

Contribución reproductiva de una progenie de *Brycon orbignyanus* (Cuvier y Valenciennes, 1850) en el sistema reproductivo seminatural usando marcadores microsatélites

Nelson Mauricio Lopera-Barrero^{1*}, Maria del Pilar Rodríguez-Rodríguez², Ricardo Pereira Ribeiro², Jayme Aparecido Povh³, Lauro Vargas², Danilo Pedro Streit Jr.⁴ y Darci Carlos Fornari²

¹Universidade Federal de Mato Grosso. Núcleo de Pesquisa PeixeGen. Rodovia Rondonópolis-Guiratinga, km 06 (MT-270), 78735-910, Rondonópolis, MT, Brasil. Fone/Fax: +55 (44) 88020840. *Correo Electrónico: nelson.peixegen@gmail.com.

²Universidade Estadual de Maringá, Núcleo de Pesquisa PeixeGen, Centro de Ciências Agrárias, Av. Colombo, 5790, Bloco J45, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

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

⁴Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Departamento de Zootecnia, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540000, Porto Alegre/RS, Brasil.

RESUMEN

Los programas de repoblación de ríos vienen siendo usados con mayor frecuencia como métodos de conservación de especies de peces. Sin embargo, la evaluación de procedimientos reproductivos y su influencia en la progenie son necesarias para obtener resultados viables en los ecosistemas impactados negativamente por el hombre. El objetivo de este estudio, fue estimar la contribución reproductiva de una progenie de *Brycon orbignyanus* usada en programas de repoblación, en el sistema reproductivo seminatural, utilizando el marcador molecular microsatélite. Se analizaron muestras de aleta de 44 reproductores, 69 larvas de 3 días y 70 alevinos de 90 días. No se observó mortalidad de reproductores durante el proceso reproductivo y hubo desova/espermiación en todos los individuos, demostrando la efectividad del sistema seminatural en la preservación física y reproductiva durante los cruzamientos. Los 5 *loci* utilizados produjeron un total de 14 alelos entre 135 pb y 200 pb, siendo observados 3 alelos (BoM1, BoM5, BoM7 y BoM13) y 2 alelos (BoM2) por *locus*, presentes en los reproductores y en la progenie (larvas y alevinos). Fue confirmada la presencia de paternidad múltiple con participación de pocos reproductores en la progenie, revelando un proceso de dominancia reproductiva. Fueron observadas diferencias en la contribución reproductiva de larvas y alevinos, demostrando que esta contribución en un mismo lote puede ser diferente entre fases de crecimiento.

Palabras clave: Brasil, manejo reproductivo, paternidad, pez, piracanjuba, programas de repoblación.

Reproductive contribution of a *Brycon orbignyanus* (Cuvier y Valenciennes, 1850) offspring in the semi-natural reproductive system using microsatellite markers

ABSTRACT

The stock enhancement programs are being used more frequently as methods of fish conservation. However, the evaluation of reproductive procedures and their influence in the offspring are necessary to obtain viable results in the ecosystems impacted negatively by the man. The aim of this study was to estimate the reproductive contribution of a *Brycon orbignyanus* offspring used in stock enhancement programs, in the semi-natural reproductive system, using the microsatellite molecular marker. Fin samples of 44 broodstocks, 69 larvae of three days and 70 juvenile of 90 days were analyzed. Mortality of broodstocks was not observed during the reproductive process and there

was spawning/spermiation in all the individuals, demonstrating the effectiveness of the seminatural system in the physical and reproductive preservation during the mating. The 5 loci used produced 14 alleles a total between 135 bp and 200 bp, being observed 3 alleles (BoM1, BoM5, BoM7 and BoM13) and 2 alleles (BoM2) by *locus* present in the broodstocks and in the offspring (larvae and juvenile). The presence of multiple paternity was confirmed with participation of few broodstocks in the offspring, revealing a possible process of reproductive dominance. Differences in the reproductive contribution of larvae and juvenile were observed, demonstrating that this contribution in oneself stock can be different between phases of growth.

Keywords: Brazil, fish, paternity, piracanjuba, reproductive management, stock enhancement programs.

INTRODUCCIÓN

Brycon orbignyanus es un pez migratorio conocido en el Brasil como piracanjuba o bracanjuba (Orden Characiformes, familia Characidae, subfamilia Bryconinae) característico de las cuencas del río Paraná y Uruguay (Zaniboni-Filho *et al.*, 2006), que ha despertado un gran interés de investigadores y productores debido a su drástica reducción poblacional, siendo actualmente catalogada como especie en vía de extinción (Machado, 2005).

De las diversas herramientas utilizadas para reducir los impactos negativos provocados sobre estas poblaciones de peces, la práctica del repoblación de los ríos viene tornándose cada vez más común (Hilsdorf *et al.*, 2006). Es por ello, que sin un soporte científico que permita su correcta orientación, estos programas pueden volverse una amenaza mayor para el ecosistema (Agostinho *et al.*, 2005; Lopera-Barrero *et al.*, 2007). Según Povh *et al.* (2008), las introducciones de peces de forma irracional pueden provocar una reducción de la variabilidad genética debido principalmente a manejos genéticos y reproductivos inadecuados.

El sistema reproductivo seminatural viene siendo cada vez más usado en los programas de repoblación, ya que tiende a reducir el direccionamiento y la selección no intencional en el proceso reproductivo, además de disminuir significativamente la mortalidad causada por el estrés en especies de peces migratorias (Povh, 2007). Este seminatural intenta simular las condiciones naturales en las que sucede la reproducción de tal forma que después de la inducción hormonal (indispensable para la maduración del aparato reproductivo en especies de peces migratorias), los reproductores (machos y hembras) son instalados dentro de un estanque donde

ocurre la fertilización de los ovocitos por los machos de forma aleatoria y sin la interferencia del hombre. Este procedimiento es su componente diferencial cuando es comparado con el sistema reproductivo por extrusión, en el cual la fertilización es realizada manualmente por el hombre (Lopera Barrero, 2007).

Pocos estudios han sido realizados para evaluar la influencia del sistema reproductivo seminatural en progenies utilizadas en programas de repoblación. Por este motivo, es necesario la elaboración de investigaciones que permitan determinar su influencia reproductiva y genética, por cuanto una disminución de la variabilidad genética puede generar problemas de adaptabilidad y sobrevivencia de progenies usadas en programas de repoblación (Lopera-Barrero *et al.*, 2008a), provocar endogamia (Qin *et al.*, 2007) y afectar consecuentemente las poblaciones naturales de peces (Sønstebo *et al.*, 2007). Con ese fin, los marcadores microsatélites han sido utilizados con éxito (Lopera-Barrero *et al.*, 2007; Povh, 2007), una vez muestran un gran número de alelos y altos niveles de polimorfismo, produciendo genotipos únicos para todo individuo (Lopera Barrero, 2007).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue estimar la contribución reproductiva de una progenie de *Brycon orbignyanus* usada en programas de repoblación, en el sistema reproductivo seminatural, utilizando el marcador molecular microsatélite.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron 44 reproductores (22 machos y 22 hembras) de *B. orbignyanus* seleccionados de un lote mantenido en cautiverio por 6 años en las instalaciones de la Estación de Acuicultura e Hidrológica de la Duke Energy International, ubicada en la ciudad

de Salto Grande (49°13'W y 23°10'S), São Paulo, Brasil. El lote fue formado a partir de reproductores capturados en el río Paraná, pertenecientes a dos pisciculturas localizadas en las ciudades de Castilho y Porto Ferreira en el Estado de São Paulo.

Este lote permaneció inalterado, sin introducción de nuevos individuos, durante seis años, desde el momento de su formación. Los individuos son utilizados actualmente en programas de repoblación realizados en el río Paranapanema, São Paulo. Este río es un importante afluente del río Paraná, con una cuenca de 100.800 km² que irriga las regiones Sur-oeste de São Paulo y Norte-oeste del Paraná, sirviendo como divisor entre los dos Estados.

Inducción hormonal y reproducción

Los peces fueron inducidos a reproducción con extracto de hipófisis de carpa. Las hembras recibieron 5,5 mg/kg, divididos en 2 aplicaciones: 10% del total en la primera aplicación y el 90% restante 12 horas después. Los machos recibieron 2,5 mg/kg en dosis única paralelamente con la última aplicación de las hembras. La reproducción se realizó utilizando el sistema reproductivo seminatural. Los reproductores se colocaron en un estanque circular con un radio de 5,1 m x 1,85 m de profundidad media, abastecido por un flujo continuo de agua (131 l/s). Un tubo ubicado en la parte central permitió el direccionamiento de los huevos para una estación colectora, donde los huevos fueron vertidos en una incubadora cilindro-cónica de captación de 200 litros con flujo continuo de agua (7 l/s).

Aproximadamente, 6 horas después de la última inducción (160 horas-grado, 27°C) se inició el período de recolecta de huevos. Estableciendo un período de recolecta de máximo 6 horas, con la retirada de los huevos a cada hora de la incubadora de captación, siendo enseguida conducidos hacia incubadoras cilindro-cónicas donde ocurrió la incubación de los huevos.

Después de las 6 horas, se verificó por presión abdominal si los machos y hembras utilizados desovaron completamente (la ausencia de gametos indicaba que ocurrió expulsión total de los mismos) y paralelamente de todos los individuos se colectaron muestras de aleta caudal (0,5cm²), colocadas en microtubos de 1,5ml contenidos de alcohol etílico absoluto para la posterior extracción y amplificación del ADN.

El porcentaje de mortalidad de los reproductores usados en el cruzamiento se definió un día después de la reproducción.

Posteriormente, 3 días después de la eclosión de los huevos, 200 larvas aproximadamente se recolectaron de forma aleatoria de todas las incubadoras y se colocaron en microtubos de 1,5 ml con alcohol etílico absoluto. De estas larvas, 70 se escogieron aleatoriamente para luego la extracción del ADN. Transcurrido 90 días, se recolectaron muestras de aleta caudal de 200 alevines pertenecientes a la misma progenie. De estas muestras, 69 se escogieron para la posterior extracción de ADN.

Extracción, cuantificación e integridad del ADN

Para la extracción de ADN se utilizó la metodología descrita por Lopera-Barrero *et al.* (2008b). En microtubos contenido por las aletas, se adicionaron 550 µl de Buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS) y 200 µg/ml de proteinasa K. Las muestras se incubaron en baño María a 50°C por 12 horas. El ADN se precipitó con 600 µl de solución de NaCl (5M) y se centrifugó por 10 min a 12.000 rpm. El ADN se transfirió para nuevos microtubos, se precipitándose con 700 µl de alcohol etílico absoluto frío y se incubó por 2 horas a -20°C. Enseguida, se lavó con 700 µl de alcohol etílico 70%, se suspendió en 80 µl de solución amortiguadora TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) y fue mezclado con 30 µg/ml de RNAasa. Las muestras se incubaron por 40 min en baño María a 37°C conservándose a -20°C.

El ADN se cuantificó en espectrofotometro Shimadzu UV 1601- E.U. (amplitud de onda 260 nm) y se diluyó para una concentración de 10 e 5 ng/µl (aletas y larvas, respectivamente). La integridad del ADN se verificó en electroforesis horizontal usando un gel de agarosa 1%, a 70 V por 60 min, en solución amortiguadora TBE 1X (500 mM Tris-HCl, 60 mM ácido bórico, 83 mM EDTA). El gel se marcó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) por 30 min y la imagen se capturó con el sistema fotográfico EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5, E.U.).

Amplificación y electroforesis

El ADN se amplificó en un volumen final de reacción de 18 µl. Utilizándose 1X de la solución amortiguadora Tris-KCl, 2,0 mM MgCl₂, 0,8 µM de cada *primer* (*Forward* y *Reverse*), 0,2 mM de

cada dNTP, una unidad de Platinun *Taq* ADN Polimerasa, 10 y 20 ng/μl de ADN (larvas y aletas, respectivamente). Se amplificaron 5 *loci* descritos por Barroso *et al.* (2003) para *Brycon opalinus* (No. Acceso GeneBank AF513621-BoM1, AF513622-BoM2, AF513623-BoM5, AF513626-BoM7 y AF513628-BoM13). Las reacciones se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (E.U.), programado para 30 ciclos, con un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 4 min y un paso final de extensión a 72°C por 10 min. Cada ciclo consistió de 1 min a 94 °C, 1 min a 54°C, 60°C, 51°C, 51°C y 51°C para cada *loci* respectivamente, y 1 min a 72°C.

Las muestras amplificadas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (acrilamida : bisacrilamida - 29:1) desnaturalizado (6 M de urea), conducidas en solución amortiguadora TBE 1X (90 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA) a 350 V (250 mA) durante 6 horas. Para visualizar los alelos microsatélites, se utilizó la coloración con nitrato de plata descrita por Bassam *et al.* (1991) con algunas modificaciones. El gel se sometió a una solución de fijación (10% etanol, 0,5% ácido acético) por 20 min, tiñéndose con 6 mM de nitrato de plata por 30 min y posteriormente, previo lavado con agua destilada, se reveló con 0,75 M NaOH, 0,22% y formol 40%. Cada gel se fotografió con una cámara digital Cannon A520.

Análisis Estadístico

El tamaño de los alelos se calculó por el programa Kodak EDAS-290, utilizando DNA ladder (Invitrogen®) de 100 pb. El tipo y el número de pares de bases observados en los reproductores y progenie de *B. orbignyanus* utilizando los *loci* microsatélite se organizaron en matrices de datos. Los valores de contribución reproductiva se estimaron a través del programa PAPA versión 2.0 (Duchesne *et al.*, 2002). El número efectivo de reproductores se determinó según Moreira (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La integridad del ADN en gel de agarosa no mostró degradación del ADN y no hubo exceso de proteína que pudiese perjudicar la amplificación, demostrando que la metodología de extracción de ADN a partir de fragmentos de aleta y de larva es efectiva, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Lopera-Barrero *et al.* (2008b).

A diferencia de especies de peces como el Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) y curimba (*Prochilodus lineatus*), las especies del género *Brycon* son animales muy sensibles y pasan por gran estrés durante la reproducción inducida, pudiendo presentar altas tasas de mortalidad (Lopera Barrero, 2007). En el presente estudio, el uso del sistema seminatural permitió la sobrevivencia de todos los peces utilizados durante el cruzamiento. Esta conservación permite que un mayor número de individuos contribuyan en la fertilización de los huevos, generando mayor heterogeneidad de la progenie. Mediante la presión abdominal se verificó que todos los machos y todas las hembras produjeron semen y desovaron totalmente, demostrado en la falta de evacuación de gametos (verificación manual mediante presión abdominal).

Los 5 *loci* utilizados produjeron solamente 14 alelos siendo evidenciados 3 alelos (BoM1, BoM5, BoM7 y BoM13) y 2 alelos (BoM2) por *locus*, presentes en los reproductores y en la progenie (larvas y alevines). Se observaron tamaños de alelo entre 135 pb y 200 pb (BoM1 = 168-144; BoM2 = 200-170; BoM5 = 143-135; BoM7 = 198-188 y BoM13 = 172-160), de los cuales el menor estuvo presente en el locus BoM5 (135 pb) y el mayor en el locus BoM2 (200 pb). No fueron encontrados alelos exclusivos. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Lopera Barrero (2007), quien encontró 2 alelos por *locus* (140 a 200 pb) y Sanches y Galetti Jr. (2006), quienes encontraron 3 alelos para los *loci* Bh15 y Bh16 al amplificar *loci* microsatélite desarrollados para *Brycon hilarii* en *B. orbignyanus*.

Fue determinado el 38% de la contribución reproductiva en las larvas. De ese porcentaje, solo 8 machos (M8, M10, M11, M17, M18, M19, M20 y M21) y 8 hembras (H1, H8, H12, H13, H14, H17, H19 y H22) contribuyeron con la progenie. De esta forma, el número efectivo de reproductores (N_e) fue reducido de 44 para 16. Todos los machos que contribuyeron con las larvas fertilizaron más de una hembra, caracterizando paternidad múltiple (Cuadro 1).

De los 8 machos que participaron en las larvas, el M10 influyó directamente la formación de las familias (38,46%) denotando un efecto de dominancia reproductiva. Esta última, también conocida como hipótesis de la calidad intrínseca del macho o hipótesis del buen esperma (Sivinski, 1984), puede influenciar en la contribución reproductiva cuando

se usan sistemas reproductivos seminaturales, ya que la dominancia de algunos machos (supuestamente los más fuertes y con mejores características reproductivas) en la fertilización de los óvulos puede influenciar directamente en la progenie (Nordeide, 2007). Este fenómeno, ya se observó en peces exóticos (Porta *et al.*, 2006) y nativos brasileños como *Piaractus mesopotamicus* (Povh, 2007) y *B. orbignyanus* (Lopera Barrero, 2007), también se evidenció en el presente estudio para esa misma especie utilizando el sistema seminatural.

Por otro lado, al analizar la participación de las hembras, se determinó que las hembras H17 y H1 participaron juntas con 53,86% de las larvas (Cuadro 1), siendo establecida una participación más equilibrada por parte de las otras 6 hembras (46,14%). Esta situación puede ser influenciada por la mayor producción de óvulos que puede existir entre las diferentes hembras y por la resistencia al estrés producido durante la inducción hormonal que influye directamente en el comportamiento reproductivo (Povh, 2007).

La composición de las familias en las larvas fue influenciada directamente por la participación del macho 10 (M10) y de la hembra 17 (F17). El macho 20 y la hembra 1 también tuvieron una significativa participación. El cruzamiento con mayor porcentaje fue F1x M10 el cual obtuvo 19,23% de la progenie,

seguido por F17xM10 y F17xM20 que tuvieron cada uno 11,54% (Figura 1). A pesar de la mayor participación del M10 fue verificada una formación equilibrada de familias, posiblemente viabilizado por el efecto del sistema reproductivo seminatural el cual posibilita que un mayor número de reproductores contribuya en la fertilización durante los cruzamientos (Sirol y Britto, 2006), permitiendo que el pool genético de un lote pequeño o de un cruzamiento con pocos individuos (como es verificado normalmente en programas de repoblación) sea representado con mayor heterogeneidad en la progenie (Cacho *et al.*, 2007), debido al menor efecto selectivo del sistema y a la mayor tasa de supervivencia de los reproductores. Igualmente, en ese sistema los individuos sincronizan la liberación de los gametos, garantizando así una alta tasa de fertilización (Reynalte-Tataje *et al.*, 2002).

Al analizar la misma población de larvas a los 90 días (en fase de alevino) es esperado que la contribución reproductiva sean las mismas a las observadas en la fase larval. Entre tanto, se verificaron algunas modificaciones en la composición y estructura familiar. Del 27% de contribución reproductiva calculado para los alevinos se verificó que 8 machos (M5, M8, M10, M11, M17, M18, M19 y M21) y 9 hembras (H1, H4, H8, H12, H13, H15, H17, H19, H22) participaron de la progenie (Cuadro 2).

Cuadro 1. Participación individual (%) de machos (M) y hembras (H) en las larvas de *B. orbignyanus*, utilizando el sistema reproductivo seminatural.

Machos		Hembras	
M	%	H	%
M10	38,46	H17	30,77
M20	15,38	H1	23,08
M8	11,54	H14	19,23
M11	11,54	H22	11,54
M17	7,70	H8	3,85
M18	7,70	H12	3,85
M19	3,85	H13	3,85
M21	3,85	H19	3,85
Total	100	Total	100

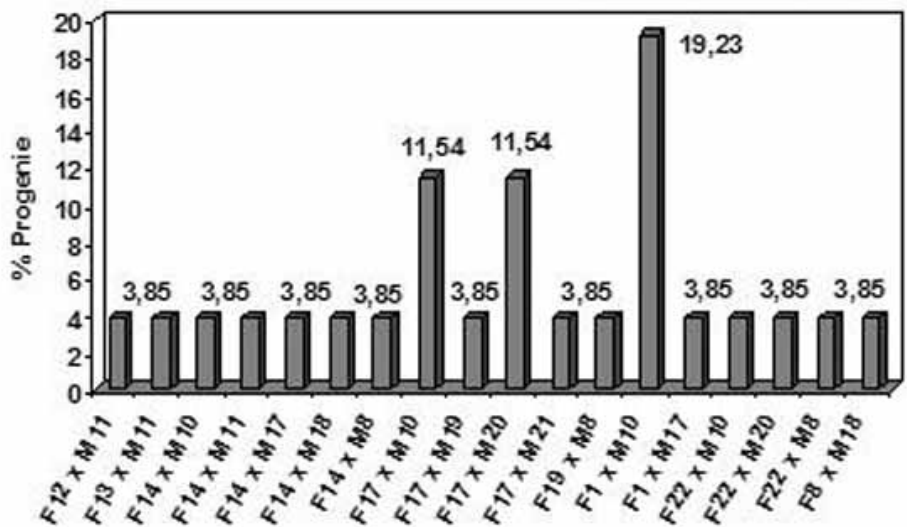


Figura 1. Composición de las familias en las larvas *B. orbignyanus*, utilizando el sistema reproductivo seminatural.

Cuadro 2. Participación individual (%) de machos (M) y hembras (H) en los alevinos de *B. orbignyanus*, utilizando el sistema reproductivo seminatural.

Machos		Hembras	
M	%	H	%
M21	47,36	H4	47,36
M8	21,05	H17	10,53
M5	5,26	H19	10,53
M10	5,26	H1	5,26
M11	5,26	H8	5,26
M17	5,26	H12	5,26
M18	5,26	H13	5,26
M19	5,26	H15	5,26
---	---	H22	5,26
Total	100	Total	100

En los 17 reproductores, se observó la participación del M5, H4, H12 y H15 los cuales no habían sido reconocidos en las larvas. Esto demuestra que la estimativa de la contribución reproductiva en un mismo lote puede ser diferente entre las fases de larva y alevino, lo que puede ser consecuencia del frecuente canibalismo en las fases iniciales observado en esta especie (Reynalte-Tataje *et al.*, 2002), condiciones ambientales de crecimiento, aclimatación o mortalidad aleatoria.

Al analizar el comportamiento de las hembras, se observó que la hembra H4 participó con 47,36% de los alevinos, seguida de la H17 y H19 con 10,53% de contribución. Una participación más equilibrada por parte de las otras 6 hembras fue observada (Cuadro 2). Solo 2 machos (M8 y M21) contribuyeron en la fertilización de más de una hembra, representando juntos 68,41% de la progenie, denotándose también la presencia de paternidad múltiple en los alevinos (Figura 2), donde el N_e se redujo de 44 para 17.

Resultados similares fueron encontrados por Porta *et al.* (2006) para *Solea senegalensis*, donde 2 machos de un total de 11 fueron responsables en mayor porcentaje por la progenie. Igualmente, Sekino *et al.* (2003) relataron que 99% de la progenie fue originada por la participación reproductiva de un macho, lo que provocó la disminución de la variabilidad genética en lotes de *Paralichthys olivaceus*. Povh (2007), analizando cruzamientos de *P. mesopotamicus* en el sistema reproductivo seminatural encontró que 2 reproductores fueron responsables por 43,3% de toda la progenie.

La composición de las familias en los alevinos fue influenciada directamente por la participación del macho 21 y la hembra 4, siendo que el cruzamiento H4 x M21 fue responsable del 36,84% de la progenie. A diferencia de los resultados observados en las larvas, el macho 10 y la hembra 17 solamente contribuyeron con 10,79% de los alevinos (Figura 2).

Al analizar los resultados encontrados en este estudio, fue visualizado que existen diferencias entre la contribución reproductiva en diferentes fases de crecimiento, como lo es la fase larval (3 días) y la fase de alevino (90 días) dentro de un mismo lote utilizado en programas de repoblación. Esas diferencias, que también pueden influenciar directamente la variabilidad genética de la progenie, hacen necesaria la realización de análisis genéticos y de contribución reproductiva en tiempos diferentes, dependiendo de

la edad en que los individuos van a ser liberados en los ríos.

Por ese motivo, se sugiere primeramente realizar un análisis genético en la fase larval, el cual va a ofrecer una visión genética general de la nueva población y en seguida, a los 60 o 90 días (dependiendo de las condiciones ambientales del ecosistema donde van a ser liberados), realizar un segundo análisis para determinar objetivamente las reales condiciones genéticas con que los individuos van a ser liberados en el río y así determinar la verdadera viabilidad del repoblación.

Debe ser claro que la primera medida a ser tomada en la implantación de programas de repoblación es verificar la genética de los lotes mantenidos en cautiverio (Lopera-Barrero *et al.*, 2008c). Una vez realizado ese análisis, es necesario evaluar genéticamente las progenies que posteriormente serán liberadas en los ríos. La evaluación de las progenies va a depender directamente del tamaño de los alevinos a ser liberados, que es determinado por las condiciones ambientales definidas para cada lugar donde va a ocurrir la repoblación. Alevinos mayores son exigidos en ambientes con gran número de predadores, no obstante, lugares donde hay equilibrio de las relaciones presa/predador, alevinos menores y en mayor número puede ser una estrategia adecuada (Sirol y Britto, 2006).

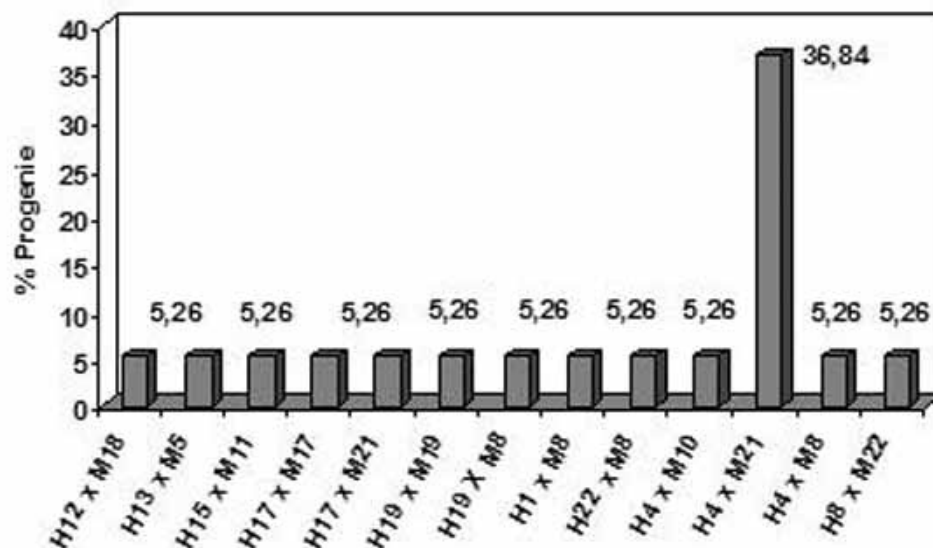


Figura 2. Composición de las familias en los alevinos de *B. orbignyanus*, utilizando el sistema reproductivo seminatural.

A pesar que los resultados demuestran la existencia de los procesos de dominancia reproductiva y paternidad múltiple, es verificable que la composición de las familias es heterogénea, lo que caracteriza un cruzamiento adecuado para un programa de repoblación.

Según Moreira *et al.* (2007), los marcadores microsatélite pueden ser empleados para estimativas de coeficientes de endocruzamiento y parentesco, coincidiendo con los resultados obtenidos por Fessehayé *et al.* (2006), los cuales concluyen que ese tipo de marcador permitió identificar relaciones genéticas entre la generación parental y sus progenies. Para el análisis de los reproductores y de la progenie de *B. orbignyanus* analizados en este estudio, los marcadores microsatélite fueron efectivos permitiendo obtener un perfil objetivo de la contribución reproductiva.

CONCLUSIÓN

El sistema reproductivo seminatural demostró ser efectivo en la preservación física y reproductiva durante los cruzamientos. Se confirmó la presencia de paternidad múltiple y dominancia reproductiva, donde fueron observadas diferencias en la contribución reproductiva de larvas y alevines, demostrando que su estimación en un mismo lote puede ser diferente entre fases de crecimiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa de generación de energía hidroeléctrica Duke Energy International y al Dr. Rodolfo Nardez Sirol por el apoyo al presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- Agostinho, A.A., S.M. Thomaz and L.C. Gomes. 2005. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conserv. Biol.*, 19 (3): 646-652.
- Barroso, R.M., A.W.S. Hilsdorf, H.L.M. Moreira, A.M. Mello, S.E.F. Guimarães, P.H. Cabello, and Y.M. Traub-Cseko. 2003. Identification and characterization of microsatellite loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819; Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Mol. Ecol. Notes*, 3 (1): 297-298.
- Bassam, B.J., G. Caetano-Anollés and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 196 (1): 80-83.
- Cacho, M.S.R.F., M.E. Yamamoto and S. Chellappa. 2007. Mating system of the amazonian cichlid angel fish, *Pterophyllum scalare*. *Braz. J. Biol.*, 67 (1): 161-165.
- Duchesne, P., M.H. Godbout and L. Bernatchez. 2002. PAPA (Package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. *Mol. Ecol. Notes*, 2 (2): 191-193.
- Fessehayé, Y., Z. El-Bialy, M.A. Rezk, R. Crooijmans, H. Bovenhuis and H. Komen. 2006. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. *Aquaculture*, 256 (1-4): 148-158.
- Hilsdorf, A.W.S., E.K. Resende e D.K.S. Marques. 2006. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Ed. Embrapa Pantanal, Brasil. p. 43.
- Lopera Barrero, N.M. 2007. Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. Tesis *PhD*. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Maringá, Brasil. p. 92.
- Lopera-Barrero, N.M., R.P. Ribeiro e J.A. Povh. 2007. O repovoamento de peixes: uma estratégia multidisciplinar? *Aqüicultura & Pesca*, 30 (1): 71-74.
- Lopera-Barrero, N.M., R.P. Ribeiro, R.N. Sirol, J.A. Povh, P.C. Gomes, L. Vargas y C.A. Mangolin. 2008a. Variabilidad genética de lotes de *Brycon orbignyanus* utilizados en programas de repoblación: manejo y conservación. *Acta biol. Col.*, 13 (1): 107-118.
- Lopera-Barrero, N.M., J.A. Povh, R.P. Ribeiro, P.C. Gomes, C.B. Jacometo y T.S. Lopes. 2008b. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cien. Inv. Agr.*, 35 (1): 77-86.

- Lopera-Barrero, N.M., R.P. Ribeiro, J.A. Povh, , P.C. Gomes, L. Vargas y S.N. Oliveira. 2008c. Caracterización genética de lotes de peces usados en programas de repoblación y su importancia en la conservación genética en la piscicultura. *Zootecnia Trop.*, 26 (4): 515-522.
- Machado, A.B.M. 2005. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. **In:** Machado, A.B.M., C.S. Martins, G.M. Drummond (Eds.). Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Brasil. p. 160.
- Moreira, H.L.M. 2001. Genética e Melhoramento de Peixes. **In:** Moreira, H.L.M., L. Vargas, R.P. Ribeiro and S. Zimmermann (Eds.). Fundamentos da moderna aquicultura. ULBRA, Canoas, Brasil. p. 135-147.
- Moreira A.A., A.W.S. Hilsdorf, J.V. Silva y V.R. Souza. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microsatélites. *Pesqui. Agrope. Bras.*, 42 (4): 521-526.
- Nordeide, J.T. 2007. Is there more in 'gamete quality' than quality of the gametes? A review of effects of female mate choice and genetic compatibility on offspring quality. *Aquac. Res.*, 38 (1): 1-16.
- Porta, J., J.M. Porta, G. Martínez-Rodríguez and M.C. Alvarez. 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture*, 251 (1): 46-55.
- Povh, J.A. 2007. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Tesis PhD. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Maringá, Brasil. p. 75.
- 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 repoblación de peces mediante marcadores moleculares. *Cien. Inv. Agr.*, 35 (1): 5-15.
- Qin, Y., X. Liu, H. Zhang, H and G. Zhang. 2007. Effect of parental stock size on F1 genetic structure in the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). *Aquacult. Res.*, 38 (1) : 174-181.
- Reynalte-Tataje, D.A., B.M. Esquivel, J.R. Esquivel y E. Zaniboni-Filho. 2002. Reproducción inducida del piaçu, *Leporinus macrocephalus* Garavello y Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). *B. Inst. Pesca*, 28 (1): 11-18.
- Sanches, A. and P.M. Galetti Jr. 2006. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Mol. Ecol. Notes*, 1 (1): 1-2.
- Sekino, M., K. Saitoh, T. Yamada, A. Kumagai, M. Hara and Y. Yamashita. 2003. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, 221 (1-4): 255-263.
- Sirol, R.N. e S.G. Britto. 2006. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. **In:** Nogueira M.G., R. Henry e A. Jorcin. (Eds.). Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas. RiMA, São Carlos, Brasil. p. 275-284.
- Sivinski, J. 1984. Sperm in competition. **In:** Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems. Smith, R.L. (Ed.). Academic Press, London, England. p.86-115.
- Sønstebo, J.H., R. Borgstrøm and M. Heun. 2007. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. *Conserv. Genet.*, 8 (1): 33-44.
- Zaniboni-Filho, E., D. Reynalte-Tataje e M. Weingartner. 2006. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 19 (2): 233-240.