

**EFFECTO DE LA REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL Y DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA  
EN LA PRODUCCIÓN DE LARVAS DE BOCACHICO (*Prochilodus magdalenae*)  
PARA REPOBLACIÓN**

**ANA CAROLINA TORREGROZA ESPINOSA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍA EN ACUICULTURA Y ECOLOGÍA ACUÁTICA TROPICAL**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA**

**SANTA MARTA**

**2013**

**EFFECTO DE LA REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL Y DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA  
EN LA PRODUCCIÓN DE LARVAS DE BOCACHICO (*Prochilodus magdalenae*)  
PARA REPOBLACIÓN**

Tesis de grado para optar el título de magister en acuicultura y ecología acuática  
tropical

**ANA CAROLINA TORREGROZA ESPINOSA**

**DIRECTOR:**

**M.Sc JUAN CARLOS NARVÁEZ BARANDICA**

**DIRECTOR ASOCIADO:**

**M.Sc NICOLÁS CHAPARRO MUÑOZ**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍA EN ACUICULTURA Y ECOLOGÍA ACUÁTICA TROPICAL**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA**

**SANTA MARTA**

**2013**

*A Dios, por permitirme lograr este sueño*

*A mi madre Mirna, por su apoyo y amor*

*A mi hermana Angélica María, porque seamos un ejemplo a seguir*

*Al amor Bhyrom Andrés, por caminar conmigo en este proceso*

*A mi familia, por estar presente en los mejores momentos de mi vida*

*A mis amigos, por enseñarme el verdadero valor de la amistad*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por cada una de las bendiciones que ha puesto en mi vida.

A mi madre y hermana, por creer en mí y apoyarme para cumplir mis metas.

A Bhyrom Andrés, por ser mi soporte en momentos de dificultad.

A mi director Juan Carlos Narvárez Barandica, por su amistad, su confianza en mí, sus enseñanzas y por ser un guía en todo mi proceso de formación.

A mi director Nicolás Chaparro Muñoz, por su dedicación en el desarrollo de este trabajo y por sus anécdotas.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de genética molecular, Juanki, Gil, Eider, Daniel, Javi, Juli y Fania, por soportarme todos los días y por todos los momentos que compartimos.

A la amiguita, Alina, por sus locuras y compañía en cada una de las etapas de ésta investigación.

A mis amigos y compañeros de clase, por hacerme extrañar los viernes y sábados.

A los profesores Daza y Mozo, por su apoyo logístico en las instalaciones del SENA.

A la fuente financiadora de la investigación COLCIENCIAS, en el marco del proyecto “EVALUACIÓN DE LA ECOLOGÍA MOLECULAR DE LOS BOCACHICOS (*Prochilodus* spp) ASOCIADOS A LOS RÍOS QUE DRENAN AL CARIBE COLOMBIANO” Código N° 111752128352.

A todas las personas que no incluyo en esta lista, por no alargarla más.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	8
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
2. ANTECEDENTES .....	12
3. MARCO TEÓRICO .....	15
3.1 Clasificación taxonómica del bocachico ( <i>P. magdalena</i> ).....	15
3.2 Aspectos biológicos del bocachico ( <i>P. magdalena</i> ) .....	15
3.3 Reproducción inducida de <i>P. magdalena</i> .....	16
3.4 Marcadores moleculares.....	16
3.5 Variabilidad genética individual de los reproductores.....	17
4. JUSTIFICACIÓN .....	18
5. OBJETIVOS .....	20
5.1 Objetivo general .....	20
5.2 Objetivos específicos .....	21
6. METODOLOGÍA.....	21
6.1 Área de estudio .....	21
6.2 Fase de campo .....	22
6.3 Fase de laboratorio .....	24
6.3.1 Extracción de ADN.....	24
6.3.2 Amplificación y genotipificación de microsatélites .....	25
6.4 Análisis de la información .....	26
6.4.1 Determinación del mejor tipo de reproducción artificial .....	26
6.4.2 Evaluación del efecto de la variabilidad genética de los reproductores sobre la producción y calidad genética de las larvas .....	27
7. RESULTADOS.....	28
7.1 Determinación del mejor tipo de reproducción artificial (húmedo y seco) para producción de larvas de bocachico con fines de repoblación .....	28
7.2 Efecto de la variabilidad genética individual de los reproductores sobre la producción de larvas de bocachico con fines de repoblación utilizando el tipo de reproducción artificial húmedo .....	32
7.3 Efecto de la variabilidad genética individual de los reproductores sobre la calidad genética de larvas de bocachico con fines de repoblación utilizando el tipo de reproducción artificial húmedo .....	35
8. DISCUSIÓN .....	37
9. CONCLUSIONES .....	39
10. RECOMENDACIONES .....	41
11. BIBLIOGRAFÍA .....	42

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Locus microsatélites utilizados para el análisis de larvas de bocachico (*P. magdalенаe*).....26
- Tabla 2.** Valores promedio de las variables peso, fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia obtenidos para dos tipos de reproducción artificial (húmedo y seco) en bocachico (*Prochilodus magdalенаe*) con sus respectivas desviaciones estándar.....29
- Tabla 3.** Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, dureza y amonio) medidos durante la inducción de los reproductores y la incubación de los huevos para ambos tipos de reproducción artificial (seco y húmedo) con sus respectivas desviaciones estándar.....32
- Tabla 4.** Valores promedios de peso, fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión de reproductores (hembras) de bocachico (*Prochilodus magdalенаe*) inducidas bajo el tipo de reproducción artificial húmedo con sus respectivas desviaciones estándar.....33
- Tabla 5.** Valores promedio de heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y el índice de endogamia ( $F_{is}$ ) de los reproductores de bocachico (*Prochilodus magdalенаe*) utilizados para la obtención de las progenies analizadas con sus respectivas desviaciones estándar.....35
- Tabla 6.** Valores promedio de heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y el índice de endogamia ( $F_{is}$ ) de larvas de bocachico (*Prochilodus magdalенаe*) utilizando el tipo de reproducción artificial húmedo con sus respectivas desviaciones estándar.....36

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** *Prochilodus magdalenae*.....15

**Figura 2.** a) Valores promedio de las variables fecundidad y supervivencia. b) Valores promedio del porcentaje de fertilización y eclosión para los dos tipos de reproducción artificial utilizados para la producción de larvas de bocachico con fines de repoblación.....31

**Figura 3.** a) Valores promedio de las variables fecundidad y supervivencia. b) Valores promedio del porcentaje de fertilización y eclosión de los tres intervalos de heterocigosidad individual de los reproductores (0-0.3, 0.3-0.6, 0.6-1) bajo el tipo de reproducción artificial en húmedo para la producción de larvas de bocachico con fines de repoblación.....34

## RESUMEN

*Prochilodus magdalenae* es un pez endémico de Colombia de gran importancia económica. Actualmente se encuentra amenazado, siendo prioridad la implementación de estrategias que permitan mejorar sus condiciones naturales para evitar su extinción. Una estrategia es la implementación de programas de repoblación; sin embargo, estos no son basados en criterios científicos, ya que las granjas piscícolas no tienen en cuenta las herramientas genéticas, lo que favorece el cruzamiento de reproductores emparentados y esto trae como consecuencia la reducción de la variabilidad genética. Además, no existe un método estandarizado de reproducción artificial para la producción de larvas. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del tipo de reproducción artificial (húmedo y seco) y la variabilidad genética individual de los reproductores en la producción de larvas de bocachico con fines de repoblación. Los indicadores de producción fueron la fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia de las larvas. Los mejores resultados se observaron con el método húmedo, seleccionándolo para evaluar el efecto genético. Para esto se realizaron tres tipos de cruces variando la heterocigosidad individual de los reproductores previamente caracterizados ( $H_o \leq 0.3$ ;  $0.3 > H_o \leq 0.6$ ;  $H_o > 0.6$ ). Como resultado se observó que la fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia de las larvas son parámetros condicionados por la calidad genética del reproductor ( $p < 0.05$ ). De la misma manera, la calidad genética de las larvas es dependiente del nivel de heterocigosidad individual de los reproductores seleccionados para los cruces ( $p < 0.05$ ), registrando una pérdida de heterocigosidad (variabilidad genética) de reproductores ( $H_o = 0.190, 0.444, 0.730$ ) a larvas ( $H_o = 0.198, 0.203, 0.392$ ) a medida que se avanza en la obtención de progenies, es decir, a pesar de que los reproductores presentan una mayor variabilidad genética, las progenies expresaron una baja heterocigosidad observada.

**Palabras clave:** Repoblación, heterocigosidad individual, reproducción, conservación.



## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El género *Prochilodus* está conformado por 13 especies que se distribuyen en los ríos suramericanos (Castro & Vari, 2004), siendo considerados los peces más conspicuos y abundantes de las aguas continentales, realizando largas migraciones y manteniendo las pesquerías en gran parte del continente (Welcomme, 1979; Sivasundar *et al.*, 2001). En Colombia existen varias especies pertenecientes al género *Prochilodus*, siendo el bocachico *Prochilodus magdalenae* (Steindachner, 1879) el más importante por ser endémico de la cuenca de los ríos Magdalena, Sinú y Atrato (Maldonado-Ocampo *et al.*, 2008). Además tiene una amplia utilización tanto en pesquerías como en acuicultura, jugando un papel fundamental en la seguridad alimentaria de millones de familias. Es por lo anterior que representó en el 2010 el 30% de la captura total del Magdalena (CCI, 2010).

Pero, a pesar de su importancia, sus capturas han disminuido considerablemente pasando de 24.870 toneladas en 1992 a 2.818 toneladas en el 2010 (CCI, 2010), hasta el punto que las autoridades ambientales la consideran como una especie vulnerable (Mojica *et al.*, 2012). La disminución en la abundancia del recurso se debe a los numerosos impactos antropogénicos, dentro de los que se destacan: la contaminación, la sedimentación de los ríos, la deforestación de las zonas ribereñas, la construcción de hidroeléctricas (Atencio, 2000; Monteiro *et al.*, 2006; Marrugo-Negrete *et al.*, 2008) y la pesca sin control (Valderrama *et al.*, 2002; Agostinho *et al.*, 2005; Hatanaka *et al.*, 2006) causando en las poblaciones naturales fragmentación de la población, reducción de su hábitat, interrupción del proceso de migración y disminución de la tasa de renovación poblacional (Hatanaka *et al.*, 2006).

Dentro de las medidas utilizadas para la mitigación del impacto generado sobre el bocachico están las medidas pesqueras tradicionales como son: las vedas en época de subienda, la talla reglamentaria (25 cm), la prohibición de artes de pesca y la repoblación (Agostinho *et al.*, 2005). La repoblación constituye la estrategia más utilizada para la recuperación pesquera de *P. magdalenae*; sin embargo, su ineficiente utilización puede acarrear la pérdida de la diversidad genética de los peces que son liberados,

convirtiéndose en una amenaza para las poblaciones naturales (Povh, 2007). Siendo evidente la degradación de los ambientes acuáticos, las medidas preventivas para la conservación del bocachico deben ser tomadas en cuanto al banco genético *in situ* de la población (Campos, 2009). Grandes e irreversibles alteraciones ambientales guían a una perspectiva de manejo en cautividad del bocachico (reproductores mantenidos en estaciones piscícolas), haciendo necesario seleccionar individuos que representen la diversidad genética de las poblaciones naturales (Ryder, 1986; Seal, 1988; Wasko *et al.*, 2004) y que al momento de la liberación de las progenies contribuyan al aumento de la variabilidad genética de la población natural. Por eso la correcta selección del grupo de reproductores que sean usados para este propósito es de suma importancia (Wasko *et al.*, 2004).

Actualmente, los programas de repoblación que se adelantan en Colombia no son basados en criterios científicos, ya que las granjas piscícolas no implementan herramientas genéticas, favoreciendo el cruzamiento de reproductores emparentados genéticamente, que en consecuencia reducen la variabilidad genética (Moreira *et al.*, 2003; Povh *et al.*, 2006), promueven en la población mayor sensibilidad a las variaciones ambientales, y en ocasiones provocan la extinción de una especie (Lopera-Barrero *et al.*, 2006), afectando también el crecimiento y la reproducción (Moreira *et al.*, 2001; Povh *et al.*, 2006).

Algunos avances han sido desarrollados por Orozco (2013), quien evaluó la estructura genética de la población de bocachico en la cuenca del río Magdalena y sus principales tributarios, puesto que para direccionar programas de repoblación se debe tener información de la población natural para no incurrir en problemas de translocación de genes, como lo reportado por Santa Cruz (2003) para la cuenca del río Sinú. Muñoz (2013) realizó el establecimiento de dos sistemas de reproductores con criterios genéticos en dos centros piscícolas del Norte de Colombia, encontrando en estos una pérdida significativa de la variabilidad genética.

Por otra parte, diferentes investigaciones han sido realizadas evaluando la efectividad de los tipos de reproducción artificial (húmedo y seco) para repoblación, obteniendo como

resultado que el método húmedo proporciona una mayor disposición alélica, lo que aumenta la variabilidad genética de las progenies (Povh, 2007); sin embargo, en las estaciones piscícolas no existe un método estandarizado de reproducción artificial para la producción de larvas para repoblación.

Identificar los reproductores con las mejores condiciones genéticas para producir semilla con fines de repoblación y analizar la calidad genética de las larvas producidas, es el procedimiento pertinente para corroborar que se está proporcionando a la población del medio natural la información adecuada para su recuperación genética (Machado-Schiaffino, 2007). De igual manera, es importante estandarizar un método de reproducción artificial que permita aumentar la calidad en términos de fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia de larvas utilizadas para repoblación (Reynalte-Tataje *et al.*, 2002). Por lo tanto, esta investigación pretende resolver dos interrogantes: ¿Cuál de los dos métodos de reproducción artificial (húmedo y seco) para la producción de larvas de bocachico con fines de repoblación es el más eficiente? y ¿Cuál es el efecto de la variabilidad genética individual de los reproductores sobre la producción y calidad genética de las larvas de bocachico obtenidas para repoblación bajo el mejor tipo de reproducción artificial?

## 2. ANTECEDENTES

Los métodos de reproducción artificial (húmedo y seco) para la producción de larvas han sido ampliamente descritos por Atencio (2001), el cual analizó las ventajas y desventajas de ambos métodos en la producción de alevinos de especies nativas, obteniendo como conclusión que el método en seco causa mayor estrés en los reproductores, pero permite mejores tasas de fertilización y eclosión con respecto al húmedo; por su parte este segundo provoca una mayor manipulación sobre los huevos, lo que aumenta la tasa de mortalidad durante la incubación. Sin embargo, variaciones en el método se han implementado en otras estaciones piscícolas como el SENA Agropecuario-Magdalena donde el proceso de incubación es realizado en las mismas piletas de reproducción disminuyendo el maltrato sobre los huevos al momento de la recolección (Com. Pers. Daza, 2012).

Otras investigaciones sobre éste tema han sido realizadas por Lopera-Barrero *et al.*, 2008 quienes argumentan que una desventaja del método en seco en *Piaractus mesopotamicus* y *Prochilodus lineatus* puede ser que los huevos sean extraídos antes del tiempo indicado, ocasionando que no haya una alta viabilidad y por ende una baja tasa de fertilización. Por su lado, analizan como una ventaja el hecho de que participen múltiples reproductores (es posible fertilizar con varios machos) pudiéndose presentar una mayor disposición alélica; esta teoría es un poco desligada de lo que empíricamente se piensa basados en la selección natural que ocurre en el desove en húmedo puesto que la hembra puede estar con varios machos para la estimulación al tiempo del desove pero ella escoge al que según su selección le parece el apropiado para desovar y fertilizar sus huevos (Com. Pers. Chaparro, 2012). Lo anterior es coherente con lo encontrado por Povh (2007) para *Piaractus mesopotamicus* donde propuso que para programas de repoblación se debe realizar la reproducción con el método húmedo ya que proporciona una mayor variabilidad genética.

Múltiples trabajos se han realizado comparando la utilización de los dos métodos de reproducción artificial (húmedo y seco) sobre la variabilidad genética de las progenies destacándose el realizado por Reynalte-Tataje *et al.*, 2002, donde encontraron que el

método húmedo o semi-natural presenta mejores resultados en *Leporinus macrocephalus* en términos de tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia, además de una mejor condición genética en términos de heterocigosidad. Lo anterior es complementado por Sirol y Britto, (2006) quienes expresan que en el método seco hay una menor eficiencia reproductiva y una mayor mortalidad de los reproductores por la extrusión en *Piaractus mesopotamicus*.

En cuanto a las herramientas moleculares, un estudio realizado por Campos (2009), utilizando marcadores microsatélites encontró que los individuos usados para repoblación de *Prochilodus argenteus*, presentaron una disminución en la variabilidad alélica cuando se comparó con la población natural de esta especie, demostrando de esta manera que los programas de manejo y cultivo de *P. argenteus* necesitan un conocimiento a nivel genético de la población (ya sea de cultivo o silvestre) para que no se presente el movimiento de genes poco variables hacia la población natural con su posterior decline. Para variabilidad genética individual, Primmer *et al.*, (2003), intentaron predecir la información genética de las crías basados en la diversidad genética de los padres en poblaciones de salmónidos en peligro de extinción utilizando microsatelites.

En Colombia han sido muy pocos los estudios de diversidad genética de especies endémicas en peces (Castiblanco, 2003). Específicamente en bocachico, los avances han sido a través de las investigaciones de Santacruz, (2003); por medio de la demostración de que los lotes de reproductores de cuatro centros piscícolas del departamento de Córdoba, presentaban una pérdida importante de la variabilidad genética utilizando *loci* microsatélites como marcadores moleculares. Estos marcadores fueron útiles para evaluar el impacto genético de las repoblaciones en esta población, y suministró recomendaciones técnicas para orientar y minimizar el riesgo de reducción de la variabilidad genética. Sin embargo los *loci* microsatélites utilizados en esta investigación fueron los diseñados para una especie correspondiente al mismo orden del bocachico, *Piaractus mesopotamicus*, puesto que para el tiempo en que se realizó el estudio todavía no se habían propuesto ni para la especie ni para el género.

En la actualidad, aún no se han propuesto *loci* microsatélites específicos para el bocachico que permitan evaluar su variabilidad y estructura genética. Sin embargo,

previos estudios han propuestos 55 sistemas de *loci* microsatélites para otras especies del mismo género (*Prochilodus*) que habitan en el neotrópico, de los cuales 22 han sido para *P. argenteus*, seis para *P. costatus* y 27 para *P. lineatus* (Barbosa *et al.*, 2008; Carvalho-Costa *et al.*, 2006; Rueda *et al.*, 2011).

Empleando siete de los microsatélites más polimórficos propuestos por Rueda *et al.*, (2011), Orozco (2013), evaluó la estructura genética de la población de bocachico en la cuenca del río Magdalena y sus principales tributarios; por su parte, Muñoz (2013) realizó el establecimiento de dos sistemas de reproductores con criterio genético para obtener progenies con fines de repoblación en dos estaciones piscícolas del norte de Colombia (AUNAP-Repelón y SENA-Magdalena), encontrando una pérdida significativa de la variabilidad genética.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Clasificación taxonómica del bocachico (*P. magdalenae*)

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Subclase: Neopterygii

Infraclase: Teleostei

Superorden: Ostariophysi

Orden: Characiformes

Familia: Prochilodontidae

Género: *Prochilodus*

Especie: *P. magdalenae*



Figura 1. *Prochilodus magdalenae*

Foto: Laboratorio genética molecular UNIMAGDALENA, 2011.

#### 3.2 Aspectos biológicos del bocachico (*P. magdalenae*)

Su principal hábitat lo constituyen los cuerpos de agua lenticos en la parte media y baja de los ríos, siendo su fuente de alimento el detritus (Román, 1993). El bocachico es una especie migratoria cuyo ciclo de vida está relacionado con los patrones hidrológicos de inundación y estiaje de la cuenca de los ríos (Dahl, 1971). Abandona las ciénagas en aguas bajas y remonta los ríos en busca de los tributarios laterales, en una migración masiva conocida como “subienda”. Desova en el canal principal del río con el comienzo de las crecientes (Jiménez-Segura, 2007). Posteriormente, durante las crecientes, retorna a las ciénagas junto con su cría en una nueva migración llamada “bajanza” (Mojica *et al.*, 2002). En el río Magdalena la especie tiene dos periodos reproductivos sincronizados con el régimen hidrológico bi-modal de esta cuenca (Jiménez-Segura, 2007). La postura de las hembras puede variar aproximadamente entre 80.000 y 100.000 huevos, dependiendo de la talla (Dahl, 1971). Presenta desoves totales, con fecundación externa y no tienen cuidado parental (Kamler, 1992).

### **3.3 Reproducción inducida de *P. magdalenae***

En condiciones de cautiverio, los reproductores llevan a cabo su maduración ovocitaria pero no ovulan ni desovan debido a la falta de estímulos ambientales, principalmente las variaciones de caudales que se presentan en los periodos de lluvias (Atencio, 2000). La sustancia inductora comúnmente utilizada en bocachico corresponde a extracto pituitario de carpa (EPC) en dos dosis para hembras divididas en 0,5 mg/kg y 4,5 mg/kg, sin embargo la cantidad de hormona varía; Solano, (1992) propone dosis de 6,6 mg/Kg, distribuidas en una primera dosis preparatoria de 0,6 mg/Kg y una dosis decisiva de 6 mg/Kg. Para los machos se aplica una dosis única administrada con la segunda dosis de las hembras. El intervalo entre una dosis y otra por lo general es de 6-14 horas y el desove ocurre a las 6 horas después de aplicada la segunda dosis hormonal.

Existen dos tipos de reproducción artificial: en condiciones semi-naturales conocido como húmedo y en seco o por extrusión manual. En húmedo, cuando los reproductores son colocados en piletas circulares, donde ocurre el desove y al cabo de 1–2 horas se recogen los huevos hidratados para incubar (Atencio, 2000), sin embargo, ciertas modificaciones han surgido alrededor de éste método realizando la incubación en las piletas de reproducción sin necesidad de recoger los huevos como es realizado en SENA-Magdalena (Com. Pers. Daza, 2012). El segundo método consiste en la extrusión para la obtención de los gametos fertilizando en seco con hidratación manual (Atencio, 2000).

### **3.4 Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares constituyen una herramienta realista y útil para la investigación y el monitoreo de la condición genética tanto de las poblaciones nativas como de las mantenidas en cautiverio (Alam e Islam, 2005). Uno de los marcadores más utilizados son los microsatélites, debido a que permiten de manera más acertada analizar la variabilidad genética de una población, mediante la diferenciación del heterocigoto del



homocigoto(amplifican alelos biparentales y codominantes), y de la detección de polimorfismo en los diferentes estados de un alelo (variantes alélicas) (Sunnucks, 2000).

Los microsatélites consisten en múltiples copias de secuencias simples repetidas de uno a seis pares de bases organizadas en tándem (Liu y Cordes, 2004). La mayoría de los microsatélites son de tamaño relativamente pequeño, partiendo de algunos pocos repetidos hasta algunos cientos. Este tamaño facilita la reacción en cadena de la polimerasa necesaria para su resolución. Se ha observado que los microsatélites formados por un número mayor de repeticiones se relacionan con un mayor polimorfismo (Liu y Cordes, 2004). El uso de técnicas como electroforesis capilar, han ayudado a aumentar la capacidad de procesamiento de muestras, facilitando y promoviendo el uso de los microsatélites. Es por lo anterior que son los marcadores ampliamente usados para el manejo de lotes de reproductores en la acuicultura (Alam e Islam, 2005; Povh *et al.*, 2008).

### **3.5 Variabilidad genética individual de los reproductores**

Variabilidad genética corresponde a la diversidad de la información genética, presente en formas alternativas dentro de un mismo individuo o dentro de la misma población (Balding *et al.*, 2007). Esta diversidad es una medida importante para conocer la adaptación de las especies a su ambiente y su capacidad de responder rápidamente a los cambios que ocurren del mismo (Hartl y Clark, 1997). La diversidad genética puede evaluarse a diferentes niveles: nivel individual e intra-poblacional. A nivel individual se calcula mediante la heterocigosidad individual que resulta de la relación entre el número de *loci* en el cuál el individuo es heterocigoto y el número de *loci* analizados (Coltman *et al.*, 1998).

Resulta de interés considerar la variabilidad genética individual por varias razones: la selección natural actúa a nivel individual, el efecto de los problemas genéticos se observa en los individuos (endogamia), es importante en programas de cría en cautiverio y la

variación genética se mide esencialmente en los individuos. Además se asume que el descenso de la variabilidad genética puede ocasionar consecuencias tales como la caída de la eficacia biológica, expresada en una disminución de ciertos factores como la fertilidad, el vigor, la resistencia a enfermedades, entre otros (Coltman *et al.*, 1998).

Existen otros parámetros que también permiten evaluar la variación genética a nivel intrapoblacional como lo son: Heterocigosidad observada ( $H_o$ ), es la frecuencia observada de individuos heterocigotos para un locus en una población; la Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), es la proporción de individuos heterocigotos para un locus en una población y el índice de endogamia ( $F_{is}$ ).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El bocachico (*P. magdalенаe*) es la especie más destacada de la ictiofauna colombiana (Olaya-Nieto *et al.*, 2003), representando el 30% de la captura total del Magdalena en el

año 2010 (CCI, 2010). Desde el punto de vista ecológico presenta una gran importancia debido a que transporta materia y energía a los niveles más altos de la cadena trófica por su hábito alimenticio detritívoro (Flecker, 1996). Sin embargo, a pesar de lo anterior, su situación actual es crítica siendo categorizada por las autoridades ambientales como una especie vulnerable (Mojica *et al.*, 2012).

El deterioro en la población es causado por los numerosos impactos antropogénicos dentro de los que se pueden destacar: la destrucción de su hábitat, contaminación de los ríos, construcción de hidroeléctricas y la sobrepesca (Agostinho *et al.*, 2005; Hatanaka *et al.*, 2006). Actualmente en Colombia se intenta mitigar dicho impacto sobre las poblaciones naturales, utilizando la repoblación como principal alternativa (Wasko *et al.*, 2004), en particular en aquellas especies donde se observa una disminución drástica de su abundancia y que a su vez juegan un papel importante en la economía del país.

La repoblación ha sido utilizada como una medida de mitigación y conservación de las poblaciones; aunque no se tiene información de las características genéticas de las poblaciones cautivas. Por el desconocimiento científico que soporta a esta herramienta de mitigación, se puede estar perdiendo variabilidad genética de las poblaciones al ser introducidas en el medio natural, o podría ocurrir una translocación de genes debido a que provienen de individuos de otras cuencas (Santa cruz, 2003). Este hecho magnifica la problemática de conservación del bocachico, ya que puede disminuir la capacidad de supervivencia y de soportar cambios ambientales (Lopera-Barrero *et al.*, 2006), lo cual es evidenciado en la reducción de la abundancia y en la decadencia de las poblaciones. Tampoco existe un método estandarizado de reproducción artificial (húmedo y seco) que garantice unos buenos parámetros reproductivos (fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia) en aquellos reproductores que serán utilizados para la repoblación de las poblaciones naturales de bocachico, con el objetivo de mantener la variabilidad genética en las generaciones siguientes.

Es por lo anterior que se hace imperativo para la realización de programas de repoblación como alternativa de conservación para el bocachico, que las estaciones piscícolas

públicas y privadas encargadas de la producción de larvas usadas para este fin, conozcan las características genéticas de los parentales usados en las reproducciones y la de la semilla a liberar, ya que se consideran como un componente importante para el éxito de la preservación y manejo de una especie. Lo anterior garantizaría la incorporación de la información genética requerida para la restauración de la población (evitando fijación de alelos deletéreos en la población natural) (Muñoz, 2013), que no se crucen individuos emparentados (endogamia) (Kang *et al.*, 2006) y además de que no hayan problemas de translocación de genes entre cuencas (Santacruz, 2003). Estas ventajas serían complementadas con la aplicación de una metodología de reproducción estandarizada que garantice una alta productividad de larvas en términos de fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia, al igual que una mejor disposición alélica aumentando la variabilidad genética de las poblaciones naturales sometidas a los programas de repoblación.

La presente investigación servirá de base para identificar el mejor método de reproducción artificial para repoblación y analizar la calidad genética de las larvas, conociendo previamente la condición genética de los parentales, pudiendo concluir en que intervalo de heterocigosidad individual se expresan los mejores parámetros de producción y la mayor variabilidad genética. Lo anterior es útil para formular bases que permitan reestructurar los programas de conservación realizados en Colombia que incluyan la aplicación de repoblaciones como estrategias de manejo para esta especie.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del tipo de reproducción artificial (húmedo y seco) y la variabilidad genética individual de los reproductores en la producción de larvas de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) con fines de repoblación.

## **5.2 Objetivos específicos**

Determinar el mejor tipo de reproducción artificial (húmedo y seco) para la producción de larvas de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) con fines de repoblación.

Evaluar el efecto de la variabilidad genética individual de los reproductores sobre la producción y calidad genética de larvas de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) con fines de repoblación utilizando el mejor tipo de reproducción artificial.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Área de estudio**

Este estudio se realizó en la estación piscícola del SENA-Magdalena, localizado a 7 Km de la ciudad de Santa Marta con un área de 5.0 Ha y una altura media de 4 m.s.n.m. (74° 07' y 74° 12' W y entre 11° 11' y 11° 15' N). Este centro cuenta con más de 25 estanques, donde mantiene reproductores de bocachico.

## **6.2 Fase de campo**

La fase de campo de la investigación fue realizada en los meses de septiembre y octubre, coincidiendo con uno de los dos periodos de maduración de los reproductores en la cuenca del Magdalena (Jiménez-Segura, 2007). Los animales seleccionados para los experimentos estuvieron entre los 12-16 meses de edad y no habían sido utilizados para reproducción.

En la primera fase se seleccionaron 12 hembras y 24 machos, para conformar 12 tríos en proporción 2:1 (dos machos por cada hembra). La selección estuvo basada en el análisis presuntivo de las características externas en hembras (abdomen abultado y papila genital dilatada). Los machos maduros se reconocieron por espermiación constante. Seis tríos fueron utilizados para realizar reproducción en seco y seis tríos para reproducción en húmedo, los peces antes de la inducción fueron previamente pesados y mantenidos en piletas circulares de aproximadamente 3-4 m<sup>3</sup> con aireación y flujo constante de agua. La inducción hormonal se realizó con Extracto Pituitario de Carpa (EPC) en hembras por medio de dos dosis con un intervalo de 12 horas. La primera equivalente al 10% y la segunda al 90% bajo la dosis propuesta por Solano, (1992) correspondiente a 6,6 mg/kg de peso corporal. Para machos se aplicó una dosis única del 10% con la segunda dosis de las hembras. El desove ocurrió a las 6-7horas después de la inducción (Atencio, 2001).

En el método de reproducción en húmedo los seis tríos (proporción 2:1, cada hembra en una pileta con dos machos) realizaron el desove de manera espontánea, los huevos fueron incubados en las mismas piletas de reproducción simulando las condiciones de las incubadoras a fin de evitar el maltrato de los huevos durante su recolección. Los reproductores fueron retirados de las piletas dos horas después del desove.

Para el método en seco, la obtención de los gametos se hizo mediante extrusión manual de cada uno de los seis tríos (proporción 2:1, cada hembra en una pileta con dos machos), en el momento en que se observaron características tales como movimiento en ambos sexos y ronquidos en machos; la fertilización fue en seco con hidratación manual (Atencio, 2000). Al igual que el método anterior, la incubación de los huevos obtenidos fue realizada en piletas de reproducción, simulando las condiciones de las incubadoras. Todos los reproductores utilizados durante las reproducciones fueron colocados en piletas de recuperación donde permanecieron bajo observación garantizando su óptima recuperación.

Durante el desarrollo de los experimentos de inducción a los reproductores e incubación de los huevos para los dos métodos de reproducción artificial (húmedo y seco), fueron monitoreadas las variables fisicoquímicas del agua tales como temperatura, pH, dureza del agua y amonio.

En los dos tipos de reproducción artificial se midieron variables tales como fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia. La fecundidad (número de huevos desovados por hembra) fue calculada mediante volumetría inmediatamente ocurrió el desove. La tasa de fertilización se calculó 5 horas después del desove mediante el promedio de muestras al azar de un número superior a cien huevos, considerando viables los de aspecto transparente y haciendo una relación entre estos y el número total de la muestra. La tasa de eclosión se midió 12 horas post-fertilización aplicando el mismo método utilizado para la tasa de fertilización. La supervivencia de las larvas fue medida 12 horas después de la eclosión por volumetría (Atencio, 2000).

Posteriormente a la determinación del mejor tipo de reproducción artificial (húmedo y seco), se procedió a la segunda selección de reproductores, la cual consistió en rastrear individuos previamente marcados con microchips intramuscularmente y caracterizados genéticamente en el marco de la investigación “Establecimiento de dos sistemas de reproductores de bocachico con criterio genético en dos estaciones del Norte de Colombia” (Muñoz, 2013). Se seleccionaron nueve hembras y 18 machos con las siguientes características: tres hembras y seis machos con heterocigosidad individual menor o igual a 0.3, tres hembras y seis machos con heterocigosidad individual mayor a

0.3 y menor o igual a 0.6, tres hembras y seis machos con heterocigosidad individual mayor a 0.6. Para cada uno de los intervalos de heterocigosidad individual cada hembra fue colocada en una pileta de reproducción en proporción 2:1, donde se realizó la inducción hormonal bajo las mismas condiciones de dosificación e incubación mencionadas en el experimento anterior. También se midieron las variables fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia, además de los parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, oxígeno, pH, dureza y amonio).

A las 12 horas post-eclosión se fijaron larvas en etanol al 96% (30 larvas por cada pileta), las cuales fueron llevadas al laboratorio de genética molecular de la Universidad del Magdalena para su posterior análisis.

## **6.3 Fase de laboratorio**

### **6.3.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de larvas de bocachico fijadas en etanol al 96%, utilizando el Kit para extracción de ADN MasterPure™ DNA Purification, utilizando el siguiente protocolo:

Se tomó cada larva, la cual fue transferida a un tubo de 1.5 ml que contenía 300 µl de lisis celular, y se le adicionó 1 µl de Proteinasa K para proceder a la incubación a 65 °C durante 15 minutos, al finalizar el tiempo de incubación se le agregó 1 µl de RNasa y se dejó enfriar. Posteriormente se adicionaron 175 µl de MPC reactivo de precipitación de proteínas; la precipitación del producto se realizó en una microcentrifuga a 4°C y 17.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido fue transferido a otro tubo, al que se le adicionó 500 µl de isopropanol. El nuevo tubo se llevó a una microcentrifuga a 4°C a 17.000 rpm durante 15 minutos para una nueva precipitación del ADN. El isopropanol, se retiró cuidadosamente sin agitar el tubo. El tubo fue enjuagado con etanol al 70%. El ADN extraído fue resuspendido en 35 µl *buffer* TE.



La verificación de la calidad del ADN obtenido se realizó mediante electroforesis horizontal con gel de agarosa al 0.8%, tiñendo con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y una corrida a 80 voltios durante 30 minutos (Narváez, 2006). La visualización del gel se realizó con un fotodocumentador *Biodoc UVP LLC* con transiluminador de luz ultravioleta.

### 6.3.2 Amplificación y genotipificación de microsatélites

Se amplificaron siete *loci* microsatélites específicos de *Prochilodus lineatus* propuestos por Rueda *et al.*, (2011), cuya amplificación cruzada fue probada exitosamente en *P. magdalenae*; de los cuales se seleccionaron los más polimórficos: PL3, PL14, PL 119, PL 23, PL 28, PL34 y PL64.

**Tabla 1.** Locus microsatélites utilizados para el análisis de larvas de bocachico (*P. magdalenae*).

Locus	Repeticiones	Secuencia del <i>primer</i> (5'-3')	Ta (°C)	Tamaño (pb)
PL3	(CA) <sub>n</sub>	F: 5'- TCTGAGCTGTGAGGAATGGA -3' R: 5'- AGAGCGCTCAAGCACAAGAT -3'	50 °C	174-233
PL14	(CA) <sub>n</sub>	F: 5'- TGCCCAACACTGAACTGAG -3' R: 5'- CTCATCAACCTGCCTGGAAT -3'	61 °C	104-157
PL23	(CA) <sub>n</sub>	F: 5'- TTGGCTACTTCCCCAACAC -3' R: 5'- GGGGAAGTACTTTGACGATGC -3'	59 °C	204-251

PL28	(CA) <sub>n</sub>	F: 5'- GAAGCTTGGGCTCTTGACAT -3' R: 5'- CGTTTGCCTCTAGCCTTTTG -3'	59 °C	219-255
PL34	(CA) <sub>n</sub>	F: 5'- GAGCGGATTCTCCACATGAT -3' R: 5'- TAATGTGCTCCCTCCACAG -3'	56 °C	158-219
PL64	(CA) <sub>n</sub>	F: 5'- AGAGCAACACAGGGAGGAGT- 3' R: 5'- ACGCTCTGCTCAGCCATACT- 3'	62 °C	147-191
PL119	(CA) <sub>n</sub>	F: 5'- GAAAAAGGCTAGGGGACTGG- 3' R: 5'- GAGGAAAAT TGCCTT TTGTAGG- 3'	58 °C	146-206

Ta: Temperatura de alineamiento; pb: estimación de variación en el tamaño de los alelos por pares de bases.

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador TC-4000 en un volumen de 10 µl en los cuales se utilizó 200 µM de dNTPs, 1X PCR *buffer*, 0.2 µM de cada *primer*, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.25 U de *Taq* polimerasa (Rueda *et al.*, 2011). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C (30s), temperatura de alineamiento de cada *primer* (50-62°C) durante (30 s), 72°C (30 s), y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR fueron verificados en electroforesis en gel de agarosa 2% coloreados con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y revelados en un fotodocumentador *BIO-DOC System (UVP)*.

El tamaño de los productos obtenidos de las amplificaciones se genotipificó por medio de un equipo de electroforesis capilar de referencia QIAxcel System, utilizando un marcador de alineamiento entre 15 y 1.000 pares de bases (*DNA Aligment Marker*), el cual permitió cuantificar el tamaño en pares de base (pb) de los alelos y distinguir los individuos homocigotos de los heterocigotos. Para este proceso se utilizó el kit de alta resolución (QIAxcel DNA High Resolution Kit).

## 6.4 Análisis de la información

### 6.4.1 Determinación del mejor tipo de reproducción artificial

Las variables seleccionadas para determinar el mejor tipo de reproducción artificial para la producción de larvas con fines de repoblación fueron: peso, fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia, realizando comparaciones con cada una de las variables entre los dos métodos empleados. Las comparaciones se llevaron a cabo mediante una prueba *t-student* para cada variable, con un intervalo de confianza del 95%

en el programa estadístico IBM SPSS Statistics v.20 (IBM Corp. Released, 2011). De igual manera se analizaron los datos de los parámetros fisicoquímicos tomados durante la inducción de los reproductores y la incubación de los huevos.

#### **6.4.2 Evaluación del efecto de la variabilidad genética de los reproductores sobre la producción y calidad genética de las larvas**

Para evaluar el efecto de la variabilidad genética individual de los reproductores sobre el peso, fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia de larvas de bocachico con fines de repoblación, se realizó un Análisis de varianza a una vía (ANOVA) con cada variable y previamente se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas en el programa estadístico IBM SPSS Statistics v.20 (IBM Corp. Released, 2011). Se realizó el *test* de Tukey cuando fueron encontradas diferencias significativas entre los niveles de heterocigosidad individual de los reproductores para cada variable seleccionada.

Los datos de los parámetros fisicoquímicos fueron analizados mediante un Análisis de varianza (ANOVA) para cada variable (Temperatura, pH, Oxígeno, Dureza y Amonio) previamente se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Para evaluar el efecto de la variabilidad genética individual de los reproductores sobre la calidad genética de larvas de bocachico obtenidas durante las reproducciones, se calculó la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y el índice de endogamia ( $Fis$ ) de las larvas por medio del paquete computacional GENETIX v.4.05 (Belkhir, 2003). Además se contó con la información de los reproductores utilizados durante las reproducciones, para analizar estos mismos parámetros (Muñoz, 2013). Con los valores obtenidos se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) tanto para las larvas como para los reproductores, con la previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Además se realizó el *test* de Tukey para observar grupos homogéneos dentro de los sets de datos.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Determinación del mejor tipo de reproducción artificial (húmedo y seco) para producción de larvas de bocachico con fines de repoblación**

Los valores promedios del peso de los reproductores, fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia, obtenidos para los dos tipos de reproducción artificial (húmedo y seco) se muestran en la Tabla 2. Para el tipo de reproducción artificial en húmedo el peso promedio de las hembras fue de  $287.5 \pm 35.0$  g, mientras que las hembras utilizadas para la reproducción artificial en seco tuvieron un peso promedio de

280.8 ± 37.2 g, sin observarse diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), lo cual era necesario para el experimento, ya que esta variable puede afectar en la fecundidad.

**Tabla 2.** Valores promedio de las variables peso, fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia obtenidos para dos tipos de reproducción artificial (húmedo y seco) en bocachico (*Prochilodus magdalenae*) con sus respectivas desviaciones estándar.

Variable	Húmedo	Seco
Peso (g)	287.5 ± 35.0 <sup>a</sup>	280,8 ± 37.2 <sup>a</sup>
Fecundidad (N° de huevos/hembra)	79755.2 ± 18566.7 <sup>a</sup>	69134.2 ± 24750.9 <sup>a</sup>
Tasa de fertilización (%)	74.3 ± 18.9 <sup>a</sup>	52.1 ± 31.4 <sup>a</sup>
Tasa de eclosión (%)	58.6 ± 26.1 <sup>a</sup>	30.3 ± 31.2 <sup>a</sup>
Supervivencia (N° de larvas/hembra)	36040.8 ± 20507.4 <sup>a</sup>	13543.3 ± 19244.6 <sup>a</sup>

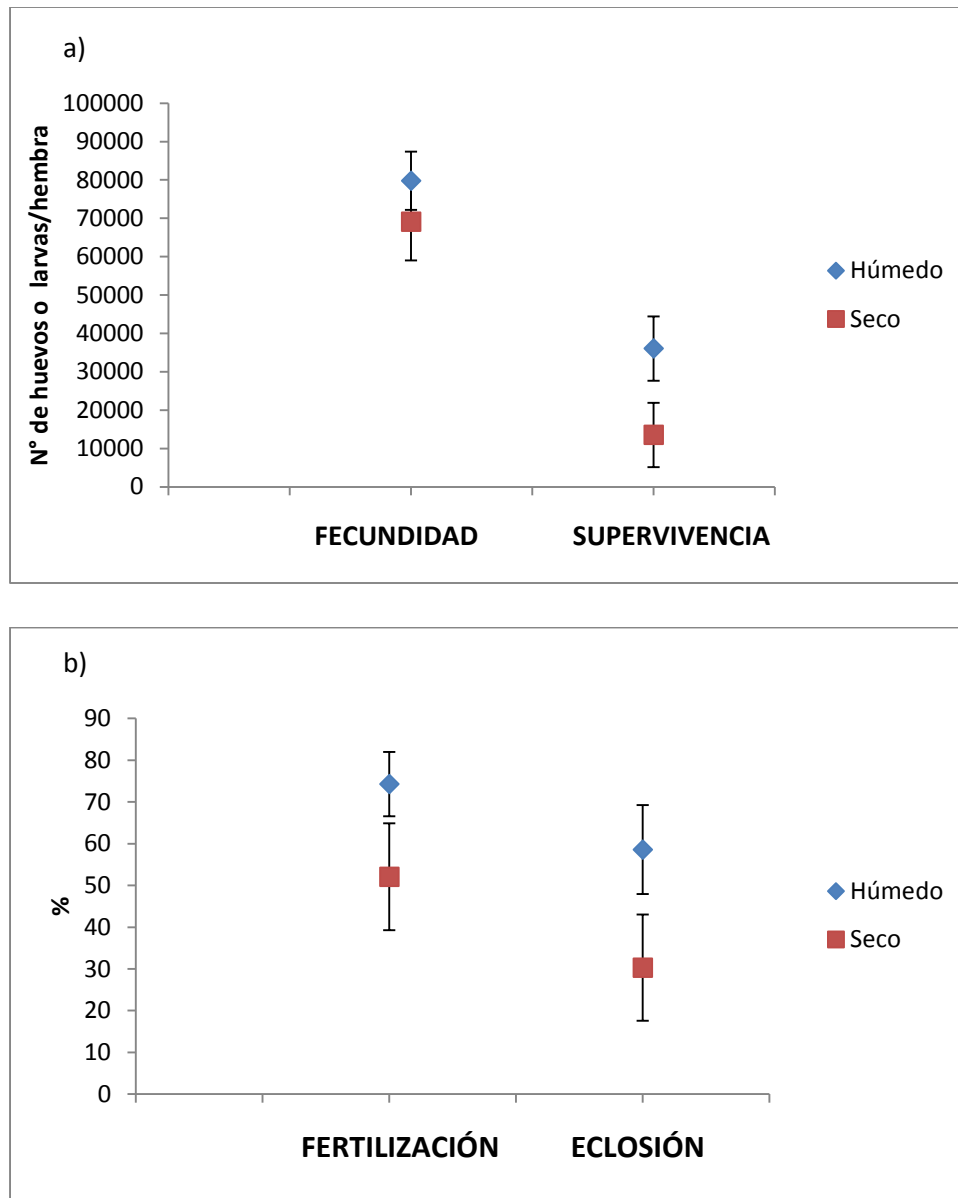
Letras diferentes dentro de una misma fila indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La fecundidad (N° de huevos/hembra) y la supervivencia (N° de larvas/hembra) no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para los dos tipos de reproducción artificial (seco y húmedo). Los datos obtenidos con respecto a la tasa de fertilización (porcentaje de huevos fertilizados) y eclosión (porcentaje de huevos eclosionados), tampoco mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al momento de realizar comparaciones entre los dos métodos.

A pesar de no encontrar diferencias estadísticas en cuanto a las comparaciones realizadas entre las variables para los dos métodos de reproducción, los valores promedio de cada una de las variables mostraron rendimientos diferentes para los dos tipos de reproducción (Figura 2).

Por otro lado, es importante resaltar que el grado de manipulación de los reproductores se convierte en un factor importante a tener en cuenta para determinar la eficiencia de los dos métodos. En este sentido, el método de reproducción en húmedo fue considerado como el mejor, debido a que se disminuyó el maltrato y el estrés provocado a los reproductores durante el evento reproductivo. Caso contrario fue registrado en el método reproductivo en seco, donde los animales perdieron múltiples escamas, hubo un descenso de la papila genital en las hembras y en ocasiones muchos organismos

tardaron en recuperarse luego de la extrusión manual. Sin embargo, hay que resaltar que durante este procedimiento no se presentó mortalidad de organismos. De acuerdo a lo anterior, el método húmedo fue escogido para los posteriores análisis.



**Figura 2.** a) Valores promedio de las variables fecundidad y supervivencia. b) Valores promedio del porcentaje de fertilización y eclosión para los dos tipos de reproducción artificial utilizados para la producción de larvas de bocachico con fines de repoblación. Las barras corresponden al error estándar de los datos.

En la tabla 3 se presentan los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos medidos durante la inducción hormonal de los reproductores y la incubación de los huevos. Para los dos tipos de reproducción artificial (húmedo y seco) las características fisicoquímicas del agua (temperatura, pH, dureza y amonio) se mantuvieron similares

durante el desarrollo de los experimentos. De acuerdo a lo anterior, no se registraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 3.** Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, dureza y amonio) medidos durante la inducción de los reproductores y la incubación de los huevos para ambos tipos de reproducción artificial (seco y húmedo) con sus respectivas desviaciones estándar.

Variable	Húmedo (inducción)	Húmedo (incubación)	Seco (inducción)	Seco (incubación)
Temperatura (°C)	28.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	28.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	28.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	28.1 ± 0.5 <sup>b</sup>
pH	7.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	6.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.0 ± 0.5 <sup>b</sup>
Oxígeno disuelto (mg/L)	3.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.2 <sup>b</sup>
Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	180.0 ± 18.8 <sup>a</sup>	182 ± 19.0 <sup>b</sup>	173 ± 15.4 <sup>a</sup>	177 ± 17.0 <sup>b</sup>
Amonio (mg/L)	0.1 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.02 <sup>b</sup>

El análisis estadístico se realizó entre los dos tipos de reproducción artificial (húmedo y seco) medidos para cada etapa del proceso (inducción e incubación). Letras iguales entre las columnas analizadas indican que no hubo diferencias entre las variables significativas ( $p < 0.05$ ).

## 7.2 Efecto de la variabilidad genética individual de los reproductores sobre la producción de larvas de bocachico con fines de repoblación utilizando el tipo de reproducción artificial húmedo

Para evaluar el efecto de la variabilidad genética individual de los reproductores sobre la producción de larvas de bocachico, fue seleccionado el método artificial en húmedo en el cual posteriormente se variaron los niveles de heterocigosidad individual de los reproductores en intervalos de 0-0.3; 0.3-0.6 y 0.6-1. Los valores promedios de peso de los reproductores, tasa de fertilización, supervivencia, tasa de eclosión y fecundidad se muestran en la Tabla 4. Con respecto a las tres primeras variables referenciadas anteriormente, estas presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el primer intervalo de heterocigosidad individual (0-0.3) y los dos intervalos de heterocigosidad comprendidos entre 0.3-0.6 y 0.6-1 (Tabla 4). Por otro lado, el número de huevos por hembra y la tasa de eclosión no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tres niveles de heterocigosidad analizados.

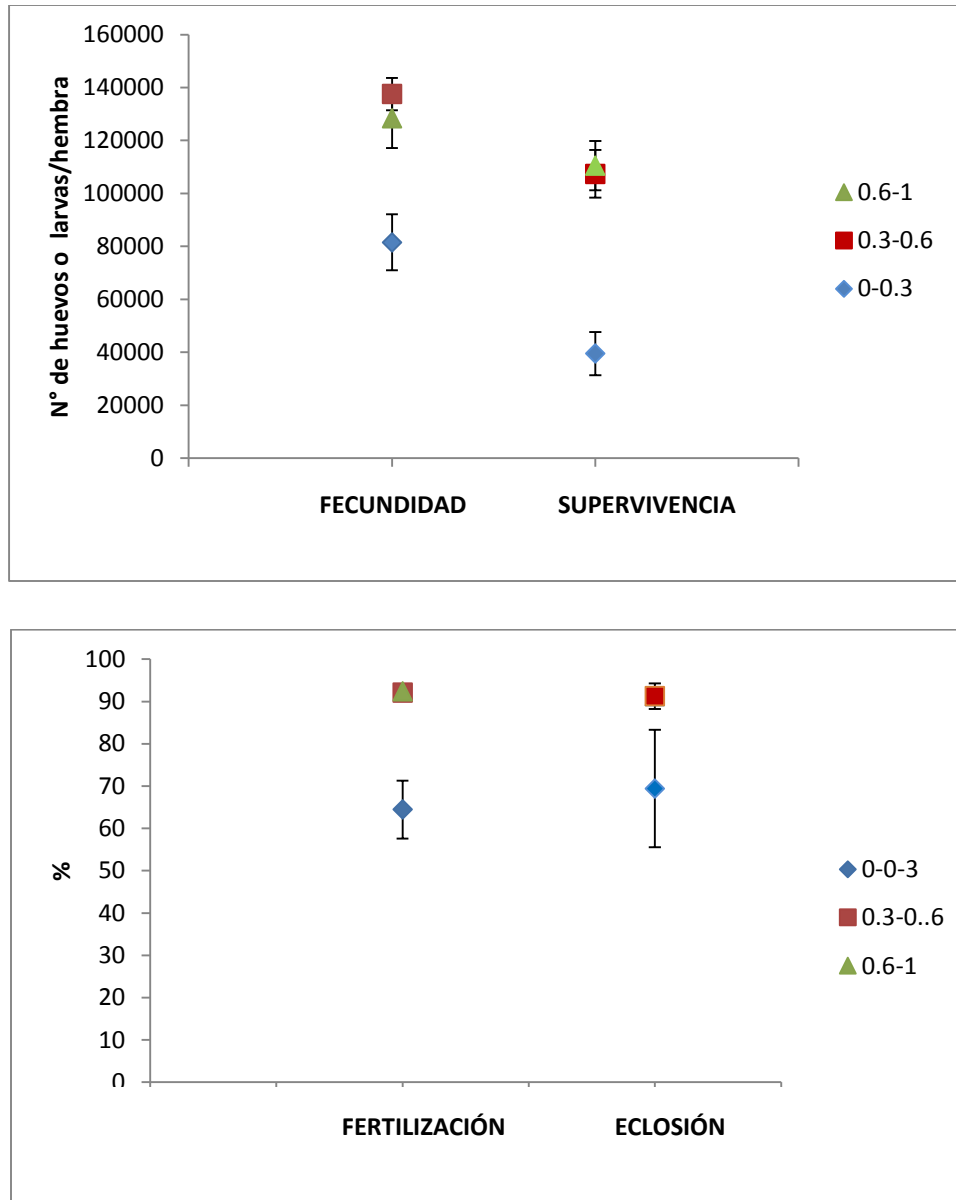


**Tabla 4.** Valores promedios de peso, fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión de reproductores (hembras) de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) inducidas bajo el tipo de reproducción artificial húmedo con sus respectivas desviaciones estándar.

<b>Variable</b>	<b>0-0.3</b>	<b>0.3-0.6</b>	<b>0.6-1</b>
Peso (g)	358.33 ± 46.46 <sup>a</sup>	485.00 ± 18.03 <sup>b</sup>	486.66 ± 11.59 <sup>b</sup>
Fecundidad (N° de huevos/hembra)	100017.00 ± 18312.63 <sup>a</sup>	133433.00 ± 19418.88 <sup>a</sup>	137648.67 ± 10564.80 <sup>a</sup>
Tasa de fertilización (%)	64.44 ± 11.90 <sup>a</sup>	92.06 ± 3.46 <sup>b</sup>	92.37 ± 2.97 <sup>b</sup>
Tasa de eclosión (%)	69.42 ± 24.04 <sup>a</sup>	91.23 ± 8.60 <sup>a</sup>	91.25 ± 5.26 <sup>a</sup>
Supervivencia (N° de larvas/hembra)	39512.33 ± 14194.79 <sup>a</sup>	107409.33 ± 15602.41 <sup>b</sup>	110512.33 ± 16103.11 <sup>b</sup>

Letras diferentes dentro de una misma fila indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Las diferencias significativas encontradas entre los dos intervalos más altos de heterocigosidad individual (0.3-0.6, 0.6-1) y el primer intervalo (0-0.3) son corroboradas con los valores promedio obtenidos para cada variable analizada, gráficamente se puede observar un solapamiento entre los dos últimos intervalos (Figura 3). Los parámetros fisicoquímicos para este experimento no presentaron diferencias con respecto a los parámetros del experimento anterior (Tabla 3), puesto que se mantuvieron constantes.



**Figura 3.** a) Valores promedio de las variables fecundidad y supervivencia. b) Valores promedio del porcentaje de fertilización y eclosión de los tres intervalos de heterocigosidad individual de los reproductores (0-0.3, 0.3-0.6, 0.6-1) bajo el tipo de reproducción artificial en húmedo para la producción de larvas de bocachico con fines de repoblación. Las barras corresponden al error estándar.

### 7.3 Efecto de la variabilidad genética individual de los reproductores sobre la calidad genética de larvas de bocachico con fines de repoblación utilizando el tipo de reproducción artificial húmedo

Los valores promedio de heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He) y el índice de endogamia (Fis) de los reproductores utilizados para la obtención de las progenies, presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para cada uno de estos parámetros entre los tres intervalos de heterocigosidad individual (Tabla 5).

Por otro lado, los valores obtenidos para el Ho y Fis en las larvas (progenies) mostraron diferencias significativas entre los diferentes intervalos de heterocigosidad individual comparados ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, para el parámetro He no hubo diferencias entre los niveles de heterocigosidad analizados (Tabla 6). Con base a las diferencias observadas entre las diferentes comparaciones, se realizó el *test* de Tukey, confirmando que el último intervalo (0.6-1) difiere de los otros dos para los parámetros mencionados.

**Tabla 5.** Valores promedio de heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He) y el índice de endogamia (Fis) de los reproductores de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) utilizados para la obtención de las progenies analizadas con sus respectivas desviaciones estándar.

Heterocigosidad individual	Ho	He	Fis
0-0.3	0.190 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.887 ± 0.012 <sup>a</sup>	0.774 ± 0.019 <sup>a</sup>
0.3-0.6	0.444 ± 0.018 <sup>b</sup>	0.910 ± 0.009 <sup>b</sup>	0.487 ± 0.007 <sup>b</sup>
0.6-1	0.730 ± 0.024 <sup>c</sup>	0.931 ± 0.010 <sup>c</sup>	0.177 ± 0.016 <sup>c</sup>

Letras diferentes dentro de una misma columna indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 6.** Valores promedio de heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He) y el índice de endogamia (Fis) de larvas de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) utilizando el tipo de reproducción artificial húmedo con sus respectivas desviaciones estándar.

<b>Heterocigosidad individual</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Fis</b>
0-0.3	0.198 ± 0.019 <sup>a</sup>	0.853 ± 0.031 <sup>a</sup>	0.765 ± 0.028 <sup>a</sup>
0.3-0.6	0.206 ± 0.029 <sup>a</sup>	0.840 ± 0.041 <sup>a</sup>	0.765 ± 0.023 <sup>a</sup>
0.6-1	0.392 ± 0.032 <sup>b</sup>	0.852 ± 0.025 <sup>a</sup>	0.546 ± 0.031 <sup>b</sup>

Letras diferentes dentro de una misma columna indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

En la parte experimental de la investigación, no todas las hembras seleccionadas respondieron a la inducción hormonal, sin embargo, cada hembra que no respondió fue reemplazada por otra de la misma calidad (abdomen, papila genital) y condición genética, garantizando el número de tríos propuesto en el diseño experimental. Por otro lado, todos los reproductores utilizados en el experimento sobrevivieron, pese al maltrato ocasionado en los animales que se les realizó extrusión, es decir, no hubo mortalidad de reproductores.

A pesar de lo anterior, por presentar mejores valores promedio y menor maltrato en los animales se escogió el método húmedo para la segunda fase de la investigación, la cual correspondió a la variación de los intervalos de heterocigosidad. Povh, (2007) argumenta que la utilización del sistema húmedo o semi-natural disminuyó significativamente el maltrato en los animales, ayudando en la preservación de los reproductores, esto posibilita que un mayor número de individuos contribuya con la progenie, permitiendo la manutención de la variabilidad genética a través de las frecuencias alélicas de los reproductores. Por último concluye que para los programas de repoblación, el sistema semi-natural o húmedo debe ser implementado en la obtención de progenes que serían liberadas al medio natural. De la misma manera, Lopera – Barrero *et al.*, (2007), encontraron que para *Piaractus mesopotamicus* y *Prochilodus lineatus*, una desventaja del método en seco es que la extrusión se realice antes del tiempo indicado, ocasionando una baja viabilidad en los ovocitos y por ende una baja tasa de fertilización. Aunque el método es eficaz para el aumento de la variabilidad (es posible fertilizar con varios machos).

Otros autores argumentan (Reynalte-Tataje *et al.*, 2002) que en el desove semi-natural, los individuos ajustan y sincronizan la liberación de los gametos, en el intervalo óptimo de madurez, garantizando una alta tasa de fertilización. Este hecho implica una ventaja significativa del método húmedo, ya que en comparación con el método seco, la posibilidad de errar al momento de seleccionar la hembra aumenta debido al corto

periodo óptimo de maduración. En este sentido estos autores encontraron una mayor tasa de fertilización para *Leporinus macrocephalus* con el desove semi-natural.

Para el presente estudio se asume que no hubo errores al momento de hacer la extrusión a la hembra puesto que se tuvo en cuenta parámetros propios en animales óptimos a desovar tales como el movimiento, ronquidos en machos y expulsión de gametos con una leve presión encéfalo-caudal, sin forzar las hembras. Al igual que en el experimento mencionado anteriormente, se observó mayor tasa de fertilización con el método húmedo para *P. magdalenae*.

Un factor que pudo ser determinante en la escogencia del método es la calidad del agua, puesto que la eficiencia en los procesos de reproducción inducida dependen en gran parte de las condiciones ambientales y la calidad del agua durante la inducción y la incubación (Atencio, 2001). El agua utilizada en esta investigación fue la de la estación piscícola del SENA-Magdalena, que corresponde a agua proveniente de un pozo profundo, totalmente cristalina, sin sólidos en suspensión ni alimento vivo, manteniendo sus parámetros constantes durante todo el experimento; a diferencia de otras estaciones piscícolas que toman el agua directamente de los ríos (aguas con sólidos en suspensión, alimento vivo y materia orgánica) para realizar los procesos de inducción e incubación, resultando letal para los huevos por medio de la adherencia en su gran medida de la materia orgánica.

Según Lopera-Barrero *et al.*, 2007, para implementar programas de repoblación, lo principal es investigar la variabilidad genética de los reproductores mantenidos en cautiverio en las estaciones piscícolas y después evaluar genéticamente las progenies, ya que un mal manejo reproductivo puede ocasionar pérdida significativa de variabilidad genética en tan solo una generación (Moreira, 2003; Porta *et al.*, 2006; Povh *et al.*, 2006).

Con miras a realizar programas de repoblación como medida de preservación de las especies amenazadas como es el caso del bocachico *P. magdalenae*, en esta investigación luego de conocer las características genéticas de los reproductores, se evaluó la influencia de ésta sobre la producción y calidad genética de las larvas. Para el efecto sobre la producción, se pudo observar que los parámetros reproductivos tales

como fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia son condicionados por el nivel de heterocigosidad individual del reproductor, puesto que se minimizó el impacto de otras variables tales como la edad de los reproductores (todos los reproductores tenían entre 12 y 16 meses, ya que la edad podría en ocasiones afectar la fecundidad) y la época en que fue realizado el experimento (Jerez *et al.*, 2012).

Para la calidad genética, el nivel más alto de heterocigosidad individual proporcionó a las progenies una mayor heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y una menor endogamia ( $F_{is}$ ), asumiendo que la condición genética es dependiente de la condición genética del reproductor. Sin embargo, el parámetro  $H_o$  para los reproductores es mayor contrastado con el arrojado por las larvas. Rodríguez *et al.*, (2010), en *Brycon orbignyanus* manifestaron que es posible una tendencia a la disminución de la variabilidad genética durante las fases de crecimiento, ya que la heterocigosidad observada fue decreciendo desde el reproductor, siguiendo con la larva (0.864) hasta alevinos de 30 días (0.635).

## **9. CONCLUSIONES**

- Para repoblación es requerido implementar el tipo de reproducción artificial húmedo, principalmente porque mejora la producción de larvas en términos de fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia.
- A pesar de que los microsatélites utilizados en la investigación, no son específicos para *P. magdalенаe*, fueron eficaces para identificar la condición genética de las larvas.
- Existe un buen potencial para la restauración de la población, puesto que en todos los casos aunque la heterocigosidad observada fue baja, la heterocigosidad esperada estuvo por encima de 0.7.
- Los parámetros de producción, fecundidad, tasa de fertilización, tasa de eclosión y supervivencia, son condicionados por la calidad genética de los reproductores.
- La calidad genética de la larva depende directamente del nivel de heterocigosidad individual de los reproductores.



## 10.RECOMENDACIONES

- Realizar la investigación bajo otras condiciones de calidad de agua.
- Hacer seguimientos en todo el proceso de producción de semilla para repoblación (huevos, larvas, alevinos), ya que es posible que haya una tendencia a la disminución de la variabilidad genética durante las fases de crecimiento.
- Realizar el experimento en otra época y con animales que presenten más de un desove, para analizar como fluctúan los parámetros de producción de larvas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Agosthino A.A., S.M. Thomaz y L.C. Gomes, 2005. Conservação de biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Mega diversidade* 1:70-78.

Alam M.S. y M.S. Islam, 2005. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture* 246:151-160.

Atencio V.J., 2000. Impactos de la Hidroeléctrica Urrá en los peces migratorios del río Sinú. *Rev Temas Agrarios*; 5(9): 29-40.

Atencio V.J., 2001. Producción de alevinos de especies nativas. Montería: CINPIC/Universidad de Córdoba, *Revista MVZ*; 3 p.

Balding, D.J., M. Bishop y C. Cannings (Eds.), 2007. *Handbook of Statistical Genetics*. Third Edition. John Wiley & Sons, Ltd. England. 1392 p.

Barbosa, A., F. Galzerani, T. Corrêa, P.M. Galetti y T. Hatanaka, 2008. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Genetics and Molecular Biology* 31, 1 (suppl), 357-360.

Belkhir, K. y F. Bonhomme, 2003. (Partition ML,). Université de Montpellier II CNRS UMR 5000: Laboratoire Génome, Populations, Interactions. Francia.

Campos W., 2009. Análise comparativa da variação genética entre os estoques cultivado e natural de *Prochilodus argenteus*: implicacoes para o repovoamento de rios. Tesis de Maestría. Sao Carlos. UFS Car.

Carvalho-Costa, L.F., T. Hatanaka y P.M. Galetti Jr., 2008. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology* 31(1) (suppl): 377-380.

Castro, R.M. y R.P. Vari, 2004. Detritives of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysii: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. Washington: Smithsonian. 187 p.

Castiblanco J., 2003. Caracterización genética de dos poblaciones de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en la cuenca del río Sinú. Bogotá, Colombia: Departamento de biología. Universidad de los Andes. 180.

CCI, 2010. Pesca y acuicultura: Colombia 2010. Corporación colombiana internacional INCODER, Bogotá. 56 p.

Dahl G., 1971. Los peces del norte de Colombia. Bogotá (Colombia): Instituto de Desarrollo de los Recursos Naturales Renovables, (Inderena), Talleres Litografía Arco. p. 391.

Coltman D.W., W.D. Bowen y J.M Wright, 1998. Birth weight and neonatal survival of harbour seal pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. Proc. R. Soc. Lond. B.

Flecker A., 1996. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. Ecology 77:1845-1854.

Hartl D.L. y A.G. Clark, 1997. Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, Massachussetts.

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.

IBM Corp. Released, 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Jiménez-Segura L., 2007. Ictioplancton y períodos reproductivos de los peces del río Magdalena medio. [Tesis de doctorado] [Medellín, (Colombia)]: Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, p. 256.

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. Aquaculture Research 37:701-707.

Kamler E., 1992. Early life history of fish: An energetics approach. England: Chapman y Hall. p. 267.

Liu, Z.J. y J.F. Cordes, 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1-37.

Lopera-Barrero N.M., R.P. Ribeiro, R.N. Sirol, J.A. Povh, P.C. Gomes, L. Vargas y D.P. Streit, 2006. Genetic diversity in Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random amplified polymorphic DNA) markers. *Journal Animal Science* 84:170-170.

Lopera-Barrero N.M., 2007. Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. Tesis PhD. Univ. Est. Maringá. Maringá, Brasil.

López M., F. García y E. Rubio, 2004. Caracterización molecular y sanitaria del bocachico (*Prochilodus reticulatus*) de la cuenca alta del río Cauca. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola* 1: 37 p.

Machado-Schiffiano G., E. Dopico y E. Vasquez-García, 2007. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. *Aquaculture*. 264. 59-65 p.

Maldonado-Ocampo J.A., R.P. Vari, y J.S. Usma, 2008. Checklist of the Freshwater Fishes of Colombia. *Biota Colombiana* 9(2): 143 – 237.

Marrugo-Negrete J., L.N. Benítez y J. Olivero-Verbel, 2008. Distribution of mercury in several environmental compartments in an aquatic ecosystem impacted by gold mining in northern Colombia. *Arch Environ Contam Toxicol* 55:305-316.

Mojica J.I., C. Castellanos, J.S. Usma y R. Álvarez (Eds), 2002. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia y Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá.

Mojica, J. I., C. Castellanos, J. S. Usma y R. Álvarez (Eds), 2012. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia 2012. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de ciencias naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales. Bogotá, D.C., Colombia, 319 pp.

Monteiro D.A., J.A. Almeida, F.T. Rantin y A.L. Kalinin, 2006. Oxidate stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide folisuper 600 (metrhy parathion). *Compbiochemphysiol.*143(2):141-149.

Moreira H.L., 2001. Genética e melhoramento de peixes. Pages 135-147. *Fundamentos da moderna aquicultura.* Ulbra, Canoas, Brasil.

Moreira H.L., S. Zimmermann, R.P. Ribeiro, R.G. Bastos, L.D. Vargas y J.A. Povh, 2003. The use of RAPD (Random amplified polimorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. Page 460. In *World Aquaculture*, Salvador, Brasil.

Muñoz E.L., 2013. Establecimiento de dos sistemas de reproductores con criterio genético para obtener progenies de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) con fines de repoblamiento en dos estaciones piscícolas del Norte de Colombia. Tesis de pregrado.

Narváez, J., 2006. Especies exóticas en Colombia: Evaluación de la estructura genética y morfométrica de las poblaciones naturalizadas y domesticadas de *Oreochromis niloticus* (Pisces:Cichlidae) en el Norte de Colombia (p. 290-299). Tesis de maestría. UNAL.

Olaya-Nieto C.H., F.F. Segura-Guevara, S.B. Bru-Cordero y H.M. Blanco-Viellar, 2003. Biología reproductiva del bocachico (*Prochilodus magdalenae* Steindachner 1878) en el río Sinú (Colombia). *Revista II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA* 2003:723-734.

Orozco, G.J., 2013. Evaluación de la estructura genética de la población de bocachico *Prochilodus magdalenae* (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE) en la cuenca del río Magdalena y sus principales tributarios – Colombia.

Porta, J., J.M. Porta, G. Martínez-Rodríguez y M.C Alvarez, 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* 251: 46-55.

Povh, J.A., R.P. Ribeiro, R.N. Sirol, C.A. Mangolin, E. Gasparino, N.M. Lopera-Barrero, P.C. Gomes, D.P. Streit Jr. y L. Vargas, 2006. Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. Tese de doutorado.

Povh J.A., 2007. Avaliação de diversidade genética e do manejo reproductivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Tese doctorado em Zootecnia). Maringá: Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá.

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.

Primmer, C., J. Piironen, A. Landry, E. Ranta, J. Merila, S. Pakkasmaa y P. Eskelinen, 2003. Prediction offspring fitness based on parental genetic diversity in endangered salmonid populations. Journal of Biology 63, 909-927.

Reynalte-Tataje D.A., B.M. Esquivel, J.R. Esquivel y E. Zaniboni-Filho, 2002. Reproduccion inducida del piauÁu, *Leporinus macrocephalus* (Characiformes, Anostomidae). Boletim do Instituto de Pesca; 28(1):11-18.

Rodriguez-Rodriguez, M.P., N.M Lopera-Barrero, R. Pereira, J. Povh, L. Vargas, R. Nardez y C. Bernal, 2010. Diversidad genética de piraicanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. Pesq. Agropec. v.45. 56-63 p.

Román, C., 1993. Status taxonómico del bocachico *Prochilodus magdalenae*. Rev. Col. Ciencia, 9:17-26, 1993.

Rueda, E., J. Sommer, P. Scarabotti, R. Markariani y G. Ortí, 2011. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae), Conservation Genetics Resources.

Ryder, O., 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. Trends in ecology and evolution. V 7 p 9-10.

Santacruz D., 2003. Evaluación de la variabilidad genética con marcadores microsatélites del bocachico *Prochilodus magdalenae* (Steindachner 1878) en el Río Sinú, Colombia. Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 126 p.

Seal, U., 1988. Intensive technology in the care of ex situ populations of vanishing species. En: Campos W. 2009. Análise comparativa da variação genética entre os estoques cultivado e natural de *Prochilodus argenteus*: implicacoes para o repovoamento de ríos. Tesis de Maestria. Sao Carlos. UFSCar.

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.

Sivasundar, A., E. Bermingham y G. Ortiz, 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular ecology*, v 10. Pag 407-417.

Solano J.M., 1992. Reproducción inducida de la dorada (*Brycon moorei sinuensis*) y bocachico (*Prochilodus magdalenae*). Montería: Cinpic. 5 p.

Sunnucks P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15 (5): 199-203.

Valderrama M., M. Mogollón, C. Nuñez, D. Solano y A. Álvarez, 2002. Monitoreo y Estadística Pesquera en la Cuenca del Río Sinú con Participación Comunitaria. Periodo 2001-2002. Convenio INPA-URRA E.S.P. Montería.

Wasko, A.P., C. Martins, C. Oliveira, J.A. Senhorini, & 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: 48. Welcomme, R., 1979. *Fisheries Ecology of foodplanin rivers*. Lodon: Longman Group Limited.