

DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOTES DE *Piaractus mesopotamicus* USADOS EN PROGRAMAS DE REPOBLAMIENTO Y SUS IMPLICACIONES EN LA CONSERVACIÓN

GENETIC DIVERSITY IN *Piaractus mesopotamicus* STOCKS USED IN STOCK ENHANCEMENT PROGRAMS AND IMPLICATIONS FOR CONSERVATION

N. Mauricio Lopera-Barrero^{1*}, Ricardo Pereira-Ribeiro¹, Jayme Aparecido Povh², Lauro Vargas¹,
Carolina Bessalho Jacometo¹, P. Cristina Gomes¹

¹Universidade Estadual de Maringá, Núcleo de Pesquisa PeixeGen. Avenida Colombo 5790, CEP 87020-900. Maringá, Paraná-Brasil. (nelson.peixegen@gmail.com) ²Universidade Federal de Mato Grosso. Rodovia Rondonópolis-Guiringa, Km 06, Mato Grosso-Brasil.

RESUMEN

Modificaciones ambientales derivadas principalmente de acciones humanas han causado la disminución y desaparición de varias poblaciones de peces. Para minimizar este impacto se aplican programas de repoblamiento en varios estados brasileños. Sin embargo, sin la adecuada evaluación estos programas pueden producir cambios genéticos en las poblaciones de peces nativos. Por tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética de lotes de *Piaractus mesopotamicus* usados en programas de repoblamiento, mediante el marcador molecular RAPD. Se analizaron 120 reproductores en cuatro estaciones de piscicultura ubicadas en las ciudades de Sapopema (S), Cornélio Procópio (CP), Cambará (C) y Londrina (L), en el estado del Paraná, Brasil. Los resultados de variabilidad genética determinados usando el porcentaje de fragmentos polimórficos ($S=74.15\%$; $CP=78.80\%$; $C=77.61\%$; $L=92.90\%$) y el índice de diversidad genética de Shannon ($S=0.381$; $CP=0.422$; $C=0.438$; $L=0.522$), mostraron una alta variabilidad genética en todos los lotes. Sin embargo, se encontró una alta similitud genética entre los lotes S, CP y P debido posiblemente al efecto fundador, ya que los lotes se fundaron con reproductores recolectados en el río Paraná. Este resultado se corroboró con los valores de Gst y de flujo génico que mostraron una moderada diferenciación genética y un alto flujo génico. El lote de reproductores de L tuvo una mayor distancia genética con los otros lotes, debido a que se fundó con reproductores recolectados en el río Paranapanema. También se constató que los lotes de reproductores CP y C fueron los más semejantes genéticamente (identidad genética-IG=0.954) y que los lotes S y L presentaron menos genes en común (IG=0.692). El lote L fue el más distante de todos.

Palabras Clave: Genética de la conservación, peces, *Piaractus mesopotamicus*, RAPD, repoblamiento, variabilidad genética.

ABSTRACT

Environmental changes caused principally by human action have provoked reduction and even disappearance of several populations of fish. To minimize this impact stock enhancement programs are being implemented in several Brazilian states. However, without adequate evaluation, these programs can produce genetic changes in populations of native fish. Therefore the objective of this study was to analyze, with the RAPD molecular marker, the genetic diversity of *Piaractus mesopotamicus* stocks used in stock enhancement programs. One hundred twenty broodstocks at four fish farm stations located in the Sapopema (S), Cornélio Procópio (CP), Cambará (C), and Londrina (L) cities, in the Paraná state, Brazil, were analyzed. The results of genetic variability determined using the percentage of polymorphic fragments ($S=74.15\%$; $CP=78.80\%$; $C=77.61\%$; $L=92.90\%$) and the Shannon genetic diversity index ($S=0.381$, $CP=0.422$; $C=0.438$; $L=0.522$) showed high genetic variability in all of the broodstocks. However, high genetic similarity was found between the S, CP, and P stocks possibly due to the founder effect since the stocks were founded with broodstocks collected in the Paraná River. The result was corroborated with Gst values and gene flow, which showed moderate genetic differentiation and high gene flow. The broodstock from L had a greater genetic distance from the other stocks because it was founded with broodstocks collected in the Paranapanema River. It was also confirmed that the broodstocks CP and C were the most genetically similar (genetic identity-GI=0.954) and the S and L broodstocks had less genes in common (GI=0.692). The L stock was the most distant of all the broodstocks.

Key words: Genetics of conservation, fish, *Piaractus mesopotamicus*, RAPD, stock enhancement, genetic variability.

INTRODUCTION

Pollution of rivers, construction of hydroelectric dams, and overfishing have contributed to reduction and even disappearance of many fish species. Among these, the pacu, *Piaractus*

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Octubre, 2007. Aprobado: Enero, 2009

Publicado como ARTÍCULO en Agrobiencia 43: 249-256. 2009.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de los ríos, la construcción de hidroeléctricas y la sobrepesca han contribuido con la reducción y hasta la desaparición de muchas especies de peces. Entre éstas, el pacu, *Piaractus mesopotamicus* (orden Characiformes, familia Characidae, subfamilia Myleinae) conocido como caranha o pacu caranha (Nakatani *et al.*, 2001), es una especie nativa migratoria de las cuencas de los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay (Urbinati y Gonçalves, 2005) y presenta una reducción progresiva de sus poblaciones.

Esta especie tiene alto valor comercial y social y se adapta fácilmente a la cría en ambientes controlados, por lo cual se toman acciones para su conservación. Así, los programas de repoblamiento son cada vez más comunes en el Brasil (Hisldorf *et al.*, 2006) y otros países. Sin embargo, estos programas sin la adecuada evaluación pueden representar una mayor amenaza para los ecosistemas y las poblaciones de peces (Agostinho *et al.*, 2005).

Estudios biológicos y reproductivos asociados a la evaluación genética de las poblaciones naturales y de los lotes en los cultivos de peces usando RAPD, generan valiosa información para tener éxito en la producción y en la conservación de especies acuáticas (Barroso *et al.*, 2005; Sirol y Britto, 2006). Incluso en aquellas en vía de extinción (Lopera-Barrero *et al.*, 2006).

Por tanto, el objetivo del presente estudio fue analizar la diversidad genética de lotes de *P. mesopotamicus* usados en programas de repoblamiento mediante la técnica RAPD. Los resultados contribuirán a orientar los programas de repoblamiento realizados en ríos brasileños para evitar la pérdida de diversidad genética en los lotes de reproductores y en las poblaciones nativas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

En cuatro lotes de reproductores de *P. mesopotamicus* (30 individuos de cada lote) fueron recolectadas muestras de aleta en cultivos de peces ubicados en las ciudades de Sapopema (S), Cornélio Procopio (CP), Cambará (C) y Londrina (L), en el estado del Paraná, Brasil, los cuales se usan en programas de repoblamiento de los ríos Paraná y Paranapanema (Figura 1).

Extracción, cuantificación e integridad del ADN

Para extraer ADN se usó la metodología descrita por Bardakci y Skibinski (1994), modificada por Povh *et al.* (2005). Fragmentos de aleta caudal (aproximadamente 0.5 cm⁻²) preservadas a -20 °C

mesopotamicus (orden Characiformes, familia Characidae, subfamilia Myleinae), locally known as caranha or pacu caranha (Nakatani *et al.*, 2001), is a native migratory species of the basin of the rivers Paraná, Paraguay and Uruguay (Urbinati and Gonçalves, 2005), whose populations are being progressively reduced.

This species is highly valued commercially and socially and adapts easily to rearing in controlled environments. For these reasons, actions are being undertaken to conserve the species. Thus, stock enhancement programs are increasingly common in Brazil (Hisldorf *et al.*, 2006) and other countries. Without adequate evaluation, however, these programs may be a greater threat for the ecosystems and fish populations (Agostinho *et al.*, 2005).

Biological and reproductive studies of natural populations and of stocks bred in hatcheries associated with genetic evaluation using RAPD generate valuable information that can contribute to success in the production and conservation of aquatic species (Barroso *et al.*, 2005; Sirol and Britto, 2006), even those that are in danger of extinction (Lopera-Barrero *et al.*, 2006).

Therefore, the objective of this study was to analyze the genetic diversity of *P. mesopotamicus* broodstocks used in stock enhancement programs, with the RAPD technique. The results will contribute to orienting stock enhancement programs implemented in Brazilian rivers to prevent loss of genetic diversity in the broodstocks and in native populations.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

In four *P. mesopotamicus* broodstocks (30 individuals per stock) samples were collected from fins of fish cultured in hatcheries located in the Sapopema (S), Cornélio Procopio (CP), Cambará (C) and Londrina (L) cities, in the Paraná state, Brazil. These fish are used in stock enhancement programs to the Paraná and Paranapanema Rivers (Figure 1).

DNA extraction, quantification and integrity

For DNA extraction, the methodology described by Bardakci and Skibinski (1994) was used, modified by Povh *et al.* (2005). Fragments of caudal fin (approximately 0.5 cm⁻²) preserved at -20 °C with 100 % ethyl alcohol were placed in microtubes with 550 µL of lysis buffer solution (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 µM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS) and 200 µg mL⁻¹ proteinase K and incubated in a water bath at 50 °C for 12 h. DNA was washed with two extractions with phenol and three with chloroform, precipitated with two and a half times volume cold absolute ethyl alcohol and a tenth volume of sodium acetate, relative to the recovered

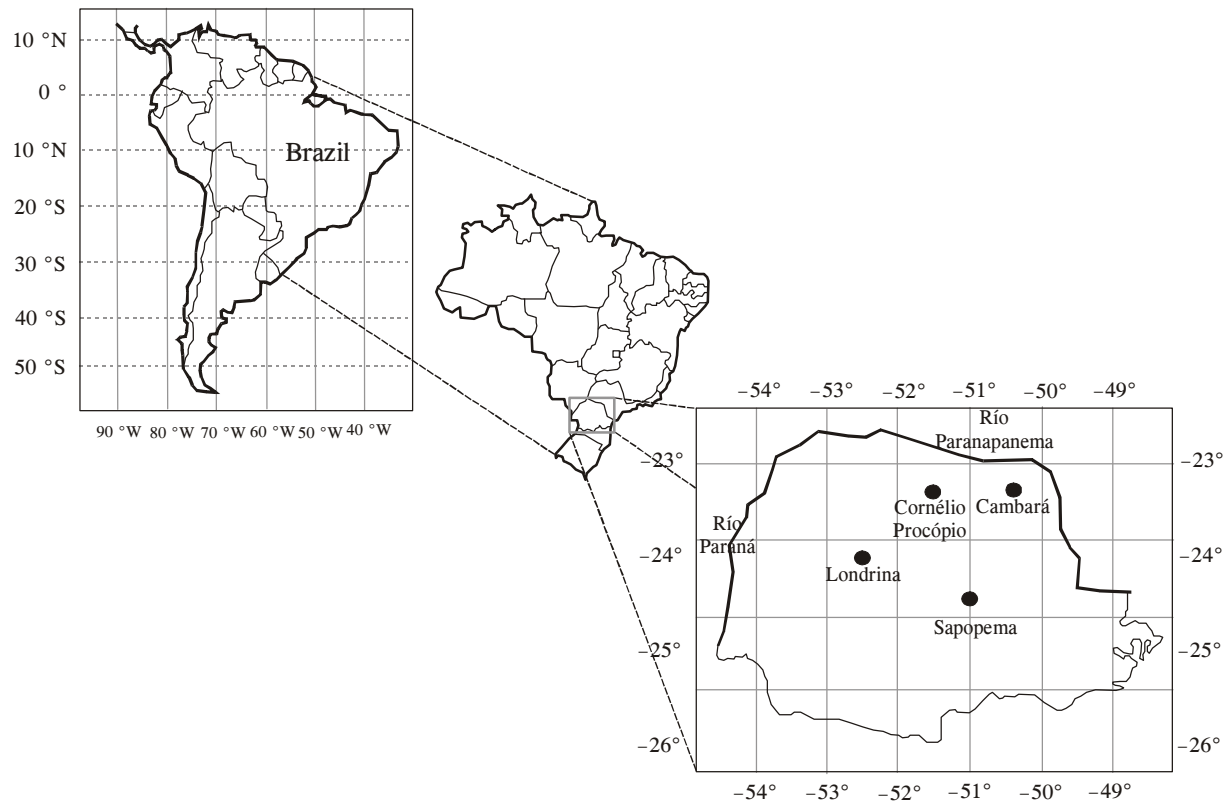


Figura 1. Ubicación de los lotes de reproductores de *P. mesopotamicus* y de los ríos Paraná y Paranapanema en el estado del Paraná, Brasil.

Figure 1. Location of the *P. mesopotamicus* broodstocks and of the Paraná and Paranapanema Rivers in the Paraná state, Brazil.

con alcohol etílico 100 %, se colocaron en micro-tubos con 550 μL de solución amortiguadora de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 μM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS) y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteinasa K, y se incubaron en baño maría a 50 °C por 12 h. El ADN se lavó con dos extracciones con fenol y tres de cloroformo, precipitado con dos veces y media de volumen de alcohol etílico absoluto helado y un décimo de volumen de acetato de sodio en relación al volumen recuperado, y se incubó 2 h a -20 °C. El ADN fue centrifugado, lavado con 2 mL de alcohol etílico 70 %, suspendido en 60 μL de solución amortiguadora TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) y tratado con 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ARNasa. Las muestras se incubaron 40 min en baño maría a 37 °C y conservados a -20 °C.

El ADN fue cuantificado en espectrofotómetro Shimadzu UV 1601 (EE.UU.) (amplitud de onda 260 nm) y diluido en solución amortiguadora TE para una concentración de 10 ng μL^{-1} . La integridad del ADN se verificó en electroforesis horizontal usando un gel de agarosa 1 %, con 3 V cm^{-1} 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 30 min y la imagen fue capturada con el sistema fotográfico EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5, EE.UU.).

volume and was incubated for 2 h at -20 °C. The DNA was centrifuged, washed with 2 mL of 70 % ethyl alcohol, and suspended in 60 μL TE buffer solution (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) and treated with 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of RNase. The samples were incubated 40 min in a water bath at 37 °C and preserved at -20 °C.

DNA was quantified in a Shimadzu UV 1601 spectrophotometer (USA) (wave length 260 nm) and diluted in TE buffer solution to a concentration of 10 ng μL^{-1} . DNA integrity was verified in horizontal electrophoresis using a 1 % agarose gel, with 3 V cm^{-1} for 60 min, in TBE 1X buffer solution (500 mM Tris-HCl, 60 mM boric acid, 83 mM EDTA). The gel was marked with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 30 min and the image was captured with the EDAS photographic system (Kodak 1D Image Analysis 3.5, USA).

Amplification and electrophoresis

The amplification conditions used were as described by Williams *et al.* (1990), with modifications. DNA was amplified in a 25 μL reaction volume, in which Tris-KCl 1X buffer solution (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM) was used with 2 mM MgCl_2 , 100 ng primer, 0.2 mM of each dNTP, 1 U of Taq DNA Polymerase

Amplificación y electroforesis

Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Williams *et al.* (1990), con modificaciones. El ADN se amplificó en un volumen de reacción de 25 μL , en el cual se usó la solución amortiguadora Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM), 2 mM MgCl_2 , 100 ng iniciador, 0.2 mM de cada dNTP, 1 U de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen®, EE.UU.), y 20 ng ADN molde. Las reacciones de RAPD fueron realizadas en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (EE.UU.), programado para 40 ciclos, con un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 4 min y un paso final de extensión a 72 °C por 5 min. Cada ciclo consistió de 1 min a 94 °C, 90 s a 40 °C y 2 min a 72 °C.

Se evaluaron 60 iniciadores del Kit Operon (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, EE.UU.). Para evaluar los lotes se seleccionaron aquellos iniciadores con buenas características reproducibles y de nitidez. Los productos de amplificación se separaron en gel de agarosa 1.5 %. En electroforesis horizontal se usaron 20 μL del producto amplificado y 2 μL de solución amortiguadora de muestra (40 % sacarosa, 0.25 % azul de bromofenol). La electroforesis se realizó con 3 V cm^{-1} por 4 h usando solución amortiguadora TBE 1X. Para verificar la existencia de contaminación se usó un testigo negativo para cada reacción, donde para su amplificación se adicionaron todos los componentes citados, excepto el ADN. Para la revelación del gel se usó un baño en solución de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de bromuro de etidio por 30 min y cada gel fue fotografiado con el sistema fotográfico EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5, EE.UU.).

Análisis estadístico

El tamaño de los fragmentos se determinó por comparación con un ADN Ladder de 100 pb (15 bandas con tamaño entre 100 y 2072 pb - Invitrogen®, EE.UU.). La presencia o ausencia de fragmentos de tamaños moleculares idénticos se usó para construir una matriz de similitud con base en el cálculo del coeficiente de similitud de Jaccard, codificando 1 como presencia de fragmento y 0 su ausencia.

La variabilidad genética se determinó por el porcentaje de fragmentos polimórficos y por el índice de diversidad genética de Shannon. La diferenciación genética entre los lotes se determinó por el cálculo de Nei (1973)(Gst), donde la significancia estadística del Gst fue calculada con la prueba χ^2 . El nivel de diferenciación se usó mediante la definición propuesta por Wright (1978), donde valores entre 0.00 a 0.05; 0.05 a 0.15; 0.15 a 0.25 y > 0.25 indican pequeña, moderada, alta y elevada diferenciación genética. Estos análisis estadísticos junto con la determinación del flujo génico por medio del número de emigrantes por generación (Nm) y de la distancia e identidad genética entre los lotes se determinaron mediante el programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). La distancia genética basada en Nei (1972) y el método de agrupamiento UPGMA se usaron para elaborar un dendrograma, usando el programa estadístico NTSYS 1.7 (Rohlf, 1989).

(Invitrogen®, USA), and 20 ng mold DNA. The RAPD reactions were done in an Eppendorf Mastercycler® Gradient (USA) programmed for 40 cycles with an initial denaturalization step at 94 °C for 4 min and a final extension step at 72 °C for 5 min. Each cycle consisted of 1 min at 94 °C, 90 s at 40 °C and 2 min at 72 °C.

Sixty primers from the Operon Kit (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA, USA) were evaluated. To evaluate the stocks, those primers with good reproducible characteristics and clarity were selected. The amplified products were separated in 1.5 % agarose gel. In horizontal electrophoresis 20 μL of the amplified product and 2 μL of the sample buffer solution (40 % sucrose, 0.25 % bromophenol blue) were used. Electrophoresis was performed with 3 V cm^{-1} for 4 h using TBE 1X buffer solution. To test for contamination, a negative control was used for each reaction, in which all of the mentioned components, except DNA, were added for amplification. For gel development, a bath was used with a solution of 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ethidium bromide for 30 min, and each gel was photographed with the EDAS photographic system (Kodak 1D Image Analysis 3.5, USA).

Statistical analysis

Size of the fragments was determined by comparison with a 100 pb DNA Ladder (15 bands 100 to 2072 pb in size - Invitrogen®, USA). The presence or absence of identical molecular-sized fragments was used to construct a similarity matrix based on the calculation of the Jaccard similarity coefficient, codifying 1 if a fragment was present and 0 if absent.

Genetic variability was determined by the percentage of polymorphic fragments and by the Shannon genetic diversity index. Genetic differentiation among broodstocks was determined by the Nei (1973) calculation (Gst), in which Gst statistical significance was calculated with the χ^2 test. The level of differentiation was determined by means of the definition proposed by Wright (1978), in which values between 0.00 and 0.05, 0.05 and 0.15, 0.15 and 0.25, and > 0.25 indicate small, moderate, high and elevated genetic differentiation. These statistical analyses, together with the determination of gene flow using the number of emigrants per generation (Nm) and genetic distance and identity among the stocks, were determined using the PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) software. Genetic distance based on Nei (1972) and the UPGMA cluster method were used to construct a dendrogram with the NTSYS 1.7 statistical software (Rohlf, 1989).

RESULTS AND DISCUSSION

Amplification of the *P. mesopotamicus* samples with 10 selected primers (OPA01, OPA02, OPA03, OPA05, OPA06, OPW01, OPW02, OPW03, OPW19, and OPX01), using the RAPD molecular maker, produced 67 polymorphic fragments with sizes between 200 pb (obtained with the amplification of the primer OPA06) and 1500 pb (obtained with the amplification of the primers OPW01 and OPW19). The fragments varied

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La amplificación de las muestras de *P. mesopotamicus* con los 10 iniciadores seleccionados (OPA01, OPA02, OPA03, OPA05, OPA06, OPW01, OPW02, OPW03, OPW19 y OPX01), utilizando el marcador molecular RAPD, produjo 67 fragmentos polimórficos con tamaño entre 200 pb (obtenido con la amplificación del iniciador OPA06) y 1500 pb (obtenidos con la amplificación de los iniciadores OPW01 y OPW19). Los fragmentos variaron de cuatro (iniciadores OPA01 y OPA03) a 15 (iniciador OPW19).

Los resultados de variabilidad genética, calculados por el porcentaje de fragmentos polimórficos y por el índice de diversidad genética de Shannon para los lotes de reproductores de las ciudades de Sapopema (S), Cornélio Procópio (CP), Cambará (C) y Londrina (L), mostraron una alta variabilidad genética en todos los lotes analizados, debido posiblemente a su correcto manejo reproductivo. Esto, según Moreira *et al.* (2007), resulta en la preservación de la diferenciación genética entre los reproductores. Sin embargo, se encontró una variabilidad genética semejante entre S, CP y C debido posiblemente al efecto fundador (diversidad genética con la cual los lotes de reproductores se formaron), ya que los lotes se formaron a partir de reproductores de poblaciones nativas recolectados en el río Paraná (Figuras 2 y 3).

Este resultado se corroboró con la moderada diferenciación genética encontrada entre ellos y por el alto valor de flujo génico que demuestra un alto número de emigrantes entre los lotes (Cuadro 1). Esta situación es común en poblaciones nativas de peces como fue verificado por Leuzzi *et al.* (2004), quienes analizaron

from four (primers OPA01 and OPA03) to 15 (primer OPW19).

The results for genetic variability, calculated by percentage of polymorphic fragments and by the Shannon genetic diversity index for the broodstocks from the cities of Sapopema (S), Cornélio Procópio (CP), Cambará (C), and Londrina (L) exhibited high genetic variability in all of the stocks analyzed, possibly due to correct reproductive management. This, according to Moreira *et al.* (2007), results in the conservation of genetic differentiation among the broodstocks. However, similar genetic variability was found among S, CP, and C, possibly due to the founder effect (genetic diversity with which the broodstocks were formed) since the broodstocks were formed from reproducers from native populations collected in the Paraná River (Figures 2 and 3).

This result was corroborated with the moderate genetic differentiation found among them and by the high value of gene flow indicating a high number of emigrants among the broodstocks (Table 1). This situation is common in native populations of fish, as was confirmed by Leuzzi *et al.* (2004), who analyzed population of *Astyanax altiparanae* from two reservoirs of the Paranapanema River and found gene flow among populations that were separated geographically.

Analyzing the broodstock from L, high genetic variability, relative to the other broodstocks, was determined. This result can be attributed to the fact that this broodstock was formed from natural populations collected in the Paranapanema River with geographic and management differentiation.

The analysis of genetic identity (GI) and genetic distance (GD) values (Table 2) indicates that the broodstocks from CP and C were the most similar

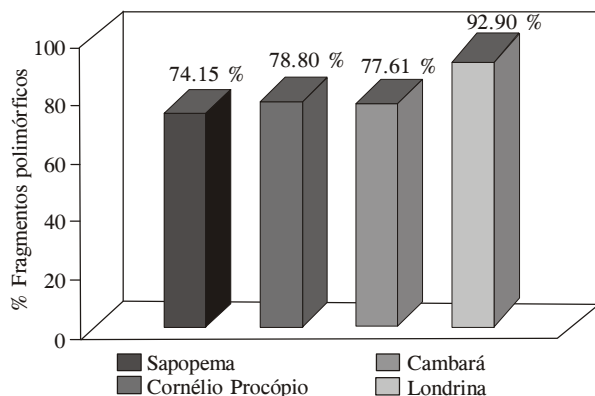


Figura 2. Porcentaje de fragmentos polimórficos obtenidos para los lotes de reproductores de *P. mesopotamicus* del Paraná, Brasil.

Figure 2. Percentage of polymorphic fragments obtained for the *P. mesopotamicus* broodstocks from Paraná, Brazil.

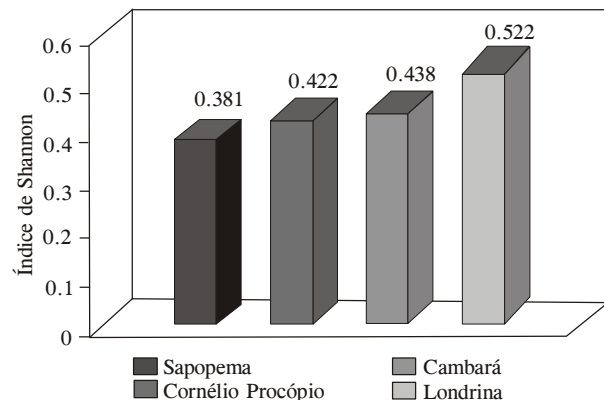


Figura 3. Índice de diversidad genética de Shannon obtenido para los lotes de reproductores de *P. mesopotamicus* del Paraná, Brasil.

Figure 3. Shannon genetic diversity index obtained for the *P. mesopotamicus* broodstocks from Paraná, Brazil.

poblaciones de *Astyanax altiparanae* de dos reservorios del río Paranapanema y encontraron flujo génico entre poblaciones separadas geográficamente.

Al analizar el lote de reproductores de L se comprobó una alta variabilidad genética en comparación con los otros. Este resultado se puede atribuir a que este lote se formó con reproductores de poblaciones naturales recolectados en el río Paranapanema, existiendo una diferenciación geográfica y de manejo.

El análisis de los valores (Cuadro 2) de identidad genética (IG) y de distancia genética (DG) indica que los lotes de reproductores CP y C fueron los más semejantes genéticamente (IG=0.954) y que los lotes S y L fueron los más divergentes (IG=0.692). El lote L fue el más distante. Estos resultados coincidieron con el dendrograma, el cual mostró la formación de dos agrupamientos: uno compuesto por los lotes S, CP y C y otro formado sólo con los individuos del lote L (Figura 4).

Las especies de importancia comercial y especialmente aquellas amenazadas de extinción como el *P. mesopotamicus*, requieren una constante evaluación genética de los lotes mantenidos en los cultivos de peces y en sus poblaciones nativas. El análisis genético de lotes de cultivo es información importante para la producción y la conservación de peces (Sirol y Britto, 2006). Una pérdida de variabilidad genética por errores en la formación de lotes o por el inadecuado manejo reproductivo puede inducir a problemas de endogamia (Ortega-Villaizán Romo *et al.*, 2006), adaptabilidad y supervivencia de progenies usadas en programas de repoblamiento (Frost *et al.*, 2006).

Por tanto, los lotes de reproductores usados en cultivos de peces y en programas de repoblamiento, como los analizados en este estudio, deben ser iniciados con un gran número de individuos cuidadosamente seleccionados (Aho *et al.*, 2006). La correcta elección de los reproductores que serán usados en la formación del lote de cultivo de peces y su evaluación genética

genéticamente (GI=0.954) and the S and L broodstocks were the most divergent (GI=0.692). The L broodstock was the most distant. These results coincide with the dendrogram, which showed the formation of two clusters: one comprising the S, CP and C broodstocks, and the other with only the individuals from the L broodstock (Figure 4).

Important commercial species and especially those that are in danger of extinction such as *P. mesopotamicus*, require constant genetic evaluation of the broodstocks kept in hatcheries and in their native populations. Genetic analysis of cultivated stock is important information for the production and conservation of fish (Sirol and Britto, 2006). Loss of genetic variability because of errors in the formation of broodstocks or because of inadequate reproductive management can induce problems stemming from endogamy (Ortega-Villaizán Romo *et al.* 2006), adaptability and survival of offspring used in stock enhancement programs (Frost *et al.*, 2006).

Therefore, the broodstock used in fish cultivation and stock enhancement programs, as analyzed in this study, should begin with a large number of carefully selected individuals (Aho *et al.*, 2006). The correct election of the reproducers to be used in the formation of broodstock in the cultivation of fish and their genetic evaluation can offer important bases for formulating reproductive management strategies (Sønstebo *et al.*, 2007). These strategies will permit safe exchange of broodstocks among fish farms stations to break up cycles of endogamy that are common in controlled environments (Moreira *et al.*, 2007) and can define the conservation of a species and its future biological potential (Melo *et al.*, 2006).

With this evidence and the results of genetic variability, distance and identity, it is possible to suggest that reproductive and genetic management and improvement of the *P. mesopotamicus* broodstocks of the Sapopema, Cornélio Procópio and Cambará region be homogeneous and not in separate stocks, especially when the objective is to conserve native populations of

Cuadro 1. Diferenciación genética (Gst), clasificación de Wright (1978) y número de emigrantes por generación en los lotes de *P. mesopotamicus* del Paraná, Brasil.

Table 1. Genetic differentiation (Gst), Wright (1978) classification, and number of emigrants per generation in *P. mesopotamicus* broodstocks from Paraná, Brazil.

Lotes	Gst	Wright (1978)	Nm
S × CP	0.124 [†]	Moderada	2.07
S × C	0.097 [†]	Moderada	2.98
S × L	0.315 [†]	Elevada	1.08
CP × C	0.140 [†]	Moderada	2.24
CP × L	0.194 [†]	Alta	1.58
C × L	0.224 [†]	Alta	1.43

[†] Valores significativos (p≤0.01).

Cuadro 2. Identidad genética (encima de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal) en los lotes de *P. mesopotamicus* del Paraná, Brasil.

Table 2. Genetic identity (above the diagonal) and genetic distance (below the diagonal) in *P. mesopotamicus* broodstocks from Paraná, Brazil.

Lotes	S	CP	C	L
S	***	0.881	0.873	0.692
CP	0.129	***	0.954	0.715
C	0.143	0.058	***	0.702
L	0.322	0.296	0.388	***

pueden ofrecer bases importantes para formular estrategias de manejo reproductivo (Sønstebo *et al.*, 2007). Estas estrategias permitirán un intercambio seguro de reproductores entre las estaciones piscícolas, para fragmentar ciclos de endogamia comunes en ambientes controlados (Moreira *et al.*, 2007) y que pueden definir la conservación de una especie y su futuro potencial biológico (Melo *et al.*, 2006).

Con estas evidencias y los resultados de variabilidad, distancia e identidad genética, se puede sugerir que el manejo reproductivo, genético y de mejoramiento de los lotes de *P. mesopotamicus* de la región de Sapopema, Cornélio Procópio y Cambará, debe ser homogéneo y no en lotes separados, especialmente cuando el objetivo sea conservar poblaciones nativas de esta especie mediante el repoblamiento. Además, para mantener la variabilidad genética de esos lotes es necesario introducir nuevo material genético (reproductores). Estos pueden ser recolectados de poblaciones nativas genéticamente diferentes o directamente del lote de Londrina y sus progenies, ya que éste fue divergente de ellos, pudiendo contribuir con un acervo genético que permita preservar la variabilidad genética. Es importante destacar que la introducción e intercambio de reproductores se debe realizar con base en análisis genéticos, ya que es posible crear una depresión exogámica cuya consecuencia es la disminución de la variabilidad genética.

Un factor importante en los programas de repoblamiento es que el cruzamiento de individuos genéticamente distintos a aquellos encontrados en una población nativa puede promover la pérdida de genes importantes de adaptabilidad al ambiente (Sønstebo *et al.*, 2007), que puede influenciar la supervivencia de progenies (Leuzzi *et al.*, 2004). Por esta razón, la evaluación en todos los periodos del año de los lotes de reproductores usados en programas de repoblamiento, de sus progenies liberadas en los ríos y de las poblaciones nativas (Machado-Schiaffino *et al.*, 2007), es importante para verificar la eficacia de esos programas y los posibles efectos en el ecosistema.

El aumento del número efectivo de reproductores (Freitas y Galetti Jr, 2005), la formación y manejo de diferentes lotes (de diferentes orígenes) y el eficiente manejo reproductivo (selección de reproductores, formación de cruzamientos, selección de sistemas reproductivos) (Porta *et al.*, 2006) son otros factores que permitirán un correcto y exitoso desarrollo de la piscicultura y de la conservación de las especies de valor zootécnico y de aquellas amenazadas de extinción, como es el *P. mesopotamicus*.

Con los resultados de este estudio fue posible obtener un perfil de los lotes de reproductores de estos cultivos de peces, su caracterización genética y la objetiva orientación genética y reproductiva que permitirá un

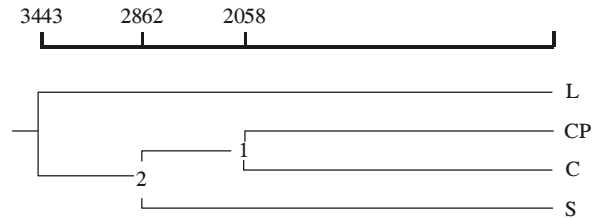


Figura 4. Dendrograma basado en la distancia genética de Nei (1972), obtenido por el método UPGMA para los lotes de reproductores de *P. mesopotamicus* del Paraná, Brasil.

Figure 4. Dendrogram based on the Nei (1972) genetic distance, obtained with UPGMA for *P. mesopotamicus* broodstocks from Paraná, Brazil.

this species through stock enhancement. Also, to maintain genetic variability of these broodstocks, it is necessary to introduce new genetic material (reproducers). These can be collected from genetically different native populations or directly from the Londrina broodstock and their offspring since this was divergent stock that could contribute to preserving genetic variability. It is important to high light that the introduction or exchange of broodstoks should be done based on genetic analyses since it is possible to create an exogamic depression whose consequence is a reduction in genetic variability.

An important factor in stock enhancement programs is that crossing individuals genetically distant from those found in a native population can promote loss of genes that are important for adaptability to the environment (Sønstebo *et al.*, 2007) and may affect survival of the offspring (Leuzzi *et al.*, 2004). For this reason, year-round evaluation of broodstocks used in stock enhancement programs, of their offspring released in rivers, and of native populations (Machado-Schiaffino *et al.*, 2007) is important to monitor the effectiveness of these programs and the possible effects on the ecosystem.

The increase in the effective number of reproducers (Freitas and Galetti Jr., 2005), the formation and management of different stocks (from different origins), and the efficient reproductive management (selection of reproducers, crosses, selection of reproductive systems) (Porta *et al.*, 2006) are other factors that will allow correct and successful development of fish cultivation and conservation of species of commercial value and of those threatened by extinction, such as *P. mesopotamicus*.

With the results of this study, it was possible to obtain a profile of the broodstocks of these fish hatcheries, their genetic characterization and the objective genetic and reproductive orientation that will

correcto manejo de la producción y de la conservación del *P. mesopotamicus* utilizando programas de repoblamiento. Para eso, el marcador molecular RAPD fue eficaz y ofreció resultados.

CONCLUSIONES

Se encontró una alta variabilidad genética en todos los lotes. Sin embargo, hubo una alta semejanza genética entre los lotes de reproductores de Sapopema, Cornélio Procópio y Cambará debido a que los lotes se formaron con reproductores recolectados sólo en el río Paraná (efecto fundador). El lote de Londrina fue diferente de los otros porque se formó con poblaciones nativas del río Paranapanema.

LITERATURA CITADA

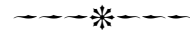
- Agostinho, A. A., S. M. Thomaz, and L. C. Gomes. 2005. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conserv. Biol.* 19: 646-652.
- Aho, T., J. Rönn, J. Piironen, and M. Björklund. 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture* 253: 244-248.
- Bardacki, F., and D. O. F. Skibinski. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73: 117-123.
- Barroso, R. M., A. W. S. Hilsdorf, H. L. M. Moreira, P. H. Cabello, and Y. M. Traub-Cseko. 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture* 247: 51-65.
- Freitas, P. D., and P. M. Galetti Jr. 2005. Assessment of the genetic diversity in five generations of commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 1362-1367.
- Frost, L. A., B. S. Evans, and D. R. Jerry. 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261: 1056-1064.
- 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. Embrapa Pantanal. Documentos 82. Corumbá. 43 p.
- Leuzzi, M. S. P., F. S. Almeida, M. L. Orsi, and L. M. K. Sodr . 2004. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 27: 355-362.
- Lopera-Barrera, N. M., R. P. Ribeiro, R. N. Sirol, J. A. Povh, P. C. Gomes, L. Vargas, and D. P. Streit Jr. 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers. In: Annual Meeting of American Dairy Science Association and American Society of Animal Science. Minneapolis, USA. pp: 170.
- Machado-Schiaffino, G., E. Dopico, and E. Garcia-Vazquez. 2007. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. *Aquaculture* 264: 59-65.
- Melo, D. C., D. A. A. Oliveira, L. P. Ribeiro, C. S. Teixeira, A. B. Souza, E. G. A. Coelho, D. V. Crepaldi, e E. A. Teixeira. 2006. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58: 87-93.
- Moreira, A. A., A. W. S. Hilsdorf, J. V. Silva, e V. R. Souza. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de til pia nil tica por meio de marcadores microssat lites. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 42: 521-526.

permit appropriate management of the production and conservation of *P. mesopotamicus* using stock enhancement programs. For this, the RAPD molecular marker was effective and produced good results.

CONCLUSIONS

High genetic variability was found in all of the broodstocks. However, there was close genetic similarity among the broodstocks of Sapopema, Cornélio Procópio and Cambará since these stocks were formed from reproducers collected only in the Paraná River (founder effect). The Londrina broodstock was different from the others because it was formed from native populations of the Paranapanema River.

End of the English version—



- Nakatani, K., A. A. Agostinho, G. Baumgartner, A. Bialecki, P. V. Sanches, M. C. Makrakis, e C. S. Pavanelli. 2001. Ovos e Larvas de Peixes de  gua Doce. EDUEM. Maringá. 378 p.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 3321-3323.
- Ortega-Villaizán Romo, M. M., M. Aritaki, and N. Taniguchi. 2006. Pedigree analysis of recaptured fish in the stock enhancement program of spotted halibut *Verasper variegates*. *Fish. Sci.* 72: 48-52.
- 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: 46-55.
- Povh J. A., H. L. M. Moreira, R. P. Ribeiro, A. P. Prioli, L. Vargas, D. V. Blanck, E. Gasparino, e D. P. Streit Jr. 2005. Estimativa da variabilidade genética em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Sci. An. Sci.* 27: 1-10.
- Rohlf, F. J. 1989. *NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Exeter Publishers. New York. USA. 191 p.
- Sirol, R. N., e S. G. Britto. 2006. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: Nogueira M.G., R. Henry, and A. Jorcin. (eds). *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascatas*. RiMA. São Carlos. Brasil. pp: 275-284.
- S nsteb , J. H., R. Borgstr m, 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: 33-44.
- Urbinati, E. C., e F. D. Gonçalves. 2005. *Pacu (Piaractus mesopotamicus)*. In: Baldisserotto, B., e L.C. Gomes (eds). *Esp cies Nativas para Piscicultura no Brasil*. UFMS. Santa Maria. Brasil. pp: 225-246.
- Williams, J. G. K., J. A. Rafalski, A. R. Kubelik, K. J. Livak, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wright, S. 1978. *Evolution and Genetics of Population*. University of Chicago Press. Chicago. USA. 580 p.
- Yeh, F. C., T. Y. Z. Boyle, and J. M. Xian. 1999. PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, USA. 29 p.