

Estructura genética de dos sistemas de reproductores de Bocachico *Prochilodus magdalenae* utilizados para repoblamiento en el norte de Colombia

Genetic structure of two breeding systems of Bocachico *Prochilodus magdalenae* used for repopulation in northern Colombia

Daniel Castañeda Valbuena¹
Juan Carlos Narváez Barandica²
Ana Carolina Torregroza Espinosa³

Resumen

Debido a las 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 y en sus capturas. Para evitar la extinción de esta especie, las autoridades ambientales de Colombia están implementando diversas estrategias, dentro de las que se destacan los programas de repoblamiento. Para esto, emplean semilla de bocachico obtenida de manera artificial en las estaciones piscícolas. Sin embargo, el desarrollo de estos programas, viene realizándose de manera arbitraria y sin ningún soporte científico que los respalde. Estos repoblamientos estarían agilizando la extinción de esta especie, puesto que las larvas utilizadas podrían estar presentando problemas de variabilidad genética, principalmente por los malos manejos de los reproductores en los centros piscícolas. El objetivo de esta investigación consistió en analizar la diversidad genética de lotes de bocachico utilizados en programas de repoblamiento, mediante marcadores moleculares

1 Docente Universidad de la Costa. Facultad de Ciencias Ambientales, Colombia

2 Docente Universidad del Magdalena. Laboratorio de Biología Molecular, Colombia

3 Docente Universidad de la Costa. Facultad de Ciencias Ambientales, Colombia

microsatélites. Se utilizaron 60 reproductores provenientes de dos estaciones piscícolas ubicadas en los departamentos de Magdalena (SENA) y Atlántico (Repelón). Se utilizaron siete microsatélites polimórficos, que suministraban entre 10 y 35 alelos por locus. La diversidad genética encontrada para los lotes estudiados fue (SENA $H_o < 0.1$; Repelón $H_o < 0.13$), mientras que el grado de endogamia mostró valores altos ($F_{is} > 0.8$). Es probable que estos resultados encontrados sean producto de un manejo inadecuado de los reproductores. 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, de tal forma que permita garantizar la conservación de la especie.

Palabras clave: Bocachico, microsatélites polimórficos, diversidad genética, grado de endogamia.

Abstract

Due to the environmental modifications that the Magdalena River has suffered and to overfishing, the populations of bocachico (*Prochilodus magdalenae*) have shown a considerable decrease in their size and in their catches. To prevent the extinction of this species, the environmental authorities of Colombia are implementing various strategies, among which the repopulation programs stand out. For this, they use bocachico seed obtained artificially in the fish stations. However, the development of these programs has been carried out arbitrarily and without any scientific support to support them. These repopulations would be speeding up the extinction of this species, since the larvae used could be presenting problems of genetic variability, mainly due to the mishandling of the reproducers in the fish farms. The objective of this research was to analyze the genetic diversity of lots of bocachico used in repopulation programs, using microsatellite molecular markers. 60 breeders from two fish stations located in the departments of Magdalena (SENA) and Atlántico (Repelón) were used. Seven polymorphic microsatellites were used, providing between 10 and 35 alleles per locus. The genetic diversity found for the batches studied was (SENA $H_o < 0.1$, Repelón $H_o < 0.13$), while the degree of inbreeding showed high values ($F_{is} > 0.8$). It is likely that these results are the product of improper handling of the broodstock. The need to introduce genetic criteria to improve the genetic conditions of bocachico breeders used for repopulation

in Colombia is discussed, in order to guarantee the conservation of the species.

Keywords: Bocachico, polymorphic microsatellites, genetic diversity, degree of inbreeding.

Introducción

La disponibilidad del recurso bocachico (*Prochilodus magdalenae*) ha disminuido en la 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 vulnerable a la extinción [1]. Esto se demuestra con la reducción de las capturas realizadas entre el mes de enero de 2007 y el mismo mes de 2011, las cuales descendieron cerca de un 80% [2]. En Colombia, como en muchos países, las autoridades ambientales intentan mitigar el impacto producido por este tipo de perturbaciones. Para tal fin 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. Los repoblamientos son una de las estrategias más usadas para la rehabilitación pesquera [3], [4], aunque involucran riesgos relativos en la eficiencia del programa en cuanto a sus resultados en la preservación del pool genético [5]–[7]. Estas 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 de las poblaciones naturales. Debido a esto, es de mucha importancia la correcta selección del grupo de reproductores de bocachico que serán usados para propósitos de conservación y repoblamiento. El riesgo de usar animales con poca variabilidad genética para la conformación de un lote de reproductores con fines de repoblamiento, puede introducir información genética que no necesita la población receptora y esto empeoraría la condición natural de la población [5], [8], [9], llevándola a que se aceleren los procesos de extinción.

A pesar de lo anterior, los programas de repoblamiento que se realizan en Colombia, son de manera arbitraria y sin fundamentos ecológicos y genéticos que respalden la producción de semilla, lo que genera una reducción en la variabilidad genética de los reproductores y de sus progenies

[5], [10]. Los principales motivos de la pérdida de la variabilidad genética de lotes de parentales en cautiverio se atribuyen a: la utilización de pocos animales, el cruzamiento entre reproductores emparentados genéticamente (endogamia) [8], [9], [11], [12]; y la selección casual de los peces para la reproducción [13].

Este tipo de selección puede generar una gran pérdida en la variabilidad genética, como fue demostrado en lotes de reproductores de *Oreochromis niloticus* usados en programas de repoblamiento en Brasil [14]. Lo anterior, es similar a lo obtenido por [5], quienes comprobaron que la selección realizada por los centros piscícolas, para las reproducciones de *Brycon cephalus*, fueron responsables de una disminución de la variabilidad genética de los lotes de reproductores. Por su parte, [15] para bocachico (*Prochilodus magdalenae*) determinó que las estaciones piscícolas que proveen semilla al programa de repoblamiento en el río Sinú (Colombia) presentan baja variabilidad genética, esto debido principalmente a que los centros piscícolas encargados de producir la semilla utilizada para repoblar las cuencas hídricas, realizan la selección de los animales por sus características físicas (tamaño, coloración, etc.), o por su estado de madurez gonadal. En este sentido, el objetivo de esta investigación consistió en evaluar la estructura genética de lotes de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) en dos centros piscícolas, utilizados en los programas de repoblamiento del río Magdalena y algunos afluentes.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó en dos centros piscícolas del norte de Colombia: Estación Piscícola de Repelón (Atlántico) y el Centro Acuícola y Agroindustrial de Gaira (Magdalena).

Se seleccionaron al azar 60 peces del actual sistema de reproductores de cada uno de los centros piscícolas, a los cuales se les tomaron muestras de aleta caudal que fueron fijadas en alcohol absoluto, para ser trasladadas al laboratorio de la Biología Molecular de la Universidad del Magdalena.

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de la aleta caudal, siguiendo el protocolo propuesto por [9], con algunas modificaciones, como se registra a continuación:

Se cortó un trozo (0.1-0.3 cm²) 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, luego, se homogenizó la mezcla, para incubar a 65 °C durante 1 hora con agitación esporádica. Seguido, se agitaron las muestras en vortex durante 5 minutos, se agregaron 550 µl de NaCl [5M] a cada tubo y se agitaron sutilmente en el vortex durante 10 segundos. Después, se centrifugaron durante 15 min a 15000 rpm y a cada muestra se le agregaron 500 µl de alcohol isopropanol (a -20°C), se incubaron a la misma temperatura durante una hora. Posteriormente se centrifugaron durante 15 minutos a 14000 rpm. Se retiró el isopropanol con cuidado para no resuspender el pellet. Luego, se lavó el pellet con 600 µl de etanol [70%]. El etanol se retiró cuidadosamente, quedando en el tubo el pellet (ADN). Finalmente, cada muestra se dejó secar durante una hora, luego se agregaron 50 µl de Buffer TE y se conservaron a -20°C.

Se amplificaron 8 loci microsatélites específicos de *Prochilodus lineatus* propuestos por [16], cuya amplificación cruzada fue probada exitosamente en *Prochilodus magdalenae* previamente a este estudio. Se seleccionaron los más polimórficos: PL3, PL14, PL23, PL26, PL28, PL34, PL64 y PL119. Para amplificar los 8 loci microsatélites se siguieron los protocolos y condiciones de amplificación propuestos por [16]. Las reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl, quedando las concentraciones finales de la siguiente manera: el buffer de reacción en 1X; el MgCl₂ en 2 mM; los dNTPs en 0.2 mM; los primeros en 0.2 µM; 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, 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%.

Tabla 1

Diversidad genética por locus teniendo en cuenta el sistema de reproductores de bocachico P. magdalenae de las dos estaciones piscícolas.

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

Fuente: Los autores.

Nota: 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.

Los productos de PCR fueron corridos por electroforesis vertical en geles denaturantes de poliacrilamida al 7% (Acrilamida/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 (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®.

La variabilidad genética de los lotes de reproductores de bocachico, se estimó utilizando las siguientes medidas: frecuencia alélica, el número de alelos por locus (Na), la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He). Para este fin se utilizó el paquete computacional GENETIX v.4.05. Para probar el equilibrio en las 2 poblaciones en cautiverio, se realizaron las siguientes pruebas: el test de probabilidad de [17], para lo cual se empleó el paquete estadístico de GENEPOP v.3.3; la desviación del E-HW producto del exceso o de la deficiencia de heterocigotos que se calculó con la prueba de puntaje U (U-score) propuesta por [18]. Los valores P calculados se compararon con un nivel de significancia de 0.001.

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 [19] con el programa Fstat v.2.9.3 [20]. Para analizar si las diferenciaciones fueron significativas, se utilizó la rutina de corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples [20] incluida en el Fstat v.2.9.3. También se utilizaron las frecuencias alélicas por locus para hacer la comparación descriptiva entre las dos estaciones.

Resultados

Polimorfismo De Los Microsatélites

Se encontró un gran polimorfismo en todos los *loci* utilizados, siendo PL3 el más polimórfico con 35 alelos. La media de alelos para todos los *loci* fue de 20.3 ± 9.1 .

Los reproductores de las dos estaciones (SENA y Repelón) presentaron un número similar de alelos por locus (15.9 alelos/locus). Sin embargo, el número de alelos amplificados para algunos *loci* varió con respecto a la estación: PL3, PL23, PL64 y PL119, mientras que en los demás *loci* mostraron la misma cantidad de alelos: PL26, PL28 y PL34 (Tabla 1)

Con respecto a la variabilidad genética global, la heterocigosidad observada presentó valores que oscilaron entre 0.025 para PL23 y 0.213 para PL3, con un promedio de 0.114 ± 0.073 . En el caso de la heterocigosidad esperada, el rango de los valores obtenidos estuvo entre 0.867 para PL23 y 0.934 para PL3 (Tabla 2).

Diversidad Genética Por Estación Piscícola

Los reproductores que presentaron la mayor heterocigosidad observada (H_o), fueron los de la estación del SENA. Teniendo la mayor H_o el locus PL119 con 0.300. Por su parte, para el locus PL34 no se presentó ningún reproductor heterocigoto. Con relación a la heterocigosidad esperada (H_e), esta estación presentó un valor de 0.911 ± 0.024 ; el mayor valor se observó en PL3 (0.934) y el menor en PL23 (0.865). Tabla 2.

Tabla 2
Diversidad genética de los sistemas de reproductores de bocachico *P. magdalenae* por estación piscícola.

Locus		Repelón	SENA	Global
Pl3	N	59	54	113
	Na	26	25	35(25.5 ± 0.707)
	He	0.934	0.934	0.936 ± 0.004
	Ho	0.226	0.200	0.213 ± 0.018
Pl23	N	62	60	122
	Na	8	10	10(9 ± 1.414)
	He	0.869	0.865	0.867 ± 0.003
	Ho	0.016	0.033	0.025 ± 0.012
Pl26	N	58	59	116
	Na	16	16	16(16 ± 0.00)
	He	0.920	0.928	0.924 ± 0.006
	Ho	0.000	0.050	0.025 ± 0.035
Pl28	N	56	59	115
	Na	14	14	18(14 ± 0.00)
	He	0.873	0.911	0.892 ± 0.027
	Ho	0.097	0.167	0.132 ± 0.049
Pl34	N	60	55	115
	Na	11	11	11(11 ± 0.00)
	He	0.904	0.898	0.900 ± 0.004
	Ho	0.161	0.000	0.080 ± 0.114
Pl64	N	60	53	113
	Na	19	22	26(20.5 ± 2.121)
	He	0.937	0.917	0.927 ± 0.014
	Ho	0.129	0.150	0.139 ± 0.015
Pl119	N	59	55	115
	Na	17	18	26 (15 ± 4.243)
	He	0.938	0.927	0.933 ± 0.008
	Ho	0.065	0.300	0.182 ± 0.167

Fuente: Los autores.

Nota: Na es el número 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

En cuanto a la estación de Repelón, los valores de heterocigosidad fueron $H_o=0.099\pm 0.0803$ y $H_e=0.912\pm 0.031$. Sólo para un locus no se observó ningún reproductor heterocigoto. El valor más alto de H_o se observó en el locus PL3 con 0.226. Para el caso de la H_e , el valor más alto se observó en PL119 con 0.938 y el más bajo en PL23 con 0.869 (Tabla 2.).

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 ± 0.069 . La mayor consanguinidad se observó con el PL3 (0.895) y la menor PL26 (0.861). La endogamia global (FIT) fue de 0.871 (IC= 0.818-0.921) y por estación piscícola (FIS) fue de 0.887 (0.855-0.915) para la estación de Repelón y 0.853 (0.819 - 0.882) para la estación del SENA (Tabla 3.).

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.

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

Fuente: Los autores.

Nota: D.E, corresponde a la desviación estándar de los valores, valores hallados por medio de la técnica de Jackknife

Equilibrio Hardy-Weinberg

Utilizando la prueba de [17], 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 [18], demostró que la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg es el resultado de un déficit de heterocigotos ($p<0.0001$).

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 1), ya que la mayoría de los alelos presentaron similares frecuencias en las poblaciones de las dos estaciones. Sin embargo, en algunos locus se observó una pequeña diferencia debido a la presencia de alelos únicos en cada estación. Como lo observado para PL3, donde 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, 8 no estuvieron en Repelón (Figura 1).

Utilizando el test de comparación a partir del estadístico F , se observó que las dos estaciones tienen poca diferenciación genética, dado que el valor de $F_{ST} (\theta)$ fue de 0.0104 (IC= 0.00003-0.0237).

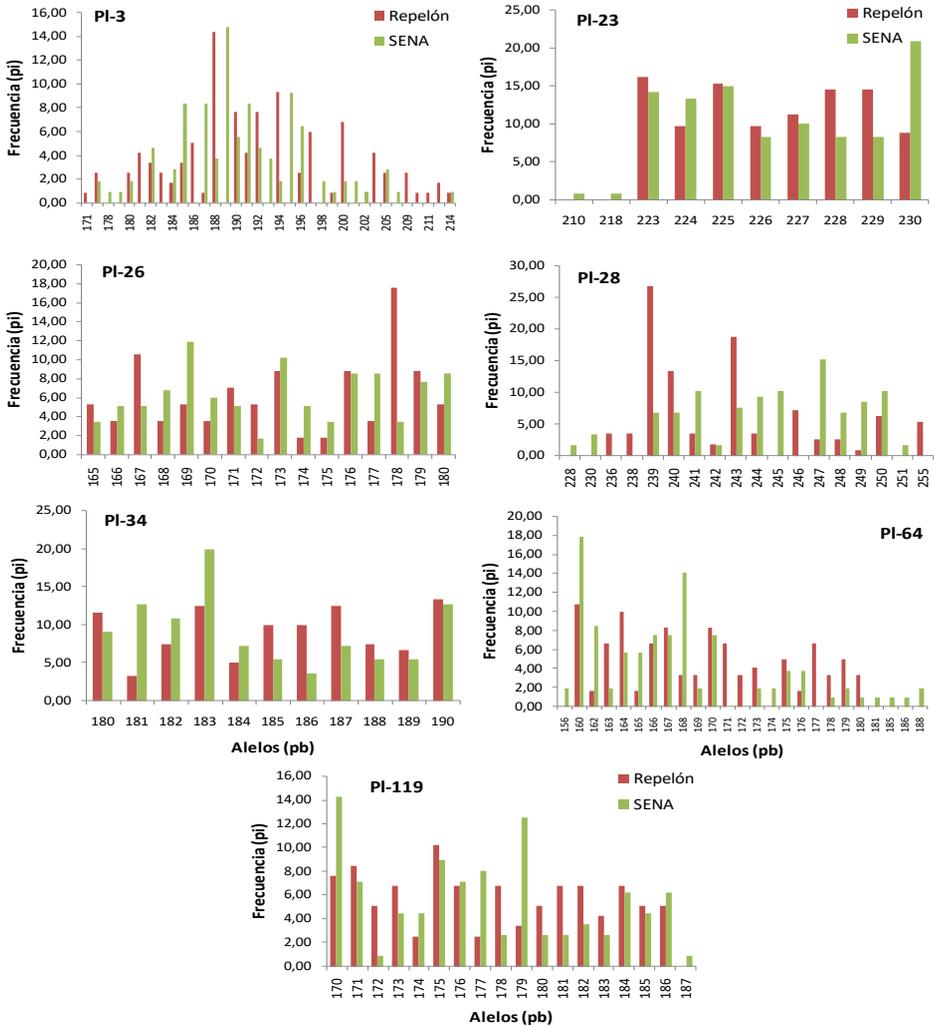


Figura 1. Frecuencias alélicas de cada locus en los sistemas de reproductores de bocachico *P. magdalenae* de las estaciones piscícolas de Repelón y SENA.

Fuente: Los autores.

Conclusiones y recomendaciones

Cuando se utilizan marcadores microsatélites 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. Los microsatélites

utilizados en esta investigación presentaron un promedio por encima de 15 alelos por locus, esto sugiere que los microsatélites empleados son una gran herramienta de información genética de esta especie [21].

Los valores encontrados difieren de los valores observados en *Prochilodus lineatus* publicados por [16], lo cual puede deberse al pequeño número de individuos utilizados en su estudio.

El polimorfismo observado en este estudio fue superior a los documentados en otras investigaciones. Por su parte [15], estudió las estaciones piscícolas que fomentan el repoblamiento de *Prochilodus magdalenae* en el río Sinú, reportando un polimorfismo por debajo a 12 alelos/locus. Con relación a estudios de poblaciones silvestres de otras especies del género, [22] documentaron un promedio de 12.4 alelos por locus, empleando cinco *loci* en el análisis de la población de *Prochilodus argenteus* en el río San Francisco en Brasil. [22], encontró un número de alelos que varió de 3 a 21 en las poblaciones de *Prochilodus costatus* en la parte media y alta del río San Francisco.

Con respecto a la variación genética, se evidenció que las dos estaciones piscícolas presentaron un potencial genético debido de la alta riqueza alélica y heterocigosidad esperada (H_e). Pero ese potencial no se evidencia en el estado actual del sistema de reproductores de bocachico de estas estaciones, debido a que los peces mostraron una alta endogamia (F_{is}) y una heterocigosidad observada (H_o) muy baja. En este sentido, como la pérdida de la variabilidad genética es naturalmente irreversible, es decir, sólo puede ser recuperada con la introducción de un nuevo material genético, es importante la conservación de la variabilidad genética en los lotes de reproductores mantenidos en cautiverio en las estaciones piscícolas [23].

Probablemente, esa alta endogamia y baja heterocigosidad observada (H_o), está asociada a un déficit de heterocigotos que puede ser explicado por tres razones: (1) al efecto fundador, un fenómeno común en las estaciones piscícolas cuando se establecen sistemas de reproductores a partir de un número reducido de peces que son homogéneos genéticamente [24]; (2) equivocadas prácticas de selección artificial que se aplican cuando con el mismo sistema de reproductores se realiza fomento de la acuicultura, dado que en la búsqueda de mejorar el desempeño en crecimiento y biomasa de

los cultivos se seleccionan peces muy emparentados [8], [25], [26]; y, (3) el origen de los peces que conforman el sistema de reproductores de una estación puede ser el mismo, reduciendo la heterocigosidad del sistema.

Realizando el análisis con las tres razones expuestas anteriormente y las condiciones presentadas en la estación se destaca: (1) los administradores de las dos estaciones manifiestan que no debe haber efecto fundador ya que el número de reproductores de cada estación es de aproximadamente 1500 peces; (2) es probable que la selección artificial se esté desarrollando en ambas estaciones para seleccionar peces por su tamaño y características similares, que luego son cruzados para obtener nuevos reproductores, este mal manejo reproductivo puede ocasionar una pérdida significativa de variabilidad genética en tan sólo una generación [8], [11], [12]; (3) los reproductores de ambas estaciones provienen del medio natural y siempre son capturados en las mismas zonas de las cuencas hídricas.

Adicionalmente se debe considerar que los peces capturados para conformar los sistemas de reproductores en las estaciones piscícolas pueden estar representando la condición genética actual de la población natural de bocachico, puesto que son capturados de las cuencas hídricas naturales. Sin duda, la sobreexplotación pesquera ejercida desde hace más de tres décadas [1] y la pérdida y degradación de su hábitat, pueden estar causando una reducción en la variabilidad genética de la población silvestre.

Por otra parte, se observó la presencia de alelos únicos para algunos *loci* en ambas estaciones piscícolas, lo cual es importante ya que está indicando la existencia de información genética diferente. Esto debe ser contemplado al momento de seleccionar los reproductores, porque cada alelo, es importante desde el punto de vista evolutivo y de esta manera sirve para aumentar la variabilidad genética de las progenies, para que estas a su vez la transmitan a las poblaciones del medio natural por medio del reemplazamiento, y así aportar a la conservación de la especie.

Según [11] para establecer un lote de reproductores con fines de reemplazamiento lo primordial es conocer la variabilidad genética de esos reproductores. En este estudio se pudo conocer la variabilidad de una muestra al azar (60 individuos) de los reproductores de dos estaciones piscícolas (Repelón y SENA), observándose valores muy bajos de heterocigosidad observada (H_o), pero estos mismos presentaron un

alto potencial genético, por medio de la heterocigosidad esperada (H_e). Sin embargo, con estos resultados se evidencia que los programas de repoblamiento de bocachico en Colombia se están desarrollando sin control y criterio científico, introduciéndose en el medio natural semilla con muy baja información genética, siendo urgente la necesidad de implementar herramientas moleculares para optimizar esta estrategia de conservación.

Bibliografía

- [1] J. I. E. Mojica, U. Oviedo, J. Usma, R. E. Alvarez León, and C. A. Lasso, *Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia (2012)*, no. Doc. 26063) CO-BAC, Bogotá. 2012.
- [2] AGRONET, “Volúmenes de pesca desembarcada por especie.,” 2012.
- [3] Y. J. Borrell *et al.*, “A parentage study using microsatellite loci in a pilot project for aquaculture of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* L.,” *Aquaculture*, vol. 310, no. 3–4, pp. 305–311, 2011.
- [4] J. L. Horreo, J. de la Hoz, I. G. Pola, G. Machado-Schiaffino, and E. Garcia-Vazquez, “Ecological and economic costs of supportive breeding: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study,” *Aquaculture*, vol. 356, pp. 1–6, 2012.
- [5] A. P. Wasko, C. Martins, C. Oliveira, J. A. Senhorini, and F. Foresti, “Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes,” *J. Appl. Ichthyol.*, vol. 20, no. 1, pp. 48–52, 2004.
- [6] D. A. Matoso *et al.*, “Two genetic stocks of *Steindachneridion melano dermatum* living in sympatry in nature and genetic variability of wild parents and F₁,” *Genet. Mol. Res.*, vol. 10, no. 4, pp. 2606–2612, 2011.
- [7] P. Hickley, “Stocking and introduction of fish—a synthesis,” *Rehabil. Freshw. Fish.*, pp. 247–254, 1994.
- [8] N. M. Lopera Barrero, R. Pereira Ribeiro, L. Vargas, D. C. Fornari, R. Nardez Sirol, and M. del P. Rodríguez Rodríguez, “Diversidad genética de *Brycon orbignyanus* en el sistema reproductivo semi-natural, utilizando el marcador RAPD,” *Zootec. Trop.*, vol. 28, no. 1, pp. 73–82, 2010.

- [9] J. A. Povh *et al.*, “Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. CD-ROM,” *Aqua-Ciência, Bento Gonçalves, Bras.*, 2006.
- [10] A. A. Agostinho, S. M. Thomaz, and L. C. Gomes, “Conservation of the biodiversity of Brazil’s inland waters,” *Conserv. Biol.*, vol. 19, no. 3, pp. 646–652, 2005.
- [11] N. M. Lopera Barrero, R. Pereira Ribeiro, J. A. Povh, P. C. Gomes, L. Vargas, and S. Nogueira de Oliveira, “Caracterización genética de lotes de peces usados en programas de repoblamiento y su importancia en la conservación genética en la piscicultura,” *Zootec. Trop.*, vol. 26, no. 4, pp. 515–522, 2008.
- [12] H. L. M. Moreira, S. Zimmermann, R. P. Ribeiro, R. G. Bastos, L. D. Vargas, and J. A. Povh, “The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia,” *World Aquac. Salvador. Bras.*, p. 460, 2003.
- [13] L. A. Frost, B. S. Evans, and D. R. Jerry, “Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*),” *Aquaculture*, vol. 261, no. 3, pp. 1056–1064, 2006.
- [14] T. Aho, J. Rönn, J. Piironen, and M. Björklund, “Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations,” *Aquaculture*, vol. 253, no. 1–4, pp. 244–248, 2006.
- [15] D. SANTACRUZ, W. USAQUÉN, and C. BURBANO, “Evaluación de la variabilidad genética con marcadores microsátélites del bocachico,” *Prochilodus magdalenae* (*Steindachner 1878*), *en el río Sinú, Colomb. Tesis Biólogo, Univ. Nac. Colomb. Bogotá, Colomb.*, 2003.
- [16] E. C. Rueda, J. Sommer, P. Scarabotti, R. Markariani, and G. Ortí, “Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae),” *Conserv. Genet. Resour.*, vol. 3, no. 4, pp. 681–684, 2011.
- [17] S. W. Guo and E. A. Thompson, “Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles,” *Biometrics*, pp. 361–372, 1992.

- [18] M. Raymond, "GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism," *J. Hered.*, vol. 86, pp. 248–249, 1995.
- [19] B. S. Weir and C. C. Cockerham, "Estimating F-statistics for the analysis of population structure," *Evolution (N. Y.)*, vol. 38, no. 6, pp. 1358–1370, 1984.
- [20] J. Goudet, "FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9. 3," <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>, 2001.
- [21] E. C. Rueda, P. Carriquiriborde, A. M. Monzón, G. M. Somoza, and G. Ortí, "Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River," *Genetica*, vol. 141, no. 7–9, pp. 401–407, 2013.
- [22] L. F. Carvalho-Costa, T. Hatanaka, and P. M. Galetti Jr, "Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*," *Genet. Mol. Biol.*, vol. 31, no. 1, pp. 377–380, 2008.
- [23] M. Sekino, T. Sugaya, M. Hara, and N. Taniguchi, "Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*," *Aquaculture*, vol. 233, no. 1–4, pp. 163–172, 2004.
- [24] A. J. D. Ambali, R. W. Doyle, and D. I. Cook, "Genetic changes in *Oreochromis shiranus* (Trewavas) associated with the early stages of national aquaculture development in Malawi," *Aquac. Res.*, vol. 30, no. 8, pp. 579–588, 1999.
- [25] M. M. Ferguson and R. G. Danzmann, "Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting?," *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 55, no. 7, pp. 1553–1563, 1998.
- [26] J. A. Povh, N. M. Lopera Barrero, R. P. Ribeiro, E. Lupchinski Jr, P. C. Gomes, and T. S. Lopes, "Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares," *Cienc. e Investig. Agrar.*, vol. 35, no. 1, pp. 5–15, 2008.