

**EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE SISTEMAS DE  
REPRODUCTORES DE BOCACHICO *Prochilodus magdalenae* (PISCES:  
PROCHILODONTIDAE) UTILIZADOS PARA REPOBLAMIENTO**

**DANIEL CASTAÑEDA VALBUENA**



**PROGRAMA DE INGENIERÍA PESQUERA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA  
SANTA MARTA, MAYO DE 2012**

**EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE SISTEMAS DE  
REPRODUCTORES DE BOCACHICO *Prochilodus magdalenae* (PISCES:  
PROCHILODONTIDAE) UTILIZADOS PARA REPOBLAMIENTO**

Tesis de pregrado para optar el título de Ingeniero pesquero

**DANIEL CASTAÑEDA VALBUENA**

Director

**JUAN CARLOS NARVÁEZ BARANDICA**

Docente de planta del Programa de Ingeniería Pesquera  
Laboratorio de Genética Molecular

**PROGRAMA DE INGENIERÍA PESQUERA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA  
SANTA MARTA, MAYO DE 2012**

IP  
00160  
Ej 1

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial al profesor Juan Carlos Narváz B. por haber confiado en mí para el desarrollo de esta investigación y por haber tenido la paciencia para explicarme como sortear cada uno de los inconvenientes encontrados durante el transcurso de la investigación.

Muchas gracias doy a todos los que hicieron y hacen parte del *Laboratorio de Genética Molecular* del programa de Ingeniería Pesquera de la Universidad del Magdalena, a todos los que de manera directa e indirecta ayudaron en la realización de este trabajo, especialmente a Eider Muñoz, Gilberto Orozco, Juan Carlos Aguirre, Fania Bolívar y Ana Carolina Torregroza.

También agradezco a mis padres, quienes de desde la distancia siempre estuvieron apoyándome para sacar adelante mi carrera y tesis. A Anelena Campuzano, quien fue un soporte especial en los momentos de dificultad que esta investigación tuvo; a la profesora Consuelo Burbano, quien sin pensarlo abrió las puertas de su laboratorio, para que mi trabajo se desarrollara de manera eficiente.

Quiero darle un agradecimiento especial al Profesor Aroldo Daza de la estación piscícola del SENA agropecuario de Santa Marta y a la profesora María del Pilar Dorado de la estación piscícola de Repelón (Atlántico), por brindarnos todo el apoyo logístico, para la toma de muestras en estas estaciones.

## RESUMEN

Debido a la gran cantidad de modificaciones ambientales que ha sufrido el río Magdalena y a la sobrepesca, las poblaciones de Bocachico (*Prochilodus magdalenae*) han mostrado una disminución considerable en su tamaño. Para evitar la extinción de esta especie, las autoridades ambientales de Colombia con ayuda de centros piscícolas vienen implementando varios programas para repoblar la cuenca del Magdalena con semillas de bocachico. Sin embargo, la implementación de estos programas, viene dándose de manera arbitraria y sin ningún soporte científico que las respalde. Estos repoblamientos pueden estar agilizando la extinción de la especie, puesto que las larvas utilizadas pueden presentar problemas de variabilidad genética, debido al mal manejo de los reproductores en los centros piscícolas. El objetivo de esta investigación fue analizar la diversidad genética de lotes de bocachico utilizados en programas de repoblamiento, mediante marcadores moleculares microsátélites. Se utilizaron 60 reproductores provenientes de dos estaciones piscícolas ubicadas en los departamentos de Magdalena (SENA) y Atlántico (Repelón). Los siete microsátélites utilizados fueron polimórficos, suministrando entre 10 y 35 alelos por locus. La diferenciación genética moderada entre las dos estaciones no fue significativa ( $F_{st}=0.0104$ ;  $p>0.05$ ). La diversidad genética observada para los lotes estudiados fue muy baja (SENA  $H_o < 0.1$ ; Repelón  $H_o < 0.13$ ); y el grado de endogamia en general mostró valores altos ( $F_{is} > 0.8$ ). Es probable que estos resultados observados sean producto de cuatro factores: (i) manejo inadecuado de los reproductores por efecto de selección artificial; (ii) efecto fundador, debido al tamaño de la población inicial de reproductores; (iii) el origen de los reproductores sea el mismo; (iv) que la población de reproductores en los dos centros reflejen la condición actual de la población natural. Se discute la necesidad de introducir el criterio genético para mejorar las condiciones genéticas de los reproductores de bocachico utilizados para el repoblamiento en Colombia que permita garantizar la conservación de la especie.



## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. PRESENTACIÓN.....	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
3. ANTECEDENTES.....	12
4. MARCO TEÓRICO.....	14
4.1. ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE.....	14
4.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA ( <i>Prochilodus magdalenae</i> ).....	14
4.1.2. MORFOLOGÍA Y ANATOMÍA DE <i>P. magdalenae</i> .....	14
4.1.3. BIOLOGÍA BÁSICA DE <i>P. magdalenae</i> .....	15
4.1.4. GENÉTICA DE <i>P. magdalenae</i> .....	15
4.2. MARCADORES MICROSATÉLITES.....	15
4.3. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOTES DE PECES MANTENIDOS EN CAUTIVERIO.....	15
5. JUSTIFICACIÓN.....	18
6. OBJETIVOS.....	19
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	19
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
7. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN.....	20
7.1. FASE DE CAMPO.....	20
7.2. FASE DE LABORATORIO.....	20



7.2.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN.....	20
7.2.2. AMPLIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES..	21
7.3. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	22
8. LIMITACIONES.....	24
9. RESULTADOS.....	25
9.1. POLIMORFISMO DE LOS MICROSATÉLITES.....	24
9.2. DIVERSIDAD GENÉTICA POR ESTACIÓN PISCÍCOLA.....	26
9.3. ENDOGAMIA.....	26
9.4. EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG (E-HW).....	26
9.5. DIFERENCIA GENÉTICA.....	28
10. DISCUSIÓN.....	30
11. RECOMENDACIONES.....	33
12. BIBLIOGRAFÍA.....	34

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Diversidad genética por locus teniendo en cuenta el sistema de reproductores de Bocachico <i>P. magdalenae</i> en las dos estaciones estudiadas. $T_m$ es la temperatura anillaje; $N$ representa el tamaño de la muestra; $N_a$ es el número de alelos; $H_e$ es la heterocigosidad esperada y $H_o$ es la heterocigosidad observada.....	25
<b>Tabla 2.</b> Diversidad genética del sistema de reproductores de Bocachico <i>P. magdalenae</i> por estación piscícola; $N_a$ es el numero de alelos, los valores entre paréntesis son el promedio de alelos por locus con su desviación estándar; $H_e$ es la heterocigosidad esperada; $H_o$ es la heterocigosidad observada. Los valores entre paréntesis de estas dos variables corresponden a las desviaciones estándar.....	27
<b>Tabla 3.</b> Valores totales del índice de endogamia para cada locus en el análisis genético de los dos sistemas de reproductores de Bocachico <i>P. magdalenae</i> en las estaciones piscícolas de Repelón y el SENA. D.E, corresponde a la desviación estándar de los valores, valores hallados por medio de la técnica de Jackknife.....	28

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> <i>Prochilodus magdalenae</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Frecuencia alélica de cada locus en el sistema de reproductores de Bocachico <i>P. magdalenae</i> de las estaciones piscícolas de Repelón y el SENA.....	29





## 1. PRESENTACIÓN.

Según la CCI (2007), la disminución de las poblaciones de bocachico en las cuencas de los ríos Magdalena, Sinú y Atrato es notable. Las capturas han disminuido de manera significativa entre los años 2002 y 2006 (20%). Esta disminución es el resultado de factores antropogénicos que han alterado durante varias décadas su hábitat natural y su tasa de renovación poblacional. Aunque se han implementado medidas pesqueras para mitigar el impacto, se vienen poniendo en marcha medidas para restaurar las poblaciones nativas a través del repoblamiento; sin embargo, esta medida mitigante se ha estado ejecutado sin previa investigación científica que soporte su efectividad en la conservación de las especies. Por el contrario, el repoblamiento como herramienta de conservación, puede estar causando una pérdida significativa de la información genética del bocachico, y esto podría acelerar el proceso de extinción de la especie. Por esta razón, se decidió utilizar marcadores moleculares (microsatélites) para evaluar el estado genético de los reproductores utilizados en la mayoría de los repoblamientos en la cuenca baja del río Magdalena.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La disponibilidad del recurso Bocachico (*Prochilodus magdalenae*) ha ido disminuyendo en las cuencas hídricas de Colombia, debido a la pesca sin control, la contaminación masiva de las fuentes hídricas y la deforestación, a tal punto de ser considerada una especie en peligro crítico de extinción (Mojica *et al.*, 2002). Tal y como lo muestra CCI (2007), reportando una disminución aproximada del 20% en las capturas realizadas entre 1992 y 2007.

Actualmente en Colombia, al igual que en muchos países, las autoridades ambientales intentan mitigar el impacto producido por este tipo de perturbaciones, para lo cual se han propuesto el uso de medidas tales como: las vedas, tallas reglamentarias de captura, mejora y prohibición de artes de pesca y los repoblamientos. El repoblamiento es una de las estrategias más usadas para la rehabilitación pesquera, aunque involucra riesgos relativos en la eficiencia del programa en cuanto a sus resultados en la preservación del *pool* genético (Hickley, 1994).

El problema de los planes de repoblamiento, es que estos se realizan en su mayoría de manera arbitraria y sin fundamentos ecológicos y genéticos que los respalden (Agostinho *et al.*, 2005). Los centros piscícolas encargados de producir semillas para repoblar las cuencas en las que se ha visto una notable reducción en el tamaño de las poblaciones de bocachico (*Prochilodus magdalenae*), realizan en su mayoría los cruces reproductivos utilizando organismos seleccionados por sus características físicas (tamaño, coloración, etc.) y no por su información genética, los cuales no desarrollaran poblaciones autosostenibles a largo plazo. Esto genera pocos beneficios para la conservación de las poblaciones repobladas, ya que este tipo de selección puede generar una pérdida en la variabilidad genética en sistemas de reproductores utilizados con fines de fomento (Narváez, 2006) y para repoblamiento (Moreira *et al.*, 2003; Wasko *et al.*, 2004; Porta., 2006). Es así que para el caso del bocachico, Santacruz (2003) determinó que las estaciones



piscícolas que proveen de semilla al programa de repoblamiento en el río Sinú presentaron variabilidad genética baja. Esto puede ser un patrón común en la mayoría de las estaciones o centros piscícolas que comercializan semilla de bocachico para repoblamiento y es necesario investigarlo para corregirlo.

Los principales motivos de la reducción de la variabilidad genética de lotes de peces en cautiverio se atribuyen a: la utilización de pocos reproductores (Wasko *et al.*, 2004), el cruzamiento entre reproductores emparentados genéticamente (endogamia) (Moreira, 2003; Povh *et al.*, 2006) y la selección casual de los peces para la reproducción (Povh *et al.*, 2006; Frost *et al.*, 2006).

Siendo conscientes de los impactos negativos que se ciernen sobre los ambientes acuáticos, las medidas tomadas por las autoridades ambientales para la conservación y recuperación de los mismos, deben llevar implícito un fuerte conocimiento acerca del componente genético tanto de los reproductores utilizados para los repoblamientos, como el de cada población que habita dichos ambientes. Por eso la correcta selección del grupo de reproductores de bocachicos que sean utilizados para propósitos de conservación y repoblamientos, es de suma importancia (Wasko *et al.*, 2004). El riesgo de usar animales con poca información genética para la conformación de un lote de reproductores para repoblamiento, es introducir información genética que no necesita la población receptora, pues empeoraría la condición natural de la población, llevándola a que se aceleren los procesos de extinción. Para el caso del bocachico de la cuenca del río Magdalena, se sabe que las autoridades ambientales y los entes territoriales desarrollan anualmente programas de repoblamientos en la parte media y baja. Lamentablemente no se conoce el estado genético de los lotes de reproductores de las estaciones que participan en la comercialización de la semilla y por lo tanto, es necesario que se inviertan esfuerzos para determinarlo.

La pregunta que surge para el desarrollo de la investigación es la siguiente: ¿Cual es la estructura genética de los lotes de reproductores de bocachico en los centros piscícolas SENA (Magdalena) y Repelón (Atlántico) empleados en la producción de semilla para repoblamiento?.



### 3. ANTECEDENTES.

Alrededor del 20% de los peces de de aguas continentales en todo el mundo están extintos o en peligro de extinción (Agencia Estadual de Noticias, 2007), debido a esto se están implementando herramientas que sirvan para la conservación de las especies amenazadas. Según Lopera *et al* (2008), los programas de repoblamiento son herramientas altamente efectivas para la conservación y recuperación de estas especies. No obstante, estos programas pueden convertirse en un problema de mayor magnitud para los ecosistemas, si no se cuenta con un apoyo científico para su correcto desarrollo (Agostinho *et al.*, 2005). La pérdida de la variabilidad genética de una especie puede promover una mayor sensibilidad a las variaciones ambientales lo que posiblemente pueda terminar en la extinción de una especie (Guttman y Berg, 1998; Lopera-Barrero *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2002). Además la conservación de la variabilidad genética puede mantener en optimas condiciones el crecimiento y la reproducción efectiva de los sistemas de reproductores (Porta *et al.*, 2006). Existen estudios como los realizados por Neville *et al.* (2007), Porta *et al.* (2006) y Saura *et al.* (2006), donde se encontró una similaridad en la diversidad genética de poblaciones nativas cuando las compararon con poblaciones en cautiverio de *Oncorhynchus tshawytscha*, *Salmo salar* y *Solea senegalensis*, respectivamente.

Para iniciar cualquier cultivo de peces con miras a la conservación de la biodiversidad utilizando como medida de mitigación el repoblamiento de ríos, se recomienda conformar bancos de reproductores a partir de un lote fundador con altos niveles de variabilidad genética, mantener el mayor tamaño efectivo de la población por cada generación de cultivo, además de cruzar siempre individuos no emparentados (Allendorf y Ryman., 1987. En: Borell, 2006); adicionalmente, los peces usados en el sistema de parentales deberán estar relacionados genéticamente con los del medio natural (Santacruz, 2005; Lopera *et al.*, 2008).



Wasko *et al.*, (2004) encontraron que el empleo de apenas seis a ocho reproductores por generación y el cruzamiento entre individuos emparentados, fueron los responsables de una disminución de la variabilidad genética de los lotes de reproductores de *Brycon cephalus* del Centro Nacional de Pesquisa de Peces Tropicales (CEPTA) en relación a una población nativa del río Amazonas. Asimismo, cuando Porta *et al.* (2006) estudiaron a *Solea senegalensis* constataron una gran reducción de la variabilidad genética de los reproductores de la primera generación con respecto a dos generaciones posteriores, en relación con el número de alelos microsatélites (aproximadamente 50%); demostrando que el éxito en lotes de reproductores con fines de repoblamiento está íntimamente relacionando los procesos de selección de los individuos en el medio natural y los cruces previamente establecidos. Frost *et al.* (2006), examinando el efecto de las prácticas de cultivo en la diversidad genética de *Lates calcarifer*, encontraron que la selección por tamaño para reducir el canibalismo proporcionó una reducción de la variabilidad genética. Además hubo una alteración en la composición de las familias, inclusive con algunos machos dejando de contribuir con la progenie. En Colombia, el primer reporte de estudios de variabilidad genética de bocachicos mantenidos en cautiverio fue realizado por Santacruz (2003), quien logró demostrar que los lotes de reproductores de cuatro centros piscícolas del departamento Córdoba, presentaban una pérdida importante de la variabilidad genética.



#### 4. MARCO TEÓRICO.

##### 4.1. ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE.

##### 4.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE (*Prochilodus magdalenae*).

Esta especie se encuentra ubicada dentro del superorden Ostariophysii, pertenece al orden Characiformes y a la familia Prochilodontidae.

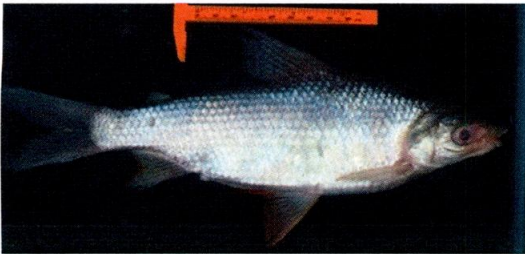


Figura 1. *Prochilodus magdalenae*

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Superclase: Gnatostomata

Clase: Actinopterygii

División: Teleostei

Superorden: Ostariophysii

Orden: Characiformes

Familia: Prochilodontidae

Género: *Prochilodus* Agassiz, 1829

Especie: *Prochilodus magdalenae* Steindachner, 1878

##### 4.1.2. MORFOLOGÍA Y ANATOMÍA DE *P. magdalenae*.

El bocachico (*Prochilodus magdalenae*) es un pez de talla mediana que alcanza a crecer hasta los 50 cm. posee cabeza roma, ojos grandes, cuerpo alargado y comprimido lateralmente. . Presenta una boca prominente, carnosa y pequeña, su espina predorsal es punzante (Mojica y Álvarez-León, 2002). Su coloración es gris iridiscente en el dorso y plateada en la sección lateral con bandas transversales oscuras.

#### **4.1.3. BIOLOGÍA BÁSICA DE *P. magdalенаe*.**

Este pez endémico de Colombia habita cuerpos de agua lénticos en la parte media y baja de los ríos. En estos cuerpos de agua se alimenta y desarrolla debido a que el aumento en caudal de los ríos (septiembre-diciembre) promueve el enriquecimiento nutritivo de estos ecosistemas, lo que genera un aumento del detritus, su principal fuente de alimento (Mojica *et al.*, 2002). Cuando el nivel de los ríos empieza su descenso, el bocachico comienza un proceso de migración hacia las partes altas de los ríos, en donde culmina su ciclo de reproducción; luego, ayudado por el incremento de las aguas en los ríos desciende para realizar el desove, permitiendo así que los alevines de esta especie puedan ingresar a cuerpos de agua lénticos donde llevarán a cabo su desarrollo (Mojica *et al.*, 2002).

#### **4.1.4. GENÉTICA DE *P. magdalенаe*.**

Sivasundar *et al* (2001), utilizando ADN mitocondrial (mtADN) de diferentes especies del género *Prochilodus*, logró entender la importancia filogenética de esta especie, ya que se le identificó una posición basal en el género (el más primitivo de todos).

Por otro lado, Silva (2001) determinó por medio de estudios citogenéticos la fórmula cromosómica de esta especie, la cual consta de un número diploide de 54 cromosomas ( $2n = 54$ ), 20 pares metacéntricos y 7 submetacéntricos (20M:7SM).

Con respecto a la estructura genética de sus poblaciones naturales, Santacruz (2003) utilizó *loci* de microsatélites para evaluar las poblaciones silvestres de bocachico del río Sinú y aquellas cultivadas que se usan en los repoblamientos. Los marcadores que utilizó fueron útiles para evaluar el impacto genético de los repoblamientos en esta población, y suministró recomendaciones técnicas para redirigirlos y minimizar el riesgo de disminución de la variabilidad genética. Sin embargo, este estudio se adelantó con *loci* de microsatélites no específicos (*Piaractus mesopotamicus*), En los ríos Cauca y San Jorge, López *et al.* (2004) y



Cuartas y Burbano (2009) respectivamente, realizaron estudios genéticos de las poblaciones presentes en estos ecosistemas.

A pesar de no contar con loci microsatélites específicos para bocachico, recientes estudios han suministrado 55 loci caracterizados para otras especies del género: *P. argenteus*, *P. costatus* y *P. lineatus* (Barbosa *et al.*, 2006; 2008; Carvalho-Costa *et al.*, 2006; Yazbeck y Kalapothakis, 2007; Rueda *et al.*, 2011), de los cuales ocho propuestos por Rueda *et al.* (2011) para *P. lineatus* fueron utilizados en este estudio.

#### **4.2. MARCADORES MICROSATÉLITES**

Los organismos eucariotas poseen gran cantidad de ADN repetitivo, clasificado según su complejidad y número de nucleótidos. Una de estas clasificaciones es la de los microsatélites (Povh., 2008). Estos consisten en simples secuencias repetitivas de ADN (SSRs) cuyo ámbito de tamaño está entre 1 y 6 pares de bases (pb) (Tautz, 1989). Su alto contenido polimórfico los convierte en herramientas importantes en el estudio de individuos dentro y entre poblaciones, el mapeo genético y físico de genomas y para la identificación y discriminación de genotipos (Povh, 2008). Los microsatélites son considerados hoy en día como los marcadores más eficientes para revelar altos niveles de variación alélica lo que permite detectar diferencias entre poblaciones estrechamente relacionadas (Povh, 2008). Esta es la razón por la cual son los marcadores más usados para el manejo de lotes de reproductores en la acuicultura (Alam e Islam, 2005; Povh, 2008).

#### **4.3. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOTES DE PECES MANTENIDOS EN CAUTIVERIO.**

A la variabilidad genética y a la endogamia de los lotes de reproductores de las estaciones piscícolas, se les debe hacer un monitoreo permanente para conservar la capacidad adaptativa de la especie (Saura *et al.*, 2006). Sobre todo cuando las progenies de estos organismos van a ser introducidas al medio natural con fines de mejorar la condición natural de las poblaciones. Shikano y Taneguchi (2002) encontraron una correlación negativa entre el crecimiento y la endogamia, en lotes





de *Sander vitreus*, lo que indicaría que los organismos con alta endogamia producto de cruces inapropiados introducidos al medio natural, tendrían pocas oportunidades de sobrevivir.

La diversidad genética puede evaluarse teniendo en cuenta diversos índices entre los cuales encontramos: a) el número de alelos, b) la frecuencia de alelos c) y genotipos; y d) la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ). Quizás la manera más apropiada para calcular la diversidad genética, es por medio del conteo de la cantidad de organismos heterocigotos, ya que un organismo de esta condición cuenta con alelos diferentes, lo que significa variación genética. No obstante, se sugiere no conformarse con la heterocigosidad observada, sino realizar el cálculo de la heterocigosidad esperada la cual es una medida más confiable (Santacruz, 2003).

## 5. JUSTIFICACIÓN

Los repoblamientos de bocachico (*Prochilodus magdalenae*), son una herramienta creada para mejorar las poblaciones nativas de los impactos provocados por actividades tales como: la sobrepesca, la contaminación de los ríos, la construcción de hidroeléctricas y la introducción de especies invasoras. Sin embargo, esta herramienta puede acelerar el proceso de extinción de esta especie, dado que por introducir animales con poca variabilidad genética se puede causar una pérdida rápida de información genética de la misma. Por eso, se hace imperativo conocer las características genéticas del bocachico en su condición natural y las de los parentales usados en la producción de semillas de los programas de repoblamientos, porque se consideran como un componente importante para garantizar el éxito de su conservación y manejo (Machordom *et al.*, 1999).

En el caso de los reproductores de los centros piscícolas encargados de los repoblamientos, es importante que cuenten con buena información genética y que no difiera a la de las poblaciones silvestres. De no ser así, la información recibida por estas últimas puede generar una pérdida de genes, lo que conllevaría a la población natural a una disminución de la capacidad de adaptación a las condiciones ambientales. Según Wang *et al.* (2002) y Shikano y Taniguchi (2002ab), el monitoreo de la variabilidad genética en los lotes de reproductores ayuda a tener control sobre el nivel de endogamia, lo cual es importante para mantener la capacidad de supervivencia de la población.

## 6. OBJETIVOS.

### 6.1. Objetivo general

Evaluar la estructura genética de lotes de reproductores de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) en dos centros piscícolas, utilizados en los programas de repoblamiento del río Magdalena.

### 6.2. Objetivos específicos.

Evaluar la variabilidad genética del sistema de reproductores de *P. magdalenae* en cada uno de los centros piscícolas.

Determinar la diferencia genética entre los dos sistemas de reproductores de *P. magdalenae*

Proponer medidas técnicas que permitan el mejoramiento genético de los sistemas con menor variabilidad.



## **7. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN.**

Para el estudio se seleccionaron dos centros piscícolas del norte de Colombia: Estación Piscícola de Repelón, Centro Acuícola y Agroindustrial de Gaira. La primera está bajo la coordinación de la Regional del INCODER y se encuentra ubicada en el municipio de Repelón, departamento del Atlántico. Este centro posee 101 estanques que varían desde 18 m<sup>2</sup> hasta 5000 m<sup>2</sup>. La segunda es coordinada por el SENA Regional Magdalena y está ubicada en la ciudad de Santa Marta. El centro cuenta con más de 25 estanques, donde mantiene reproductores de bocachico.

### **7.1. FASE DE CAMPO**

Se seleccionaron al azar 60 peces del actual sistema de reproductores de los dos centros piscícolas, a los cuales se les tomaron muestras de aleta caudal que fueron fijadas en alcohol absoluto.

### **7.2. FASE DE LABORATORIO.**

#### **7.2.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de la aleta caudal, siguiendo el siguiente protocolo.

1. Se cortó un trozo (0.1-0.3 cm<sup>2</sup>) de la muestra de aleta fijada y se colocó en un tubo de 2 ml con 600 µl solución de lisis y 1 µl de proteinasa K.
2. Luego, se homogenizó la mezcla, para incubar a 65 °C durante 1 hora con agitación esporádica.
3. Seguido, se agitaron las muestras en vortex durante 5 minutos.



4. Posteriormente se agregaron 550  $\mu$ l de NaCl [5M] a cada tubo y se agitaron sutilmente en el vortex durante 10 segundos.
5. Después, se centrifugaron durante 15 min a 15000 rpm.
6. Seguido del paso anterior, a cada muestra se le agregaron 500  $\mu$ l de alcohol isopropanol (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) y luego, se incubaron a la misma temperatura durante una hora.
7. Se volvieron a centrifugar durante 15 minutos a 14000 rpm. Seguido, se retiró el isopropanol con cuidado de no resuspender el precipitado que es ADN. Luego, se lavó el pellet con 600  $\mu$ l de etanol [70%].
8. El etanol se retiró cuidadosamente para no perder el pellet (ADN).
9. Finalmente cada muestra se dejó secar durante una hora y luego se agregaron 50  $\mu$ l de Buffer TE para congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La calidad del ADN extraído fue verificado por medio de geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados en un fotodocumentador digital UVP (BioDoc-It Imaging System). Por medio de espectrofotometría de UV se cuantificaron las concentraciones de ADN que oscilaron entre 50 y 200 ng/ $\mu$ l.

### **7.2.2. 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* previamente a este estudio. Se seleccionaron los más polimórficos: PL3, PL23, PL26, PL28, PL34, PL64 y PL119 (Rueda *et al.*, 2011). Para amplificar los ocho loci microsatélites se siguieron los protocolos y condiciones de amplificación propuestos por Rueda *et al.*, 2011. Las reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se llevaron a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ l, quedando las concentraciones finales de la siguiente manera: el buffer de reacción en 1X; el  $\text{MgCl}_2$  en 2 mM; los dNTPs en 0.2 mM; los primers en 0.2  $\mu$ M; y la

taq polimerasa en 0.25 U. Para todos los loci se utilizó una temperatura inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos; luego se aplicaron 30 ciclos con las siguientes condiciones: una temperatura de desnaturalización de 95°C por 30 s; la de anillaje para cada loci se presenta en la tabla 1, la cual se prolongó por 30 s; la de extensión fue de 72°C por 30 s; y al final de los ciclos se aplicó una temperatura de extensión de 72°C por 10 minutos. Los amplicones fueron verificados en geles de agarosa al 2%.

Los productos de PCR fueron corridos por electroforesis vertical en geles denaturantes de poliacrilamida al 7% (Acilamida/Bisacrilamida 19:1 BioAmerica®; urea 7M BioAmerica®; TBE 10x; Persulfato de amonio (APS) 8% USB®0029), los cuales fueron teñidos con Bromuro de Etidio durante media hora.

La electroforesis vertical se corrió a 100 voltios durante 10 minutos y 80 voltios durante 6 horas; se utilizó un marcador de peso molecular de 25 pb (Hyperladder™ V, rango 25-500 pbBioline®), con el fin de estimar el tamaño de cada uno de los alelos. La asignación de los tamaños de los alelos se llevó a cabo con el programa GeneTools de Hitachi GeneticSystem®, el cual compara las bandas de los alelos con las bandas del marcador de peso molecular.

### **7.3. ANALISIS DE LA INFORMACIÓN**

#### **7.3.1. Objetivo 1**

La variabilidad genética de los lotes de reproductores de bocachico de los dos centros piscícolas, se estimó utilizando las siguientes medidas: frecuencia alélica, el número de alelos por locus ( $N_a$ ), la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ). Para este fin se utilizó el paquete computacional GENETIX v.4.05 (Belkhir, 2003). Para probar si los de reproductores de Bocachico de los centros piscícolas evaluados están o no en E-HW se realizó el test de probabilidad de Guo y Thompson (1992), incluido en el paquete estadístico de GENEPOP v.3.3, que permite rechazar o aceptar la hipótesis nula de apareamiento al azar.

Con el fin de determinar si la desviación del E-HW es producto del exceso o de la deficiencia de heterocigotos, se prueba la hipótesis alterna por medio de una prueba de puntaje U (*U-score*) (Rousset & Raymond, 1995). Genepop también incluye una prueba de equilibrio global para varios loci o varias poblaciones, mediante un test exacto de Fisher que analiza probabilidades discretas. Las tres pruebas arriba mencionadas fueron realizadas para probar el equilibrio en las 2 poblaciones en cautiverio. El valor P calculado se comparó con un nivel de significancia de 0.001.

### **7.3.2. Objetivo 2**

Para determinar la diferencia genética entre los dos sistemas de reproductores se realizó una prueba de comparación entre las muestras de los dos centros piscícolas utilizando el estadístico  $F_{st}$  de Weir y Cockerham (1984) con el programa Fstat v.2.9.3 (Goudet, 2001). Para determinar si las diferenciaciones fueron significativas, se utilizó la rutina de corrección de Bonferroni para determinar la significancia estadística del  $F_{st}$  (Goudet, 2001), incluida en el Fstat v.2.9.3. También se utilizó las frecuencias alélicas por locus para hacer la comparación descriptiva entre las dos estaciones.

### **7.3.3. Objetivo 3**

Con base a la información analizada de los dos objetivos anteriores se suministrarán una serie de recomendaciones que permitan mejorar las condiciones genéticas de los sistemas de reproductores de las dos estaciones piscícolas estudiadas. Por ejemplo, para incrementar el nivel de variabilidad genética de los lotes de reproductores (sí llegase a ser necesario); se podría sugerir la incorporación de nuevos animales provenientes del medio natural, los cuales introducirían información genética que podrían haber perdido los animales antiguos. También se podría sugerir, el descarte total de algún lote que no esté aportando información genética valiosa a las progenies. Estas posibles recomendaciones



serán socializadas y discutidas con los administradores de las estaciones piscícolas.

## 8. LIMITACIONES

La amplificación de los microsátélites a partir de muestras de ADN obtenidas de la aleta caudal de los peces, representó un problema debido al tiempo que llevó estandarizar las condiciones de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Esta demora no sólo causó retrasos en la ejecución de la investigación, sino que además generó un gasto significativo de reactivos. El Microsatélite PI-14, se sacó del análisis debido a su difícil amplificación.

La genotipificación de los alelos a partir de las fotos de geles de poliacrilamida, presentó ciertas diferencias en los tamaños de los alelos con respecto a la genotipificación que realizó la autora de los microsátélites, esto pudo deberse a que el método utilizado por la autora es mucho más preciso que el utilizado durante esta investigación. A pesar de esto. El método implementado no afectó los estimativos realizados en este trabajo.





## 9. RESULTADOS

### 9.1. POLIMORFISMO DE LOS MICROSATÉLITES

Se encontró un gran polimorfismo en todos los loci utilizados, siendo PI-3 el más polimórfico de todos con 35 alelos. La media de alelos para todos los loci fue de  $20.3 \pm 9.1$ .

Las dos localidades (SENA y Repelón) presentaron casi el mismo número de alelos por locus (15.9 alelos/locus); sin embargo el número de alelos amplificado para algunos loci varió con respecto a la estación: PI-3, PI-23, PI-64 y PI-119. Sin embargo, en los demás loci mostraron la misma cantidad de alelos: PI-26, PI-28 y PI-34 (Tabla 2.0.)

Con respecto a la variabilidad genética global, la heterocigosidad observada presentó valores que oscilaron entre 0.025 para PI-23 y 0.213 para PI-3, con un promedio de  $0.114 \pm 0.073$ . En el caso de la heterocigosidad esperada, el rango de los valores obtenidos fue de 0.867 para PI-23 y 0.936 para PI-3 (Tabla 1.0).

**Tabla. 1.** Diversidad genética por locus teniendo en cuenta el sistema de reproductores de Bocachico *P. magdalenae* en las dos estaciones estudiadas. Tm es la temperatura anillaje; N representa el tamaño de la muestra; Na es el número de alelos; He es la heterocigosidad esperada y Ho es la heterocigosidad observada.

<b>Locus</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>
<b>PL3</b>	50	113	35	0.936	0.213
<b>PL23</b>	59	122	10	0.867	0.025
<b>PL26</b>	59	116	16	0.924	0.025
<b>PL28</b>	59	115	18	0.892	0.132
<b>PL34</b>	56	115	11	0.901	0.081
<b>PL64</b>	62	113	26	0.927	0.140
<b>PL119</b>	58	115	26	0.933	0.182
<b>Promedio</b>			<b>20.3±9.1</b>	<b>0.911±1.708</b>	<b>0.114±0.073</b>

## **9.2. DIVERSIDAD GENÉTICA POR ESTACIÓN PISCÍCOLA**

Para la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), la estación que presentó el mayor valor fue la del SENA con  $0.129 \pm 1066$ . En esta estación, la mayor  $H_o$  se observó en el locus PI-119 con 0.300; mientras que en el locus PI-34 no se presentó ningún reproductor heterocigoto. Con relación a la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), esta estación presentó un valor de  $0.911 \pm 0.024$ ; el mayor valor se observó en PI-3 y el menor en PI-23 con 0.934 y 0.865, respectivamente (Tabla 2.0).

En cuanto a la estación de Repelón, los valores de heterocigosidades fueron  $H_o = 0.099 \pm 0.0803$  y  $H_e = 0.912 \pm 0.031$ . Sólo en un locus no se observó ningún reproductor heterocigoto. Mientras que el valor más alto de  $H_o$  se observó en el locus PI-3 con 0.226. Para el caso de la  $H_e$ , el valor más alto se observó en PI-119 con 0.938 y el más bajo en PI-23 con 0.869 (Tabla 2.0).

## **9.3. ENDOGAMIA**

El índice de endogamia indicó que todos los locus presentaron un alto valor de consanguinidad, con valores por encima de 0.860 y con un promedio de  $0.877 \pm 0.069$ . La mayor consanguinidad se observó con el PI-3 y la menor con 0.895 y 0.861, respectivamente. La endogamia global ( $F_{IT}$ ) fue de 0.871 (IC= 0.818-0.921) y por estación piscícola ( $F_{IS}$ ) fue de 0.887 (0.855-0.915) para la de Repelón y 0.853 (0.819 - 0.882) para la del SENA.

## **9.4. EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG (E-HW)**

Utilizando la prueba de Guo y Thompson (1992), se pudo constatar, que las dos poblaciones (SENA y Repelón) están fuera del equilibrio Hardy-Weinberg ( $P < 0.0001$ ). A su vez; el test U, propuesto por (Rousset y Raymond, 1995), demostró que la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg es el resultado de un déficit de heterocigotos ( $p < 0.0001$ ).

**Tabla 2.** Diversidad genética del sistema de reproductores de Bocachico *P. magdalenae* por estación piscícola; *Na* es el numero de alelos, los valores entre paréntesis son el promedio de alelos por locus con su desviación estándar; *He* es la heterocigosidad esperada; *Ho* es la heterocigosidad observada. Los valores entre paréntesis de estas dos variables corresponden a las desviaciones estándar.

<b>Locus</b>		<b>Repelón</b>	<b>SENA</b>	<b>Global</b>
<b>PI3</b>	<b>N</b>	59	54	113
	<b>Na</b>	26	25	35(25.5 ± 0.707)
	<b>He</b>	0.934	0.934	0.936 ± 0.004
	<b>Ho</b>	0.226	0.200	0.213 ± 0.018
<b>PI23</b>	<b>N</b>	62	60	122
	<b>Na</b>	8	10	10(9 ± 1.414)
	<b>He</b>	0.869	0.865	0.867 ± 0.003
	<b>Ho</b>	0.016	0.033	0.025 ± 0.012
<b>PI26</b>	<b>N</b>	58	59	116
	<b>Na</b>	16	16	16(16± 0.00)
	<b>He</b>	0.920	0.928	0.924 ± 0.006
	<b>Ho</b>	0.000	0.050	0.025 ± 0.035
<b>PI28</b>	<b>N</b>	56	59	115
	<b>Na</b>	14	14	18(14 ± 0.00)
	<b>He</b>	0.873	0.911	0.892 ± 0.027
	<b>Ho</b>	0.097	0.167	0.132 ± 0.049
<b>PI34</b>	<b>N</b>	60	55	115
	<b>Na</b>	11	11	11(11 ± 0.00)
	<b>He</b>	0.904	0.898	0.900 ± 0.004
	<b>Ho</b>	0.161	0.000	0.080 ± 0.114
<b>PI64</b>	<b>N</b>	60	53	113
	<b>Na</b>	19	22	26(20.5 ± 2.121)
	<b>He</b>	0.937	0.917	0.927 ± 0.014
	<b>Ho</b>	0.129	0.150	0.139 ± 0.015
<b>PI119</b>	<b>N</b>	59	55	115
	<b>Na</b>	17	18	26 (15 ± 4.243)
	<b>He</b>	0.938	0.927	0.933 ± 0.008
	<b>Ho</b>	0.065	0.300	0.182 ± 0.167



**Tabla 3.** Valores totales del índice de endogamia para cada locus en el análisis genético de los dos sistemas de reproductores de Bocachico *P. magdalenae* en las estaciones piscícolas de Repelón y el SENA. D.E, corresponde a la desviación estándar de los valores, valores hallados por medio de la técnica de Jackknife.

<b>Locus</b>	<b>Fis</b>
<b><i>pl3</i></b>	0.895
<b><i>pl23</i></b>	0.862
<b><i>pl26</i></b>	0.861
<b><i>pl28</i></b>	0.881
<b><i>pl34</i></b>	0.872
<b><i>pl64</i></b>	0.882
<b><i>pl119</i></b>	0.889
<b>Promedio</b>	0.877
<b>D.E</b>	0.029

## 9.5. DIFERENCIA GENÉTICA

En general, el análisis de comparación de las distribuciones de las frecuencias alélicas por locus entre las dos estaciones piscícolas no permitió observar una diferenciación definida entre ambas (Figura 2), ya que la mayoría de los alelos presentaron similares frecuencias en las dos estaciones. Sin embargo, en algunos locus se observó una pequeña diferencia debido a la presencia de alelos únicos en cada estación. Por ejemplo, en el caso del locus PI-3 se amplificaron 26 alelos en la estación de Repelón, de los cuales 10 no estuvieron en la del SENA. También se observó que de los 25 alelos amplificados en el SENA, 9 no estuvieron en Repelón (Figura 2).

Utilizando el test de comparación a partir del estadístico F, se observó que entre las dos estaciones hay diferenciación genética moderada, dado que el valor de  $F_{ST}(\theta)$  fue de 0.0104 (IC=0.00003-0.0237). Sin embargo, la diferenciación no fue significativa ( $p > 0.05$ ).



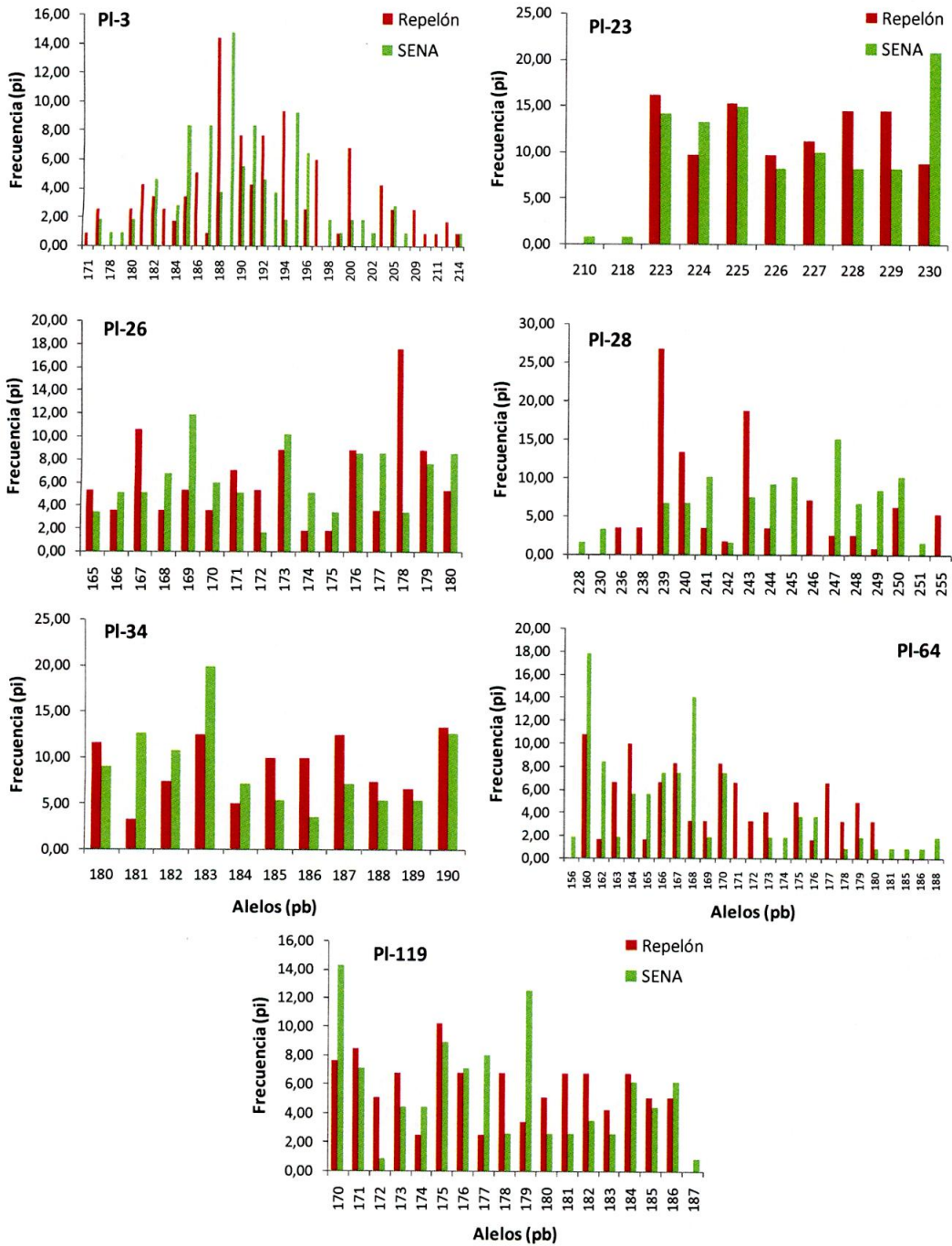


Figura 2. Frecuencia alélica de cada locus en el sistema de reproductores de Bocachico *P. magdalenae* de las estaciones piscícolas de Repelón y el SENA.

## 10. DISCUSIÓN

Cuando se trabaja con marcadores microsatélites como herramienta para cuantificar la variabilidad genética de una población, se debe tener en cuenta la variedad de alelos que se pueden formar para cada uno de los loci (Hartl y Clark, 1997). Esta investigación mostró que el rango de alelos encontrado para los 7 loci varió entre 10 y 35, con un promedio por encima de 15 alelos por locus. Estos valores difieren de los valores observados en *P. magdalenae* publicados por Rueda *et al.* (2011) y puede deberse al pequeño número de individuos utilizados en su estudio.

Los valores de polimorfismo observados en este estudio fueron superiores a los documentados en otros estudios. Por ejemplo, Santacruz (2003), quien estudió las estaciones piscícolas que fomentan el repoblamiento de *P. magdalenae* en el río Sinú, publicó un polimorfismo por debajo a 12 alelos/locus. Con relación a estudios de poblaciones silvestres de otras especies del género, se ha documentado un promedio de 12.4 alelos por locus en la población de *P. argenteus* (Hatanaka *et al.*, 2006) y de 16.5 alelos por locus en la de *P. costatus* en Brasil (Braga, 2011).

Con respecto a la variación genética, fue evidente que las dos estaciones piscícolas presentaron un potencial genético debido a la alta riqueza alélica y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ). Pero ese potencial contrastó con el estado actual del sistema de reproductores de bocachico en estas estaciones: los peces son endogámicos ( $F_{is}$ ) y tienen una heterocigosidad observada ( $H_o$ ) muy baja. Esta condición genética también se observó en cuatro sistemas de reproductores de bocachico utilizados para repoblar el río Sinú. Santacruz (2003) observó una  $H_o$  menor de 0.291 y un  $F_{is}$  mayor de 0.680.

Según los análisis, la condición genética de los reproductores de bocachico en las dos estaciones está asociada a un déficit de heterocigotos que puede estar explicado por tres razones: (1) al efecto fundador, un fenómeno común en las estaciones piscícolas cuando establecen sistemas de reproductores a partir de un número muy reducido de peces que son homogéneos genéticamente (Ambali *et al.*,



1999). (2) equivocadas prácticas de selección artificial que se aplican cuando con este mismo sistema de reproductores se hace fomento, dado que en la búsqueda de mejorar el desempeño en crecimiento y biomasa de los cultivos se seleccionan peces muy emparentados (Ferguson y Danzmann, 1998; Povh *et al.*, 2008). (3) el origen de los peces para establecer el sistema de reproductores puede ser el mismo.

Con respecto al primer punto, los administradores de las dos estaciones manifiestan que el número de reproductores es mayor de 1500 peces y es probable que esto no influya en los resultados, debido a que el muestreo se hizo al azar. Para el segundo punto, es probable que la selección artificial se esté desarrollando en ambas estaciones para seleccionar peces por su tamaño, estado de madurez y/o características similares, que luego son cruzados para obtener nuevos reproductores. Se sabe que este mal manejo reproductivo puede ocasionar una pérdida significativa de variabilidad genética en tan sólo una generación (Moreira, 2003; Porta *et al.*, 2006; Povh *et al.*, 2006). En relación al tercer punto, los administradores manifiestan que por lo general se contrata al mismo personal para comprarles los reproductores que vienen del medio natural y siempre de los mismos sitios naturales.

A lo anterior se le debería considerar un posible efecto adicional que también puede estar afectando las condiciones genéticas de los reproductores. Los peces capturados pueden estar representando la condición genética actual de la población natural de bocachico al momento de ser capturados en el medio. Sin duda, la sobreexplotación pesquera que viene desde hace más de tres décadas (Mojica *et al.*, 2002) y la pérdida y degradación de su hábitat (Atencio, 2000; Marrugo-Negrete *et al.*, 2008), pueden estar causando una reducción en la variabilidad genética de la población silvestre. Esta tesis estuvo enmarcada en un proyecto que simultáneamente está estudiando las poblaciones silvestre de bocachico y los resultados preliminares son muy similares a los observados en este estudio.



La situación anterior es preocupante porque dado al estado genético de los reproductores de las dos estaciones piscícolas estudiadas, los programas de repoblamiento de bocachico se están desarrollando sin control y criterio científico. Lo crítico es que la pobre información genética de los reproductores se está introduciendo a la población natural a través de los repetidos repoblamientos y urge la implementación de la herramienta molecular para mejorar esta estrategia de conservación. Esta misma situación se planteó en los programas de repoblamiento de la población de bocachico del río Sinú, donde se propuso una intervención de las estaciones que participaban en estos programas; con el estudio se sugirieron sistemas de cruces para aprovechar el potencial genético de los reproductores y mejorar la calidad genética de las progenies (Santacruz, 2003). Precisamente los resultados de esta tesis servirán para iniciar este proceso en el marco del proyecto de investigación “ESTABLECIMIENTO DE SISTEMAS DE PARENTALES CON CRITERIOS GENÉTICOS PARA PRODUCIR SEMILLAS DE BOCACHICO *Prochilodus magdalenae* EN EL NORTE DE COLOMBIA” (Contrato: 1117-489-25459; COLCIENCIAS-UNIMAGDALENA).



## 11. RECOMENDACIONES

Para mitigar lo anterior, aquí se recomienda como primera medida que los peces utilizados en el sistema de reproductores estén relacionados genéticamente con los del medio natural para evitar la traslocación (Santacruz, 2005; Ward, 2006; Lipcius *et al*, 2008; Lopera-Barrero *et al*, 2008; Grandjean *et al*, 2009) y por lo menos, produzcan progenies con niveles de variabilidad genética similar o superior a los peces del medio natural (De Innocentiis *et al*, 2008; Lopera-Barrero *et al*, 2008; Povh *et al*, 2008; Grandjean *et al*, 2009).

Esos reproductores deberán estar apartados de cualquier programa de selección o mejoramiento genético para evitar la disminución de su variabilidad genética (Woodworth *et al.*, 2002; Dunham, 2004).

Deberán adelantarse estudios de caracterización genética de las poblaciones silvestres para identificar los sitios donde deberán capturarse los peces que conformarán a futuro los nuevos sistemas de reproductores.

Debido a la alta riqueza alélica de los dos sistemas de reproductores estudiados y al potencial genético observado en la heterocigosidad esperada, se recomienda no eliminar los reproductores actuales. Se propone ampliar el estudio genético a todos los peces del sistema para que a través de la simulación se identifiquen los peces que, de acuerdo a su condición genética, merecen quedarse en el sistema.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Agostinho, A. A., S. M. Thomaz and L.C. Gomes, 2005. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conservation. Biol.*, 19 (3): 646-652.
2. Alam, M.S. y M.S. Islam, 2005. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture* 246:151-160.
3. Barbosa, A.C.D.R., T.C. Corrêa, F. Galzerani, P.M. Galetti and T. Hatanaka, 2006. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Molecular Ecology Notes* 6(3): 936-938.
4. 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.
5. Belkhir, K., 2003. (GENETIX, v. 4.03). Universite de Montpellier II CNRS UPR 9060: Laboratoire Genome, Populations, Interactions. Francia
6. Braga, A., 2011. Estructura genética populacional de *Prochilodus costatus* Valenciennes 1850 (Characiforme, prochilodontidae) no alto São Francisco. (tesis de Maestría).
7. CCI, 2007. Pesca y acuicultura: Colombia 2006. Corporación Colombia Internacional-INCODER, Bogotá. 56 p.
8. De Innocentiis, S., A. Longobardi y G. Marino, 2008. Molecular tools in a marine restocking program for the endangered dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Reviews in Fisheries Science* 16(1-3): 269-277.
9. Dunham, R.A., 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology, Genetic Approaches*. CABI Publishing. Cambridge, USA. 372 p.

10. Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). (Updated from Goudet, J. (1995). FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
11. Guo S.W. & E.A, Thompson, 1992. Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
12. Hartl, D.L. & Clark A. 1997. Principles of population genetics. 3 ed. Sinauer Associates, Sunderland, EE.UU. 542 p
13. Hickley, P. 1994. Stoking and introduction of fish: a synthesis. En: Cowx, I. 1994. Rehabilitation of freshwater fisheries. Oxford. Fishing new books. P 247-254.
14. Lipcius, R.N., D.B. Eggleston, S.J. Schreiber, R.D. Seitz, J. Shen, M. Sisson, W.T. Stockhausen y H.V. Wang, 2008. Importance of metapopulation connectivity to restocking and restoration of marine species. *Reviews in Fisheries Science* 16(1-3): 101-110.
15. Lopera-Barrero, N.M., R.P. Ribeiro, R.N. Sirol, J.A. Povh, P.C. Gomes, L.Vargas y D.P. Streit Jr. 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers. *Journal Animal Science* 84:170-170.
16. Lopera B., L.M., R. Pereira R., J.A. Povh, P.C. Gomes, L. Vargas y S. Nogueira de Oliveira, 2008. 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.
17. 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, Colombia.
18. Moreira, H.L.M., S. Zimmermann, R.P. Ribeiro, R.G. Bastos, L.D. Vargas y J.A. Povh. 2003. The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic





monitoring in breeding programs of tilapia. Page 460. In: World Aquaculture, Salvador, Brasil.

19. 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.

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

21. 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.

22. 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.

23. Rousset, F. y M. Raymond, 1995. Testing Heterozygote Excess and Deficiency. *Genetics*.140: 1413-1419.

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

25. Santacruz B., D.H., 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.

26. Shikano, T. y N. Taniguchi. 2002a. Heterosis for neonatal survival in the guppy. *Journal of Fish Biology* 60:715-725.



27. Shikano, T. y N. Taniguchi. 2002b. Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Poecilia reticulata*) as a fish model. *Aquaculture* 204:271-281.
28. Sivasundar, A; E, Bermingham and 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.
29. Wang, S., J.J. Hard y F. Utter. 2002. Salmonid inbreeding: a review. *Reviews in Fisheries Biology and Fisheries* 11:301-319.
30. Wasko, A, Martins, C., Oliveira, C., Senhorini, JA. & Foresti, F. 2004. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Bryconcephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *J. Appl. Ichthyol.*, vol. 20, no. 1, p. 48-52.
31. Ward, R., 2006. The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research* 80: 9-18.
32. Woodworth, L., M.E. Montgomery, D.A. Briscoe y R. Frankham, 2002. Rapid genetic deterioration in captive populations: Causes and conservation implications. *Conservation Genetics* 3: 277-288.
33. Wright, S, 1969. *Evolution and the genetics of populations. Volúmen II: The theory of gene frequencies.* The University of Chicago Press, Chicago.