

Variabilidad genética en cachamas de Los Llanos venezolanos, usando marcadores RAPD

Genetic variability of the french angelfish from the Venezuelan plains using RAPD markers

Yamilys Y. Carreño Pérez^{1*}, Efraín Salazar Y.¹, Siomara Martínez Marrero³, Otto E. Castillo González² y Luis Castro¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas. INIA-CENIAP. Código postal 2101. Aragua. Venezuela. Correo electrónico: yamilys69@hotmail.com.

² Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora” (UNELLEZ). Vicerrectorado de Producción Agrícola. Programa de Ciencias del Agro y del Mar. Portuguesa, Venezuela.

³ Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Mayabeque, Cuba.

RESUMEN

Resulta necesario conocer la huella genética de las poblaciones de reproductores existentes en las estaciones piscícolas del país, para garantizar la sostenibilidad de este patrimonio, ya que de ello depende implementar programas genéticos eficientes en la explotación de los mismos. La presente investigación consistió en una caracterización genética de las cachamas negras (*Colossoma macropomum*) y cachamas blancas (*Piaractus brachyomus*) en la estación piscícola de San Fernando de Apure e INIA Papelón de Los Llanos venezolanos. Se seleccionaron los diez cebadores más polimórficos capaces de establecer diferencias entre los individuos. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Fueron visualizados bajo luz ultravioleta y se construyeron las matrices binarias para las bandas obtenidas (0 banda ausente y 1 banda presentes). Las matrices fueron analizadas mediante un análisis de conglomerado jerárquico, con el programa estadístico PAST versión 2.02, empleando el método Ward. Los valores para el índice de Shannon (H) fueron de entre 1,05 a 1,40 lo que indica que existe una baja diversidad genética dentro de las poblaciones, este resultado fue similar para el índice de Margalef en donde se obtuvieron valores de entre 1,68 a 2,50 siendo la población de cachamas negras del INIA Papelón la que presentó mayores índices de variabilidad genética.

Palabras clave: *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachyomus*, Diversidad genética, caracterización molecular.

ABSTRACT

It is necessary to know the genetic fingerprint of existing stocks in fish breeding stations in the country, to ensure the sustainability of this heritage through the implementation of efficient genetic programs that helps to improve productivity. This research involved a genetic characterization of black cachamas (*Colossoma macropomum*) and white cachamas (*Piaractus brachyomus*) at the fish stations from San Fernando de Apure and INIA “Papelón” in Portuguesa from the Plain zones venezuelan. Ten of the most capable primers ables to differente among individuals were selected. The amplification products were separated in agarose gel electrophoresis 1.5%. The products were visualized under ultraviolet light, and binary matrices were constructed from the bands obtained (0 means missing of the band and 1 means presence of the band). Arrays were analyzed using hierarchical cluster analysis, with the statistical program PAST version 2.02 using the Ward method. Values of the Shannon index (H) ranged from 1.05 to 1.40 indicate that there is low genetic diversity within populations, this result was similar to the Margalef index with values from 1.68 to 2.50 of the population. The black cachamas population from INIA Papelón scored for the highest genetic variability indexes.

Key words: *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachyomus*, Genétic Diversity, Molecular Characterization.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, la cachamicultura ocupa el segundo lugar en producción de proteína animal proveniente de la piscicultura (INAPESCA 2004), representada por la cachama negra (*Colossoma macropomum*), la cachama blanca o morocoto (*Piaractus brachypomus*) y el híbrido cachamoto, producto del cruce de las dos especies puras. Estas especies poseen características de importancia en la piscicultura como: Rápido crecimiento, adaptabilidad al manipuleo en cautiverio, aunado a que son de amplia distribución en la Cuenca de la Orinoquia venezolana. Pese a la importancia de la cachama blanca y la cachama negra en la piscicultura nacional, no existen planes para su mejoramiento genético y sólo se cuenta con un vago conocimiento de la procedencia.

A fin de contribuir con posibles programas de mejoramiento genético se hace necesario conocer la caracterización genética de las poblaciones, así como la diversidad genética presente y las posibles relaciones filogenéticas entre los individuos de ambas especies. Para este fin, los marcadores moleculares son una herramienta útil e indispensable para la acuicultura, ya que permiten una identificación más precisa de los individuos que está basada en su material genético, mediante el cual se facilita planificar los posibles cruces y manejo de la reproducción de estas especies en las estaciones piscícolas, haciendo más efectivo el mejoramiento genético, ayudando a minimizar la pérdida de variabilidad genética (Povh *et al.*, 2008; Montaña *et al.*, 2006).

Dentro de las técnicas moleculares, el uso de los marcadores de ADN Polimórfico Amplificado al Azar, RAPD por sus siglas en inglés, (Williams *et al.*, 1990) ha sido una estrategia utilizada para la caracterización preliminar de las poblaciones y el establecimiento de criterios generales de manejo de planes de mejora en peces (Rocco *et al.*, 2014; Faddagh *et al.*, 2012). De igual modo, los RAPD han sido útiles para determinar efectos genotóxicos en poblaciones de peces debido a contaminación con metales pesados (Salem *et al.*, 2014), confirmando la utilidad de estos marcadores en caracterizaciones moleculares y estudios genéticos en peces.

En el caso de cachamas o especies relacionadas, existen trabajos de caracterización genética mediante el uso de técnicas moleculares, Orozco y Narváez (2014) estudiaron la diversidad genética de poblaciones de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) en el río Magdalena utilizando marcadores microsátélites, corroborando la utilidad de los marcadores moleculares para la identificación de poblaciones ictícolas y su contribución a los programas de manejo y conservación de peces. De igual modo, Pineda *et al.* (2007) utilizaron los marcadores RAPD para caracterizar molecularmente poblaciones de *Brycon henni*, colocando muestras de cachama como control interespecífico para los grupos, demostrando que la técnica era útil para el estudio de diversidad genética en estas especies.

Aún cuando no se reportan estudios de diversidad genética en cachamas utilizando marcadores RAPD, Aguiar *et al.* (2013) estudiaron la diversidad genética de *Colossoma macropomum*, tanto nativas como cultivadas, analizando secuencias de ADN mitocondrial, encontrando niveles de diversidad genética similares entre las poblaciones estudiadas, y llamó la atención que las especies mejoradas y en cautiverio, presentaron una estructura genética similar a la encontrada en las poblaciones nativas. No obstante, es necesario realizar estudios más exhaustivos en cuanto a la caracterización genética de las especies de cachama producidas en condiciones artificiales.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar genéticamente a las cachamas negras y a las cachamas blancas cultivadas de dos estaciones piscícolas de Los Llanos venezolanos utilizando marcadores RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área

La investigación se realizó en dos estaciones piscícolas ubicadas en Los Llanos venezolanos (Estación Piscícola San Fernando de la Gobernación del estado Apure cuyas coordenadas geográficas son 7° 52' 34" N y

67° 30' 8" W he INIA Papelón-Portuguesa con coordenadas geográficas 7° 52' 30" N y 69° 26' 50" W).

Tipo de muestra

Para el estudio del material genético de los individuos se colectaron inicialmente 5 gr aproximadamente de aleta caudal, los cuales se conservaron en etanol 70% a 4°C. El material genético fue aislado a partir de 2 gr del tejido anteriormente mencionado.

Número de muestras

La presente investigación se realizó con 82 ejemplares, de los cuales 30 individuos correspondieron a cachamas negras provenientes de la estación piscícola del INIA Papelón, y 26 provenientes de la estación piscícola San Fernando del estado Apure. Para el caso de las cachamas blancas se trabajó con 26 reproductores provenientes de la estación del estado Apure.

Protocolo de extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) modificado por Carreño *et al.*, 2014 (En prensa). Se maceraron 2 g de tejido blando de la aleta (en caso de ser tejido duro se debe cortar inicialmente en trozos muy pequeños) con 500 µL del tampón de lisis (Tris HCL pH 8.0 100mM, EDTA pH 8,0 50 mM, NaCl 500 mM, SDS (w/v) 1,25%, bisulfito de sodio 0,38 g/100 ml) precalentado a 65 °C. Se añadieron 50 µL de ditiotreitól (10mM) y las muestras se incubaron a 65 °C por 45 minutos agitándose constantemente a 1.000 rpm. Posteriormente, se agregaron 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y 50 µL de CTAB (2%) incubándose a -20°C por 15 minutos. Los macerados se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 minutos, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo nuevo y repitiéndose los pasos desde agregar 500 µL de cloroformo isoamil alcohol (24:1) y 50 µL de CTAB. Se agregaron 500 µL de isopropanol frío y 50 µL de acetato de sodio (3M). Las muestras se incubaron a -20°C por media hora o durante toda la noche. Se centrifugaron los extractos a 14.000 rpm por 10 minutos, decantándose el isopropanol. El sedimento se lavó con 500 µL de etanol 70%

frío y la muestra se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos, repitiéndose este último paso hasta 3 veces. Las muestras se secaron finalmente por centrifugación al vacío (Concentrador 5301, marca Eppendorf) a 45 °C por 5 minutos y los sedimentos secados se resuspendieron en 50 µL de Buffer TE. Los ADN aislados se mantuvieron a -4 °C hasta su análisis.

La cuantificación y dilución del ADN

La cuantificación e integridad del ADN fue determinada midiendo la absorbancia en un Nano Drop ND-1000, marca Thermo Scientific, la calidad e integridad se observó mediante la separación electroforética de la muestra en un gel de agarosa 1%, con un campo eléctrico constante de 100 Volt ± 100 mA por 45 minutos. Para las reacciones de RAPD, los ADN de las muestras fueron diluidos a concentraciones de 10 ng/µL.

Condiciones de la amplificación por RAPD

La amplificación al azar de los ADN extraídos fue realizada en un termociclador marca MJ Research modelo PTC-200. Se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, 37°C por 30 segundos y 72°C por dos minutos. Finalmente se realizó un paso para la extensión final de las cadenas a 72°C por siete minutos y las muestras se mantuvieron a 4°C. El volumen de la reacción fue de 15 µL conteniendo 2 µL (20 ng) de ADN, 2 µL del iniciador OPB04(6µM), el cual fue seleccionado al azar, 0,8 µL (1 unidad) de Red-Taq ADN polimerasa, platinum (Sigma, USA), 0,34 µL (10 mM) de cada dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Promega, USA), 1,5 µL de tampón Red- Taq 10X, 7,36 µL de agua bidestilada y 1 µL de BSA (Suero de Albumina Bovino) 10 mg/ml. En la amplificación se usó una reacción como control (N), a la cual se le añadieron 2 µl de agua bidestilada en lugar de ADN.

Selección de cebadores más polimórficos

Se usaron tres set (OPA, OPB y OPC) de 20 iniciadores cada uno, con un tamaño de 10 nucleótidos por iniciador, fueron adquiridos de Operon Technologies, USA. Se seleccionaron los diez cebadores que permitieron observar el mayor grado de polimorfismo, para continuar

con el estudio del total de las muestras. Para la detección del polimorfismo, solo se consideraron los fragmentos reproducibles, y claramente observados en el gel.

Detección de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1,5%, con buffer TBE 0.5X a pH 8.0. La tinción del gel se realizó con con 1µl de bromuro de etidio (10 mg/ml Promega, USA) añadidos al gel. Como marcador de peso molecular se utilizó la escalera de fragmentos 1 Kb (Promega, USA). Los geles fueron digitalizados en un equipo modelo Gel Doc XR, marca BIO-RAD. Los análisis de las bandas se realizaron utilizando el programa Quantity One de Biorad versión 4.2.

Diseño y análisis estadístico

La investigación se realizó siguiendo un diseño completamente al azar. Se analizó el porcentaje de bandas polimórficas y el contenido de información polimórfica de acuerdo a la fórmula de Roldán-Ruiz *et al.* (2000). Para el análisis fenético se construyó una matriz de ausencia y presencia de bandas, para cada una de las poblaciones, asignándose el valor 1 para la presencia de la banda o 0 para su ausencia. Se realizó un análisis multivariado de conglomerado jerárquico, mediante el programa estadístico PAST versión 2.02, con el método de agrupamiento de Unweighted Pair Group

Method with the Arithmetic Averaging (UPGMA) con base en el cálculo del coeficiente de similitud de Ward (1963).

El análisis de la variabilidad genética se realizó utilizando el porcentaje de fragmentos polimórficos y los índices de diversidad genética H (Shannon-Weaver, 1949) y M (Margalef, 1958).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizadas las amplificaciones, se seleccionaron las secuencias OPA1, OPA2, OPA3 OPA5, OPA7, OPA8, OPA11, OPA17, OPA18 y OPA20, como las que fueron capaces de evidenciar un alto grado de polimorfismo (99% de bandas polimórficas en promedio). Para las tres poblaciones se obtuvo un total de 273 bandas. La especie blanca fue la que menor número de bandas mostró con un total de 90, en comparación con el promedio de bandas para la especie negra, el cual se estimó en 93 bandas. Pero, como se puede observar en el Cuadro, el número de bandas para la especie negra fue diferente en función de la localidad.

Los cebadores seleccionados fueron capaces de evidenciar polimorfismos para las tres poblaciones, donde el número de bandas polimórficas producidas osciló de entre 2 y 15. Es importante señalar, que las bandas obtenidas se presentaron desde un mínimo de 1 hasta un máximo de 26 individuos, lo que indica una gran similitud entre los individuos. El 65% de

Cuadro. Resumen de polimorfismo generado de una población de (*P. brachypomus*) y dos poblaciones de (*C. macropomum*) en estaciones piscícolas del Los Llanos venezolanos, mediante el uso de RAPD.

Especie/Localidad	NTB	NBP	%BP	PIC	Ees
(<i>P. brachypomus</i>) Apure	90	90	100	0,20	0,03
(<i>C. macropomum</i>) Apure	79	77	96	0,21	0,05
(<i>C. macropomum</i>)Portuguesa	104	104	100	0,26	0,05

NTB= Número total de Bandas por especie y localidad de muestras, NBP= Número de bandas polimórficas, %BP= Porcentaje de bandas polimórficas, PIC=Contenido de Información Polimórfica y ees=error estándar asociado a los PIC.

las bandas estudiadas estuvieron presentes en menos de seis individuos, mientras que el 22% de las bandas se presentó de forma específica en un individuo.

Al observar los valores del contenido de información polimórfica, obtenemos valores promedios entre las tres poblaciones que van de entre 0,20 y 0,26, lo que demuestra que los marcadores utilizados, tienen una probabilidad media, de manera individual, de establecer polimorfismos entre los individuos estudiados, por ello es necesario el uso de varios marcadores RAPD para poder hacer un buen análisis de la variabilidad.

El análisis de los conglomerados jerárquicos usando el método de Ward dieron como resultado tres dendogramas que se presenta en

la Figura 1, 2 y 3 correspondiente a cada una de las poblaciones de cachamas, en los cuales se expusieron las relaciones fenéticas dentro de cada una de las poblaciones, demostrando que existen dos conjuntos de individuos presentes en cada una de las poblaciones. En todos los casos, las distancias genéticas entre los individuos resultaron pequeñas. Las 1.000 repeticiones de Booth trapping realizadas, indicaron una alta repetibilidad de las separaciones de grupos y subgrupos observadas.

La diversidad genética para la población de cachama blanca de San Fernando de Apure, tuvo un índice H de Shannon de 1,05 mientras que para el índice de Margaleff fue de 1,68. Estos valores indican una baja variabilidad genética en los individuos muestreados, por lo que se está en presencia de individuos estrechamente

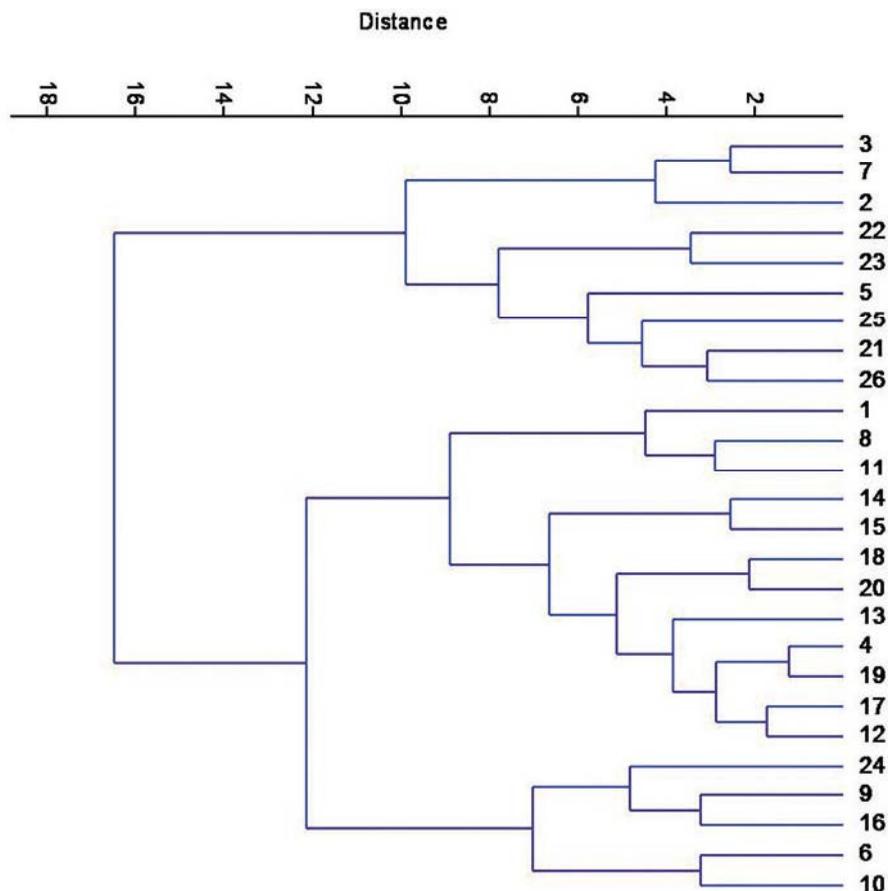


Figura 1. Dendrograma UPGMA, que muestra la relación genética entre 26 reproductores de cachama blanca de la estación piscícola de San Fernando de Apure. Soporte de rama 1.000 réplicas.

relacionados desde el punto de vista genético, como se muestra en la Figura 1. Así mismo para la población de cachamas negras de San Fernando de Apure, los índices de diversidad genética fueron de 1,21 para el índice H de Shannon y de 2,10 para el índice de Margaleff, lo que igualmente indica una baja variabilidad genética en esta segunda población. Ver la Figura 2.

Para el caso de la estación piscícola del INIA Papelón del estado Portuguesa, se obtuvo una diversidad genética para el índice H de Shannon de 1,4 y para el índice de Margaleff de 2,5 estos valores indican una baja variabilidad genética entre esta población según el primer índice, pero para el segundo índice los valores de variabilidad genética están dentro del rango de aceptación normal, a pesar de estar orientados hacia el nivel más bajo de variabilidad genética aceptada como normal o media.

La acuicultura como actividad económica en crecimiento requiere el empleo de técnicas y estrategias que le permitan solucionar los

problemas para ser más eficientes. Dentro del contexto del mejoramiento genético de los organismos cultivables, se requiere la selección de reproductores que posean las mejores características fenotípicas y genotípicas, que garanticen una producción de alevines en calidad y cantidad (Montaño *et al.*, 2006 y Atta, 2006). Conocer los parentescos entre los reproductores una vez que son capturados en el medio natural, permitirá realizar los cruces de forma más efectiva que garantice un flujo genético en equilibrio entre alelos homocigotos y heterocigotos. Los marcadores RAPD resultaron ser una herramienta útil para conocer y evitar la pérdida de variabilidad genética (Povh *et al.*, 2008).

Existen muchos factores a que se le puedan atribuir el que las poblaciones aquí estudiadas, tengan una baja diversidad genética. Pineda *et al.* (2007) estudiaron poblaciones silvestres de *Brycon henni* y encontraron que la diversidad genética de las misma fue discreta quizás por efectos antrópicos debido a la manipulación

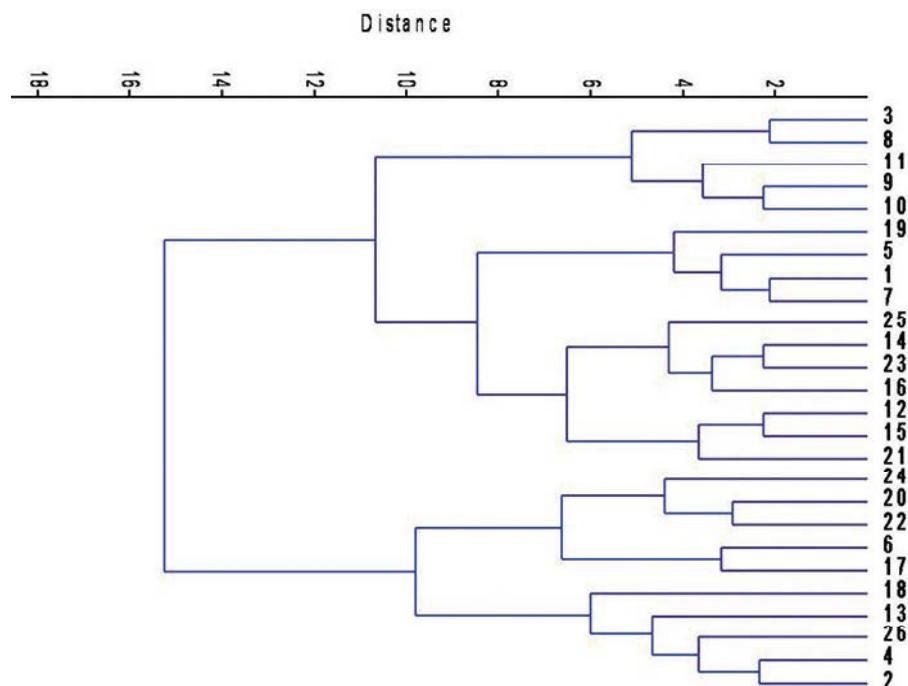


Figura 2. Dendrograma UPGMA, que muestra la relación genética entre 26 reproductores de cachama negra de la estación piscícola de San Fernando de Apure. Soporte de rama 1.000 réplicas.

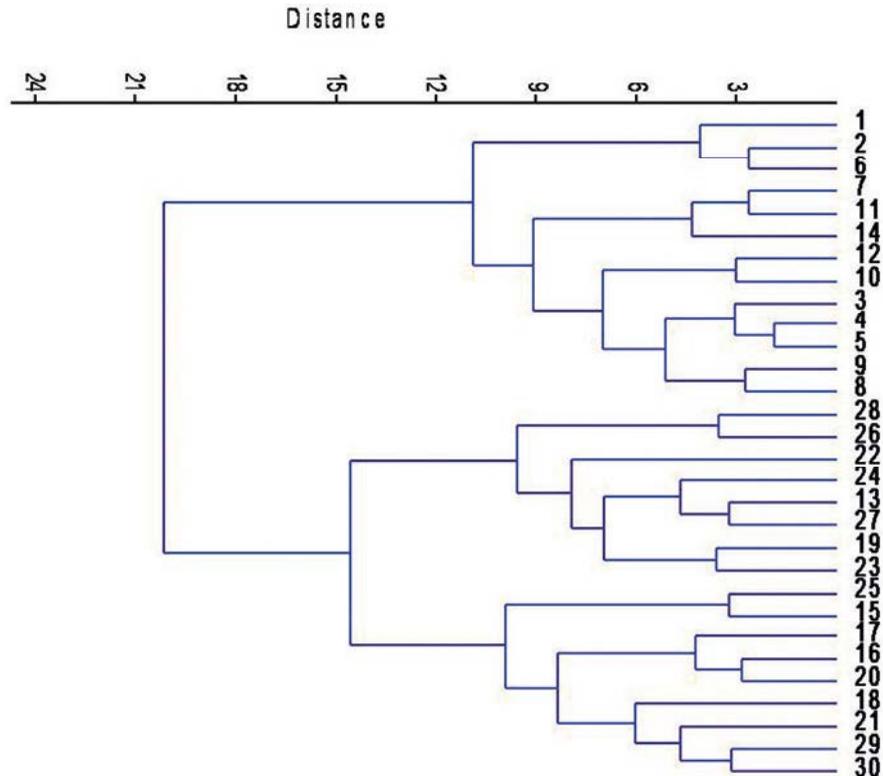


Figura 3. Dendrograma UPGMA, que muestra la relación genética entre 26 reproductores de cachama negra de la estación piscícola del INIA Papelón del estado Portuguesa. Soporte de rama 1.000 réplicas.

o acción del hombre, tanto en los ambientes naturales como en los controlados. Toda población cuenta con una serie de atributos que se resumen en su variabilidad genética y este es el material de partida sobre el cual los agentes (mutación, migración, deriva genética y selección natural) producen cambios estructurales (Álvarez, 1987). Actualmente estas estaciones piscícolas no cuentan con estudios genéticos necesarios para realizar una selección adecuada, distinguiendo los reproductores en base a los fenotipos, lo que lleva como consecuencia la realización de cruzamientos subjetivos, lo que puede incidir de forma negativa sobre la diversidad genética y las características desde el punto de vista productivo.

Así mismo estos resultados con una diversidad genética, aparentemente baja, se le pueden atribuir al número pequeño de reproductores dentro de las estaciones piscícolas. Lande

(1980) señaló que en una población fundadora que esté constituida por un número pequeño de reproductores, se espera un descenso de la heterocigosis en la primera generación con respecto a la población de origen en un 25%. En este orden de ideas, Álvarez (1987) indicó que la estocasticidad de una población debido a la deriva por el número finito o tamaños pequeños de una población, reduce considerablemente su diversidad genética.

Por lo tanto, el manejar dentro de estaciones piscícolas un número pequeños de reproductores, considerados superiores por algún criterio para la fundación del stock a partir de pocos individuos de una población natural (efecto fundador) es perjudicial, ya que reduce en cada generación la diversidad genética de los individuos y con ello sus cualidades productivas cuantificables. Esta práctica es común en estas estaciones piscícolas, dado a que los peces y moluscos por

ser de alta fecundidad, se pueden producir un gran número de individuos a partir de un número pequeño de reproductores.

Por otra parte Elorrieta (1993), realizó un trabajo con el fin de cuantificar la variabilidad genética intrapoblacional existente en varias poblaciones de tenca (*Tinca tinca*) en España y determinó su similitud genética, a nivel citogenético, bioquímico (isoenzimas) y molecular (PCR y RAPD), en donde encontró que las distancias génicas por cualquiera de los métodos fueron más bajas de lo esperado y deseable en poblaciones naturales, lo que indica que la variabilidad genética de estas poblaciones han perdido riquezas génicas ya sea por acción del hombre o por otros fenómenos naturales.

Así mismo Lopera *et al.* (2009) analizaron la diversidad genética de lotes de *Piaractus mesopotamicus* usados en programas de repoblamiento, mediante el marcador molecular RAPD, obteniendo que según el índice Shannon existía una alta diversidad genética en los lotes evaluados. Pero, se encontró una alta similitud genética entre los lotes debido posiblemente al efecto fundador, ya que los lotes se produjeron con reproductores recolectados en el río Paraná.

Por otro lado, a diferencia de estos resultados, Lupchinski *et al.* (2011) estudiaron diversidad genética de tres líneas de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), mediante el uso de 13 marcadores RAPD, donde analizaron tres líneas de dos piscifactorías, obteniendo una alta variabilidad genética dentro de cada línea. Del mismo modo, Lopes *et al.* (2009) analizaron la diversidad genética en reproductores de (*Colossoma macropomum*) de piscifactorías en Brasil, con 10 cebadores de RAPD, encontrando una alta variabilidad genética entre los lotes de reproductores estudiados, de igual modo, se encontró que el número de migrantes entre los dos lotes aumentaba con cada generación.

Así mismo, Pineda *et al.* (2007) mencionaron haber encontrado un alto porcentaje de individuos con fragmentos únicos de ADN y le atribuyen esto al aislamiento geográfico de los mismos y al cautiverio, pero que aún conservan las características propias de su grupo genético original. Esto concuerda con los resultados de esta investigación, en el que el porcentaje de individuos con fragmentos únicos de ADN

fue del 22%. Estos fragmentos únicos son de suma importancia para la caracterización e identificación de los genotipos, y de su seguimiento en programas estructurados de mejora genética piscícola.

El estudio genético de las poblaciones silvestres de donde se reponen los planteles de reproductores de las estaciones piscícolas deben ser evaluado constantemente, con el fin de conocer la evolución biológica y determinar si las especies sufren algún tipo de deriva genética, efecto fundador o cuello de botella, a fin de corregir las fuentes naturales de reproductores y evitar la consanguinidad. Por otro lado, Falconer (1981) comentó que la consanguinidad es una desviación de la panmixia o el incremento de apareamientos consanguíneos, aumentando la frecuencia de los homocigotos dentro de una población, afectando los caracteres cuantitativos.

Povh *et al.* (2008) establecieron la necesidad de monitorear la diversidad genética de las poblaciones nativas y de los lotes mantenidos en cautiverio para la conservación de las especies. La procedencia de la semilla puede ser un factor que afecte de forma, auténticamente, importante al cultivo de los peces y moluscos (Álvarez, 1987). Así mismo, para que la piscicultura sea exitosa se debe alcanzar un control de los aspectos biológicos y genético de los stock (Newkirk, 1980).

CONCLUSIONES

Los RAPD fueron capaces de separar las tres poblaciones de cachama blanca y cachama negra de las estaciones piscícolas de San Fernando de Apure e INIA Papelón de Los Llanos venezolanos, y a su vez confirmar que existe una baja variabilidad genética intrapoblacional en los reproductores cultivados de cachama blanca y cachama negra.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Biotecnología Agrícola del INIA-CENIAP por brindar las facilidades para la realización de este trabajo y al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por aprobar parte del financiamiento de este trabajo a través de los Proyectos de Estímulo a la Investigación (PEI).

LITERATURA CITADA

- Aguiar, J., H. Schneider, F. Gomes, J. Carneiro, S. Santos, L. R. Rodríguez y I. Sampaio. 2013. Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 85 (4): 1439-1447.
- Álvarez, G. 1987. Genética y Acuicultura. Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura. Genética de poblaciones, pp. 2-3.
- Atta, S. y K. Roberto. 2006. Estudio comparativo en dos sistemas de propagación de los progenitores de *Piaractus brachypomus* (Estación acuícola "El Prado" departamento de Santa Cruz). Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Santa Cruz de la Sierra-Bolivia. pp. 34-44.
- Dellaporta, S. J., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21.
- Elorrieta, J. y A. María. 1993. Caracterización y análisis de la variabilidad genética en poblaciones españolas de tenca *Tinca tinca*. Departamento de genética de la Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid-España. 5-10.
- Faddagh, M. S., N.A. Hussain y A. I. Al-Badran. 2012. DNA Fingerprinting of Eight Cyprinid Fish Species of Iraqi Inland Waters Using RAPD-PCR Technique. *Advances in Life Sciences* 2(2): 9-16.
- Falconer, D. S. 1981. Introduction to quantitative genetics. Longman. Londres.
- INAPESCA. 2004. Estadísticas Pesqueras y Acuícolas. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Agricultura y Tierras. Caracas.
- Lande, R. 1980. Genetic variation and phenotypic evolution during allopatric speciation. *Am. Nat.* 116:463-479.
- Lupchinski, Jr., L. Vargas, N. Lopera, R. Ribeiro. J. Povh, E. Gasparino, P. Gomes y G. Braccini. 2011. Caracterización genética de tres líneas de tilapia del nilo (*oreochromis niloticus*). *Brasil. Arch. Zootec.* 60 (232): 985-995.
- Lopes, T., D. Streit, R. Ribeiro, J. Povh, N. Lopera, L. Vargas, C. Pinto y J. Queiroz 2009. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. *Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec.*, V.61. n.3. pp. 728-735.
- Lopera, N., R. Pereira, J. Povh, L. Vargas, C. Bernal y P. Gomes. 2009. Diversidad genética de lotes de *piaractus mesopotamicus* usados en programas de repoblamiento y sus implicaciones en la conservación. *Agrociencia*, vol. 43, México. núm. 3, abril-mayo, pp. 249-256.
- Margalef, D.R. 1958. Information Theory in Ecology. *General Systematics* 3: 36-71.
- Montaño, P. Karla, E. Villalpando y F. Vargas. 2006. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphis) y su aplicación en la acuicultura. *Rev. Cien. Tecn. de América (INTERCIENCIA)*. Caracas-Venezuela. pp. 563-569.
- Newkirk, G. 1980. Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalve. *Aquaculture*, 19:209-228.
- Orozco, G. and J. C. Narváez. 2014. Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena River basin and its tributaries, Colombia. *Genet Mol Biol.* 37(1): 37-45.
- Pineda Santis, H., L. Arboleda, A. Echeverry, M. Olivera, D. Molina, S. Urcuchi J. Builes. 2007. Caracterización de la

- diversidad genética en el pez *Brycon henni* (Characiformes-Characidae) en Colombia central por medio de marcadores RAPD. *Rev. Bio. Trop. Col* Vol. 55 (3-4): Medellín Colombia. pp.1025-1035.
- Poma, C. A., 2004 Variabilidad genética de la *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* en la región del alto maderá (Amazonia Boliviana) para el análisis del polimorfismo de la longitud de secuencias intrónicas (EPIC-PCR). Universidad mayor de San Andrés. La paz-Bolivia. pp. 12-38.
- Povh, J. A., N. M. Lopera, R. P. Ribeiro, Jr. E. Lupchinski, P. C. Gomes y T. S. López. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Rev. Ciencia e Investigación Agraria* Vol. 35. Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual e Maringá. Maringá, Brazil.
- Rocco, I., I. V. Valentino, G. Scapigliati and V. Stingo. 2014. RAPD-PCR analysis for molecular characterization and genotoxic studies of a new marine fish cell line derived from *Dicentrarchus labrax*. *Cytotechnology* Volume 66, Issue 3, pp. 383-393.
- Salem, B. S., N. Capelli, E. Grisey, P. E. Baurand, H. Ayadi and L. Aleya. 2014. First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: The advantage of using the RAPD-PCR technique. *Ecotoxicology and Environmental Safety* Volume 101, pp. 90–96.
- Shannon, C. E. and W. Weaver. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU. 144 p.
- Ward, J. H., Jr. 1963, "Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function", *Journal of the American Statistical Association*, 58, pp. 236–244.
- Williams, J. G, A. R. Kubelik, K. L. Livak, J. A. Rafalski, S. V Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531–6535.