platinun Taq DNA Polimerasa (Invitrogen® - EE.UU.), 10 ng de DNA molde para los Rp y 5 ng para las larvas.

Las reacciones de RAPD fueron amplificadas en un ciclador térmico de PCR Eppendorf Mastercycler™ Gradient (EE.UU.), programado para 40 ciclos, con

un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 4 min y un paso final de extensión a 72 °C por 5 min. Cada ciclo consistió de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 90 seg de ligación del iniciador a 40 °C y 2 min de extensión a 72 °C. Se evaluaron 60 iniciadores de 10 bases 2 Kits OPA, OPX e OPW (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, E.E.U.U.). Para evaluar los lotes fueron seleccionados aquellos que presentaron características reproducibles y consistencia adecuadas, mediante prueba de reproducibilidad (Paula, 2006).

Los productos de amplificación se separaron en gel de agarosa 1,5%. Utilizándose 15 μ L del producto amplificado y 2 μ L de tampón de muestra (40% de sacarosa y 0,25% de azul de bromofenol) en electroforesis horizontal. La electroforesis fue conducida en 70 V por 4 h usando tampón 1X TBE. Para verificar la existencia de contaminación, se empleó un control negativo para cada reacción, donde su amplificación fue ejecutada adicionándose todos los componentes citados anteriormente, excepto el ADN. Para el revelado del gel, se aplicó un baño en solución de 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio por 30 min. Posteriormente, cada gel se fotografió usando el sistema EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

Análisis Estadístico

El tamaño de los fragmentos (fg) obtenidos a partir de las amplificaciones se estimó por comparación con el padrón ADN Ladder de 100pb (Invitrogen®). La presencia o ausencia de fg de tamaños moleculares idénticos se usó para la construcción de una matriz de similitud con base en el cálculo del coeficiente de similitud de Jaccard, codificando 1 como presencia de fg y 0 como su ausencia. La similitud genética en cada lote se obtuvo con base en el cálculo del coeficiente de Jaccard, por medio del programa NTSYS 1.7 (Rohlf, 1989).

El índice de diversidad genética de Shannon se obtuvo con el programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). El programa TFGA 1.3 (Miller, 1997) se utilizó para determinar el porcentaje de fg polimórficos (criterio de 95%), distancia e identidad genética (Nei, 1978) entre los lotes, coeficiente de endogamia (F_{is}) y frecuencia de los fg por el test exacto (Raymond y Rousset, 1995). El programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) fue aplicado para el análisis de variancia molecular (AMOVA). La significancia de ese test se

verifico por el método de permutaciones aleatorias con 10.000 permutaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por el análisis de la integridad del ADN en gel de agarosa, no se observó degradación del ADN y no hubo exceso de proteína que pudiese perjudicar la amplificación. De esta manera, la metodología de extracción de ADN a partir de fg de aleta y larva utilizada en este estudio se mostró eficiente y permitió obtener un ADN de buena calidad, concordando con los resultados obtenidos por Lopera-Barrero *et al.* (2008b).

La utilización del SRSN permitió la obtención de una baja mortalidad de los Rp utilizados en el cruzamiento (100% de supervivencia) y todos ellos presentaron desova/espermación, demostrando la efectividad de ese sistema en la preservación de los Rp comparado con otros SR. Por otro lado, este sistema reduce la selección no intencional del proceso reproductivo que normalmente ocurre en el SR por extrusión (Povh, 2007), permitiendo que el *pool* genético de un lote pequeño o de un cruzamiento con pocos individuos sea representado con mayor heterogeneidad en la progenie (Cacho *et al.*, 2007). Resultados similares fueron observados por Reynalte-

Tataje *et al.* (2002) en la reproducción del *Leporinus macrocephalus*, donde no encontraron mortalidad en los Rp (100% de supervivencia), diferente del sistema por extrusión donde esos resultados llegaron a 66,7%. Igualmente, Cerqueira *et al.* (2005) analizando el sistema natural en robalo-peva (*Centropomus parallelus*) encontraron mejores tasas de eclosión en este sistema cuando fueron comparadas con el sistema por extrusión.

De los 60 iniciadores analizados, 9 se seleccionaron para amplificar el ADN de los reproductores y de la progenie de *B. orbignyianus*. En el Cuadro 1 son mostrados la secuencia de los iniciadores seleccionados, el porcentaje de G+C, el número de fg y el número de pares de bases de los fg amplificados utilizando el marcador molecular RAPD.

Se amplificaron 90 fg, con tamaño entre 300 y 2.200 pb. El número total de fg varió de 8 (OPW03 y OPW08) a 14 (OPW02). El mayor fg (2.200 pb) se obtuvo con la amplificación del iniciador OPW02 y el menor (300 pb) con los iniciadores OPW08 y OPX01. De los 90 fg obtenidos, 66 (73,33%) fueron polimórficos. Según Telles *et al.* (2001), para la estimativa de la diversidad genética por la técnica RAPD, el número de fg obtenidos es más importante que el número de iniciadores utilizados. Los autores

Cuadro 1. Secuencias nucleotídicas de los iniciadores, porcentaje de bases pirimidínicas (G+C), número de fragmentos (NF), número de fragmentos polimórficos (NFP) y número de pares de bases de los fragmentos amplificados (pb) en los reproductores y la progenie de *B. orbignyianus*.

Iniciador	Secuencias (3' – 5')	% G+C	NF	NFP	pb
OPA01	CAGGCCCTTC	70	10	7	350 – 2.000
OPA02	TGCCGAGCTG	70	12	9	350 – 1.600
OPW01	CTCAGTGTCC	60	9	7	500 – 1.600
OPW02	ACCCCGCCAA	70	14	8	400 – 2.200
OPW03	GTCCGGAGTG	70	8	7	400 – 1.500
OPW04	CAGAAGCGGA	60	9	7	500 – 2.000
OPW08	GACTGCCTCT	60	8	6	300 – 2.000
OPW13	CACAGCGACA	60	9	6	500 – 1.600
OPX01	CTGGGCACGA	70	11	9	300 – 1.600
Total	---	---	90	66	300 – 2.200

resaltaron que con aproximadamente 50 fg es posible estimar la variabilidad genética, demostrando que el número de fg encontrados en el presente estudio permitió una estimativa confiable de la variabilidad genética de los lotes de *B. orbignyanus*.

Se observaron diferencias ($P < 0,05$) en las frecuencias de 17 de los 90 fg entre los lotes de Rp y la progenie, sin la presencia de exclusivos (Cuadro 2). La ausencia de fg exclusivos puede ser consecuencia del tiempo de cautiverio de los Rp (6 años) en el cual no hubo introducción de nuevos individuos al lote, siendo esta situación expresada genéticamente en la progenie. La presencia de fg limitantes (fg con frecuencia 1,0000), 2 en los Rp y 5 en la progenie, demuestran una disminución de la variabilidad genética en esta última. Esta tendencia es igualmente evidenciada en la presencia de un fg de baja frecuencia (menor que 0,1000) en la Prg (0,0541) que indica la posible existencia de un proceso de alteración de la composición genética del lote por

selección o manejo reproductivo (Cuadro 2). Según Desvignes *et al.* (2001), cuando una población pasa por pérdida de variabilidad genética muchos alelos con bajas frecuencias pueden ser eliminados.

Los resultados de variabilidad genética estimados por el índice de diversidad genética de Shannon y por el porcentaje de fg polimórficos mostraron una disminución de la variabilidad genética en la progenie. La mayor similitud genética de la progenie en relación a los Rp confirma una pérdida de variabilidad genética en la primera, con una alta similitud dentro y entre los lotes (Cuadro 3). De acuerdo con la AMOVA, la mayor parte de la variación está dentro de cada lote (81,49%) y no entre ellos (18,51%) tal como se indica en el Cuadro 4, siendo corroborado por las estimativas de identidad (0,953) y distancia genética (0,049) las cuales indicaron una alta identidad entre los Rp y la progenie.

Cuadro 2. Caracterización, tamaño (pb) y frecuencia de los fragmentos con valores significativos por el test exacto ($P < 0,05$) para los reproductores y la progenie de *B. orbignyanus*.

Iniciador	Tamaño (pb)	Frecuencia de los fragmentos		p
		Reproductores	Progenie	
OPA01	500	0,5528	1,0000	0,0005
	650	1,0000	0,3844	0,0013
	1.400	0,5528	1,0000	0,0008
OPA02	600	1,0000	0,2531	0,0003
	1.100	0,4836	0,8223	0,0014
OPW01	1.400	0,5528	1,0000	0,0007
OPW02	450	0,6349	0,3511	0,0037
	700	0,6349	1,0000	0,0012
OPW03	500	0,5528	0,8223	0,0025
	1400	0,4226	0,6756	0,0029
OPW04	600	0,4226	0,8549	0,0001
OPW13	500	0,4836	0,7286	0,0042
	750	0,5528	1,0000	0,0011
OPX01	400	0,2697	0,0541	0,0007
	600	0,1437	0,6446	0,0002
	700	0,5528	0,8223	0,0022
	1450	0,4836	0,7948	0,0018

Cuadro 3. Porcentaje de fragmentos polimórficos (%FP), índice de diversidad genética de Shannon (IS) y similitud genética (SG) para los reproductores y la progenie de *B. orbignyianus*.

Lotes/Parámetros	%FP	IS	SG
Reproductores	34,44	0,215	0,882
Progenie	33,33	0,188	0,924
Reproductores x Progenie	----	----	0,886

Cuadro 4. Análisis de variancia molecular (AMOVA) para los reproductores y la progenie de *B. orbignyianus*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de variación	Porcentaje de variación
Entre los lotes	1	24,718	0,8155	18,51*
Dentro de los lotes	108	387,691	3,5897	81,49
Total	109	412,409	4,4052	----

*P<0,05

La disminución de la variabilidad genética de la Prg puede ser explicada por el efecto del bajo número de Rp utilizados durante la reproducción en el sistema semi-natural (SSN) y por la baja variabilidad genética existente entre ellos. En los programas de repoblamiento es común la utilización de pocas parejas de Rp (procedentes de la misma piscícola) debido principalmente a la baja disponibilidad de espacio, infraestructura y reproductores.

Además, los peces migratorios, como es el caso del *B. orbignyianus*, son muy prolíficos lo que limita la utilización de un gran número de individuos durante la reproducción (Povh *et al.*, 2008). Estos factores, sumados al cruzamiento entre reproductores genéticamente emparentados pueden aumentar la homocigosis y reducir la variabilidad genética de la progenie por el efecto de la endogamia.

En el presente estudio, se observó una baja variabilidad genética entre los Rp (%FP = 34,44; IS = 0,215 e SG = 0,882) y un coeficiente de endogamia (F_{IS}) de 0,088 lo que demuestra que existe un exceso de homocigotos en la progenie, provocado posiblemente por los factores mencionados. Esta disminución de variabilidad genética en la piscicultura según Moreira *et al.* (2007) es siempre esperada cuando

existe un mal manejo reproductivo y cruzamiento de individuos emparentados. Sin embargo, cuando existen condiciones de cautiverio, es verificado que esa disminución de la variabilidad normalmente es irreversible (Wasko *et al.*, 2004).

Otra hipótesis que debe ser revisada y que se puede presentar cuando se utiliza el SRSN es la existencia de competición reproductiva (Andersson, 2005) o dominancia reproductiva, donde los machos más fuertes (Barbosa y Magurran, 2006) y menos sensibles al estrés (Povh, 2007) alcanzaron posiblemente mayores porcentajes de fertilización de los ovocitos. Esta situación puede llevar a fertilizaciones diferenciadas durante el cruzamiento lo que consecuentemente podría conllevar a una disminución de la variabilidad genética. Sin embargo, no es posible hacer conjeturas ni sacar conclusiones de esta hipótesis debido a la falta de informaciones de paternidad de la progenie obtenida.

Algunos estudios han comprobado la influencia del SSN en la variabilidad genética y la existencia de dominancia reproductiva. Povh (2007) comparando el SRSN y por extrusión en un lote de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizado en programas de repoblamiento, encontró un aumento de la variabilidad

genética en la primera generación cuando se utilizó el SSN (%FP = 60,5% y IS = 0,365) y observó la dominancia reproductiva en la progenie de solamente dos machos, los cuales contribuyeron con 43,3% de toda la progenie. Rodríguez-Rodríguez (2008) analizando la paternidad y contribución reproductiva de *B. orbignyanus* en el SRSN encontró que sólo 2 machos contribuyeron con 68,41% de los alevinos, denotando la existencia de competición reproductiva cuando utilizado este sistema reproductivo.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio es verificado que un bajo número de Rp usados durante el cruzamiento (15 Rp) puede afectar directamente la variabilidad genética de la progenie. Estos resultados concuerdan con las afirmaciones de Sousa *et al.* (2006), los cuales enuncian que la práctica de repoblamiento a base de pocos Rp capturados en el ambiente o con el uso de pocos Rp durante los cruzamientos puede reducir la variabilidad genética en la progenie, afectando las poblaciones naturales. Por ese motivo, es recomendada la utilización de la mayor cantidad de Rp posible al realizar cruzamientos destinados para programas de repoblamiento.

Esta recomendación está de acuerdo con los resultados encontrados por Yokota *et al.* (2003), que constataron que el aumento del número efectivo de reproductores (N_e) de 20 (10 machos y 10 hembras) para 50 (25 machos y 25 hembras) proporcionó una mayor variabilidad genética en la progenie.

Por otro lado, al verificar la variabilidad de los Rp, es recomendada la introducción de nuevo material genético, el cual puede provenir de poblaciones naturales o en cautiverio genéticamente diferentes. Para este fin, según Lopera-Barrero *et al.* (2008c), esa introducción debe ser basada siempre en análisis genéticos para evitar una posible depresión exogámica.

La disminución de la variabilidad genética puede tornar un programa de repoblamiento ineficiente, basado en la baja supervivencia de juveniles en el ambiente acuático (Povh *et al.*, 2008) y proporcionar impactos genéticos negativos irreversibles en las poblaciones naturales (Sønstebo *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta esta premisa, los resultados observados en este estudio son de gran importancia, ya que a partir de ellos el manejo reproductivo de los lotes y cruzamientos de *B. orbignyanus* utilizados en

programas de repoblamiento pueden ser orientados correctamente y con mayor objetividad.

Por eso, las especies de importancia comercial y especialmente aquellas amenazadas de extinción, como es el caso de la analizada en este estudio, requieren un constante monitoreo de sus lotes, progenie y poblaciones naturales (Lopera-Barrero *et al.*, 2008c). En ese contexto, el marcador RAPD permitió determinar con éxito la variabilidad genética presente en los Rp y en la primera generación después del cruzamiento utilizando el SSN.

CONCLUSIONES

A pesar del SRSN permitir la obtención de una baja mortalidad y un adecuado comportamiento reproductivo de los Rp, hubo disminución de la variabilidad genética en la Prg por el efecto del bajo número de Rp utilizados durante la reproducción y por la baja variabilidad genética existente entre ellos.

LITERATURA CITADA

- Agostinho, A. A., S. M. Thomaz and L.C. Gomes. 2005. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conserv. Biol.*, 19 (3): 646-652.
- Agostinho, A. A. e L. C. Gomes. 2006. O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. **In:** Nogueira, M.G., R. Henry, A. Jorcín. (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 and 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.
- Andersson, M. 2005. Evolution of Classical Polyandry: Three Steps to Female Emancipation. *Ethology*, 111 (1): 1-23.
- Barbosa, M. and A. E. Magurran. 2006. Female mating decisions: maximizing fitness?. *J. Fish Biol.*, 68 (6): 636-661.
- Cacho, M.S.R.F., M.E. Yamamoto and S. Chellappa. 2007. Mating system of the amazonian cichlid

- angel fish, *Pterophyllum scalare*. Braz. J. Biol., 67 (1): 161-165.
- Cerqueira, V. R., R. Mioso, e M. Canarin. 2005. Indução de desova com fertilização natural e artificial e incubação de ovos de robalo-peva (*Centropomus parallelus*). Atlântica, 27 (1): 31-38.
- Desvignes, J. F., J. Laroche, S. D. Durand and Y. Bouvet. 2001. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio*) based on allozymes and microsatellites. Aquaculture, 194 (3-4): 231-291.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin Ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinf. Online, 1 (1): 47-50.
- Hatanaka, T., F. Henrique-Silva and 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.
- Hilsdorf, A. W. S., E.K. Resende e D. K. S. Marques. 2006. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Ed. Embrapa Pantanal, Brasil.
- Hori, T. S. F., I. M. Avilez, L. K. Inoue and G. Moraes. 2006. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei: characidae) juveniles. Comp. Biochem. Physiol., 143 (1): 67-72.
- Lopera-Barrero, N. M., R. P. Ribeiro e J. A. Povh. 2007. O repovoamento de peixes: uma estratégia multidisciplinar?. Aqüicultura & Pesca, 30 (1): 71-74.
- Lopera-Barrero, N. M., R. P. Ribeiro, R. N. Sirol, J. A. Povh, P. C. Gomes, L. Vargas y C. A. Mangolin. 2008a. Variabilidad genética de lotes de *Brycon orbignyanus* utilizados en programas de repoblamiento: manejo y conservación. Acta biol. Col., 13 (1): 107-118.
- Lopera-Barrero, N. M., J. A. Povh, R. P. Ribeiro, P. C. Gomes, C. B. Jacometo e T. S. Lopes. 2008b. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. Cien. Inv. Agr., 35 (1): 77-86.
- Lopera-Barrero, N. M., R. P. Ribeiro, J. A. Povh, P. C. Gomes, L. Vargas y S. N. Oliveira. 2008c. Caracterización genética de lotes de peces usados en programas de repoblamiento y su importancia en la conservación genética en la piscicultura. Zootecnia Trop., 26 (4): 515-522.
- Machado, A. B. M. 2005. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. In: Machado, A.B.M., C.S. Martins, G.M. Drummond (Eds.). Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Brasil; p. 160.
- Melo, D. C., D. A. A. Oliveira, L. P. Ribeiro, C. S. Teixeira, A. B. Souza, E. G. A. Coelho, D. V. Crepaldi e 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.
- Miller, M. P. 1997. Tools of population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Utah State University. Disponible en <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm> (14-sep-08).
- Moreira A. A., A. W. S. Hilsdorf, J. V. Silva e V. R. Souza. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. Pesqui. Agrope. Bras., 42 (4): 521-526.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. Genetics, 89 (3): 583-590.
- Paula, F.M. de. 2006. Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do Complexo Canoas – Rio Paranapanema. Tesis Msc. Universidade Estadual de Londrina. Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Londrina, Brasil. p.138.
- Pineda-Santis, H.R. 2004. Estudio genético de las cachamas (subfamilia Serrasalminae)

- en poblaciones naturales y en cautiverio en Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 17: 62-63. (suplemento).
- Povh, J.A. 2007. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Tesis *PhD*. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Maringá, Brasil. 75 p.
- Povh, J. A., N. M. Lopera Barrero, R. P. Ribeiro, E. Lupchinski Jr, P. C. Gomes y T. S. Lopes. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Cien. Inv. Agr.*, 35 (1): 5-15.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49 (6): 1280-1283.
- Reynalte-Tataje, D. A., B. M. Esquivel, J. R. Esquivel y E. Zaniboni-Filho. 2002. Reproducción inducida del piauçu, *Leporinus macrocephalus* Garavello y Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). *B. Inst. Pesca*, 28 (1): 11-18.
- Rohlf, F. J. 1989. NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Publishers, USA.
- Rodríguez-Rodríguez, M. del P. 2008. Diversidad genética, paternidad y contribución reproductiva de una población en cautiverio de *Brycon orbignyanus*, en el sistema reproductivo seminatural, a través de marcadores microsatélites. *Tesis Graduación*. Universidad del Tolima, Facultad de Biología, Ibagué, Colombia. p. 55.
- Sønstebø, J. H., R. Borgstrøm and 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.
- Sousa, A. B. de., D. C. de. Carvalho, D. C. de. Melo, A. S. Seerig, D. A. A. de. Oliveira, L. P. Ribeiro, E. A. Teixeira, D. V. Crepald e P. M. C. Faria. 2006. A utilização de baixo número de matrizes em piscicultura: perda de recursos genéticos para programas de repovoamento. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 30 (3/4): 100-104.
- Telles, M. P. C., M. S. R. Monteiro, F. M. Rodrigues, T. N. Soares, L. V. Resende, A. G. Amaral e P. R. Marra. 2001. Marcadores RAPD na análise de divergência genética entre raças de bovinos e número de *locos* necessários para a estabilidade da divergência estimada. *Ciência Animal Brasileira*, 2 (2): 87-95.
- Wasko, A. P., C. Martins, C. Oliveira, J. A. Senhorini and 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 and 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 and 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. p. 29.
- Yokota, M., Y. Harada and M. Iizuka. 2003. Genetic drift in a hatchery and the maintenance of genetic diversity in hatchery-wild systems. *Fish Sci.*, 69 (1): 101-109.
- Zaniboni-Filho, E., D. Reynalte-Tataje e M. Weingartner. 2006. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 19 (2): 233-240.