

DIVERSIDAD GENÉTICA Y CONTRIBUCIÓN REPRODUCTIVA DE UNA PROGENIE DE *Brycon orbignyianus* EN EL SISTEMA REPRODUCTIVO SEMINATURAL, USANDO MARCADORES MICROSATÉLITES

GENETIC DIVERSITY AND REPRODUCTIVE CONTRIBUTION OF *Brycon orbignyianus* OFFSPRING IN THE SEMI-NATURAL REPRODUCTIVE SYSTEM, USING MICROSATELLITES MARKERS

N. Mauricio **Lopera-Barrero**¹, Lauro **Vargas**¹, Rodolfo **Nardez-Sirol**², Ricardo **Pereira-Ribeiro**¹,
Jayme **Aparecido-Povh**¹, D. Pedro **Streit Jr**¹, Patrícia **Cristina-Gomes**¹

¹Universidade Estadual de Maringá, Grupo de Pesquisa Peixegen. Av. Colombo 5790, CEP 87020-900. Maringá, Paraná-Brasil. (nelson.peixegen@gmail.com), (lvargas@uem.br), (rpribeiro@uem.br), (jayme.peixegen@gmail.com), (danilo.streit@ufrgs.br), (patricia.peixegen@gmail.com). ²Duke Energy International, Geração Paranapanema S.A. Diretoria de Meio Ambiente, Saúde e Segurança. Rodovia Chavantes-Ribeirão Claro, Km 10, CEP 18970-000, Chavantes - SP, Brasil. (rnsirol@duke-energy.com).

RESUMEN

La conservación de la variabilidad genética es prioritaria en lotes de peces usados en programas de repoblación de ríos, especialmente para especies amenazadas o en peligro de extinción como es el caso del *Brycon orbignyianus*. El objetivo del presente estudio fue estimar la diversidad genética y la contribución reproductiva de una progenie de *B. orbignyianus* usada en programas de repoblación, en un sistema reproductivo seminatural usando marcadores microsatélites. Se analizaron muestras de aleta caudal de 24 reproductores (12♂ y 12♀) y 95 larvas de su progenie. Reproductores y progenie mostraron dos alelos, ausencia de alelos de baja frecuencia y una heterocigosis media de 0.470 y 0.510. El coeficiente F_{is} mostró que hubo ausencia de endogamia en los reproductores y progenie (-0.116 y -0.242) y no hubo diferencias ($p > 0.01$) en el equilibrio de Hardy-Weinberg. De acuerdo con el análisis de varianza molecular (AMOVA), la mayor parte de la variación observada estuvo dentro de cada grupo y no entre los grupos, corroborado por el valor de índice de Shannon (reproductores = 0.477; progenie = 0.491). La diversidad genética en la progenie fue preservada y se verificó la presencia de paternidad múltiple y dominancia reproductiva en 50 % de la progenie mediante la utilización del sistema reproductivo seminatural.

Palabras clave: *Brycon orbignyianus*, conservación, manejo reproductivo, microsatélite, paternidad, programas de repoblación.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Marzo, 2008. Aprobado: Enero, 2010.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 171-181. 2010.

ABSTRACT

The conservation of genetic variability is a priority for fish lots used in restocking programs in rivers, especially for threatened or endangered fish species as is the case of *Brycon orbignyianus*. The objective of this study was to estimate the genetic diversity and reproductive contribution of an offspring of *B. orbignyianus* used in stock programs in a semi-natural reproductive system using microsatellite markers. Samples of caudal fin from 24 breeders (12♂ and 12♀), and 95 larvae of their offspring. Breeders and offspring showed two alleles, absence of low frequency alleles and an average heterozygosity of 0.470 and 0.510. The coefficient F_{is} showed that there was no inbreeding in breeders and offspring (-0.116 and -0.242) and there were no differences ($p > 0.01$) in the Hardy-Weinberg equilibrium. According to the analysis of molecular variance (AMOVA), most of the variation observed was within each group and not among groups, being confirmed by the Shannon index value (breeders = 0.477; offspring = 0.491). The genetic diversity in the offspring was preserved and the presence of multiple paternity and reproductive dominance was verified in 50 % of the offspring through the use of the semi-natural reproductive system.

Key words: *Brycon orbignyianus*, conservation, reproductive management, microsatellite, paternity, stock programs.

INTRODUCTION

Deforestation of the riverbanks, the construction of hydroelectric dams and irrigation canals for agricultural

INTRODUCCIÓN

La deforestación en los márgenes de los ríos, la construcción de represas hidroeléctricas y canales de riego para producción agrícola (Hatanaka *et al.*, 2006), así como la contaminación del agua y la falta de conocimiento taxonómico (Agostinho *et al.*, 2005) han llevado a la desaparición de varias especies de peces. *Brycon orbignyanus*, conocido en Brasil como piracanjuba o bracanjuba (Orden Characiformes, familia Characidae, subfamilia Bryconinae), es una especie migratoria nativa de las cuencas formadas por los ríos Uruguay (Zaniboni-Filho y Schulz, 2003) y Paraná (Ganeco *et al.*, 2001). Sus poblaciones naturales se han reducido en respuesta a modificaciones ambientales generadas por cambios climáticos y principalmente por acciones humanas (Zaniboni-Filho *et al.*, 2006), siendo catalogada como especie en peligro de extinción (Machado, 2005). La repoblación es una práctica cada vez más común (Hilsdorf *et al.*, 2006) para reducir dichos impactos desde hace unas tres décadas en el Brasil, pero sin respaldo científico (Agostinho *et al.*, 2005). Por tanto, los estudios genéticos y reproductivos son necesarios para orientar esos programas (Lopera Barrero *et al.*, 2009).

El monitoreo genético y reproductivo en lotes de piscicultura es importante para aumentar la producción y conservación de peces (Feng *et al.*, 2007), ya que la disminución de la variabilidad genética por un inadecuado manejo genético (Frost *et al.*, 2006) y reproductivo (Porta *et al.*, 2006) puede traer problemas de endogamia, adaptabilidad y supervivencia de progenies usadas en programas de repoblación. Esos problemas pueden afectar las poblaciones naturales de peces (Sønstebo *et al.*, 2007) y el ecosistema en general. Para este monitoreo se usan marcadores microsatélites con éxito (Machado-Schiaffino *et al.*, 2007).

El objetivo del presente estudio fue estimar la diversidad genética y la contribución reproductiva de una progenie de *B. orbignyanus* usada en programas de repoblación de el río Paranapanema, en un sistema reproductivo seminatural, utilizando marcadores microsatélites.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron 24 reproductores (12♂ y 12♀) de *B. orbignyanus* seleccionados de un lote de 136 individuos, mantenidos en cautiverio

production (Hatanaka *et al.*, 2006), as well as water contamination and the lack of taxonomic knowledge (Agostinho *et al.*, 2005) have led to the disappearance of various fish species. *Brycon orbignyanus*, known in Brazil as piracanjuba or bracanjuba (Characiformes order, Characidae family, Bryconinae subfamily) is a migratory species native to basins formed by the rivers Uruguay (Zaniboni-Filho and Schulz, 2003) and Paraná (Ganeco *et al.*, 2001). Its natural populations have been reduced in response to environmental changes, generated by climate disturbance and mainly by human activity (Zaniboni-Filho *et al.*, 2006); therefore, *B. orbignyanus* has been listed as an endangered species (Machado, 2005). Restocking is an increasingly common practice (Hilsdorf *et al.*, 2006) to reduce those impacts since about three decades ago in Brazil, but without scientific support (Agostinho *et al.*, 2005). Therefore, genetic and reproductive studies are necessary to guide such programmes (Lopera Barrero *et al.*, 2009).

The reproductive and genetic monitoring of fish farming batches is important to increase the production and preservation of (Feng *et al.*, 2007), since the decreased variability due to inadequate genetic (Frost *et al.*, 2006) and reproductive manipulation (Porta *et al.*, 2006) can bring problems of inbreeding, adaptability and survival of the offspring used in restocking programmes. These problems can affect natural populations of fish (Sønstebo *et al.*, 2007) and the ecosystem in general. For this monitoring microsatellite markers are successfully used (Machado-Schiaffino *et al.*, 2007).

The aim of this study was to estimate the genetic diversity and reproductive contribution of an offspring of *B. orbignyanus* used in restocking programmes of the river Paranapanema, in a semi-natural reproductive system, using microsatellite markers.

MATERIALS AND METHODS

We used 24 breeders (12♂ and 12♀) of *B. orbignyanus* selected from a batch of 136 individuals, held in captivity for six years at the Aquaculture and Water Station facilities of the Duke Energy International, Geração Paranapanema, Salto Grande city, SP (49° 59' 13" W and 22° 53' 32" S), Brazil. These individuals come from the first generation from a batch of a fish farm, Castilho city, SP (52° 27' 24" W and 22° 11' 31" S) (Figure 1).

por seis años en las instalaciones de la Estación de Acuicultura e Hidrología de la Duke Energy International, Geração Paranapanema, ciudad de Salto Grande, SP (49° 59' 13" O y 22° 53' 32" S), Brasil. Estos individuos provienen de la primera generación de un lote de una piscicultura en la ciudad de Castilho, SP (52° 27' 24" O y 22° 11' 31" S) (Figura 1).

El experimento se realizó en noviembre de 2006 en la Estación de Acuicultura de la Duke Energy International. Los peces fueron inducidos a reproducción con extracto de hipófisis de carpa. Las hembras recibieron 5.5 mg kg⁻¹ en dos aplicaciones: 10 % en la primera aplicación y 90 % 12 h después. Los machos recibieron 2.5 mg kg⁻¹ en dosis única. Los reproductores se colocaron en un tanque circular (5.1 m radio; 1.85 m profundidad) y abastecido por un flujo continuo de agua (131 L s⁻¹). Un tubo en la parte central del tanque permitió enviar los huevos a una estación recolectora. Los huevos fueron vertidos en una incubadora cilindro-cónica (200 L) con flujo continuo de agua (7 L s⁻¹).

Aproximadamente 6 h después de la última inducción (160 horas-grado, 27 °C) se inició la recolección de huevos con un período máximo de 6 h; los huevos se retiraron cada hora y fueron conducidos hacia incubadoras cilindro-cónicas. Después de las 6 h se verificó por presión abdominal si los machos y hembras desovaron completamente. Una muestra de 0.5 cm² de la aleta caudal se tomó de cada pez y las muestras se colocaron en micro-tubos de 1.5 mL conteniendo etanol para la extracción del ADN. La mortalidad (%) de los reproductores se determinó 1 d después de la reproducción.

Tres días después de la eclosión de los huevos, aproximadamente 200 larvas se recolectaron aleatoria y manualmente (20 larvas de cada incubadora), y se colocaron en micro-tubos de 1.5 mL conteniendo etanol. Para extraer ADN se recolectaron 95 larvas, de acuerdo con Lopera Barrero *et al.* (2008). En los micro tubos se adicionaron 550 mL de solución amortiguadora (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS) y 200 mg mL⁻¹ de proteinasa K. Las muestras se incubaron en baño maría (50 °C) por 12 h. El ADN se precipitó con 600 mL de solución de NaCl (5M) y se centrifugó 10 min a 12000 rpm. El ADN se transfirió a micro tubos vacíos, se precipitó con 700 mL de etanol y se incubó por 1 h a -20 °C. Enseguida se lavó con 700 mL de etanol 70 %, se suspendió en TE amortiguador TE - 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA (80 mL para aleta y 35 mL para larva), y se trató con 30 mg mL⁻¹ de ARNasa. Las muestras se incubaron en baño maría a 37 °C por 60 min y se conservaron a -20 °C.

El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro UV 1601 (Shimadzu, EE.UU.) y se diluyó a 10 ng μL⁻¹ (aletas) y 5 ng μL⁻¹ (larvas). La integridad del ADN se verificó en electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1 %, a 70 V por 60 min usando una solución amortiguadora TBE 1X (500 mM Tris-HCl,

The experiment was conducted at the Aquaculture Station of Duke Energy International in November 2006. Fish were induced to reproduction by using carp pituitary extract. The females received 5.5 mg kg⁻¹ in two applications: 10 % in the first application and 90 % 12 h later. Males were given a 2.5 mg kg⁻¹ dose. Breeders were placed in a circular tank (5.1 m radius; 1.85 m depth) supplied with a continuous water flow (131 L s⁻¹). A tube in the central part of the tank allowed routing the eggs to a collecting station. Then eggs were poured into a cylindrical-conical incubator (200 L) with a continuous flow of water (7 L s⁻¹).

Approximately 6 h after the last induction (160 hours-grade, 27 °C) the egg collection began with a maximum period of 6 h; then the eggs were removed every hour and led into cylindrical-conical incubators. After 6 h it was detected by abdominal pressure whether males and females had spawned completely. Then a 0.5 cm² from the caudal fin was sampled from each individual. Samples were placed in 1.5 mL micro-tubes containing absolute ethanol for DNA extraction. The breeder's mortality (%) was measured 1 d after breeding.

Three days after hatching, approximately 200 larvae were randomly collected by hand (20 larvae from each incubator), and placed in 1.5 mL micro-tubes containing ethanol. For DNA extraction 95 were collected according to the methodology described by Lopera Barrero *et al.* (2008). In the micro tubes a volume of 550 ml of buffer solution (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS) and 200 mg mL⁻¹ of proteinase K were added. The samples were incubated in water bath (50 °C) for 12 h. The DNA was precipitated with 600 mL

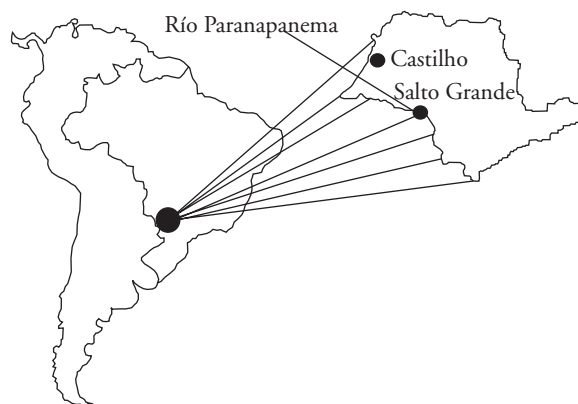


Figura 1. Ubicación de la Estación de Acuicultura e Hidrología de la Duke Energy International (Geração Paranapanema) y de la ciudad de Castilho, en el Estado de São Paulo, Brasil.

Figure 1. Location of the Aquaculture and Water Station of the Duke Energy International (Geração Paranapanema) and the city of Castilho, in São Paulo, Brazil.

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 se capturó con el sistema fotográfico EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5, EE.UU.) (Figura 2).

El ADN se amplificó en un volumen final de reacción de 15 mL usando la solución amortiguadora Tris-KCl, 2.0 mM MgCl_2 , 0.8 μM de cada cebador (*Forward* y *Reverse*), 0.2 mM de cada dNTP, una unidad de Platinun *Taq* DNA Polimerasa, 10 ng de ADN para larvas y 20 ng de ADN para las aletas. Se amplificaron cuatro loci descritos por Barroso *et al.* (2003) para *Brycon opalinus* (No. Acceso GeneBank AF513621-BoM1, AF513622-BoM2, AF513626-BoM7 y AF513628-BoM13). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (EE.UU.), 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 48°C , 58°C , 52°C y 50°C para cada locus, y 1 min a 72°C .

Las muestras amplificadas fueron separadas en electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % (acrilamida:bisacrilamida - 29:1) desnaturalizada (6 M de urea), en solución amortiguadora TBE 1X (90 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA) a 300 V por 4 h. Para visualizar los alelos microsatélites se usó nitrato de plata según lo descrito por Bassam *et al.* (1991). El gel se puso en una solución de fijación (10 % etanol, 0.5 % ácido acético) por 20 min, se tiñó con nitrato de plata (6 mM) por 10 min y se reveló (0.75 M NaOH, 0.22 % formol-40 %). Cada gel se fotografió con cámara digital Nikon (E5200). El tamaño de los alelos se calculó por el programa Kodak - EDAS 290 (EE.UU.) usando marcadores de ADN de 10 pb y 50 pb (DNA ladder - Invitrogen®) (Figura 3).

El número de alelos, la heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_e), el equilibrio de Hardy-Weinberg, la deficiencia o exceso de heterocigotos y el coeficiente de endogamia (F_{is}) se calcularon usando el programa GENEPOP 3.3 (Raymond y Rousset, 1995). Las frecuencias alélicas y el índice de Shannon se calcularon con el programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). El análisis de variancia molecular AMOVA se calculó con el programa

of NaCl (5M) and centrifuged for 10 min at 12 000 rpm. The DNA was transferred to empty micro tubes, precipitated with 700 mL of ethanol and incubated at -20°C for 1 h. The DNA extract was washed with 700 mL of 70 % ethanol, suspended in TE buffer 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA (80 mL for fin and 35 mL for larvae), and treated with 30 mg mL^{-1} RNase. Samples were incubated in water bath at 37°C for 60 min and stored at -20°C .

The DNA was quantified in a spectrophotometer UV 1601 (Shimadzu USA) and diluted to $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (fins) and $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (larvae). The integrity of DNA was verified with horizontal electrophoresis in a 1 % agarose gel at 70 V for 60 min using a buffer solution of TBE 1X (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, U SA) (Figure 2).

The DNA was amplified in a final reaction volume of 15 mL using the buffer solution Tris-KCl, 2.0 mM MgCl_2 , 0.8 μM of each primer (*Forward* and *Reverse*), 0.2 mM of each dNTP, one unit of Platinun *Taq* DNA Polymerase, 10 ng of DNA for larvae and 20 ng of DNA for fins. Four loci were amplified, as described by Barroso *et al.* (2003), for *Brycon opalinus* (Access Number GeneBank AF513621-BoM1, AF513622-BoM2, AF513626-BoM7 and AF513628-BoM13). Amplification reactions were performed in a thermocycler Eppendorf Mastercycler® Gradient (USA), programmed for 30 cycles with an initial denaturation step at 94°C for 4 min and an extension final step at 72°C for 10 min. Each cycle consisted of 1 min at 94°C , 1 min at 48°C , 58°C , 52°C and 50°C for each locus, and 1 min at 72°C .

The amplified samples were separated in a polyacrylamide gel electrophoresis at 10 % (acrylamide : Bisacrylamide - 29:1) denatured (6 M urea) in a buffer solution of 1X TBE (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) at 300 V for 4 h. Silver nitrate was used to visualize the microsatellite alleles, according to Bassam *et al.* (1991). The gel was placed in a fixative solution (10 % ethanol, 0.5 % acetic acid) for 20 min; it was stained with silver

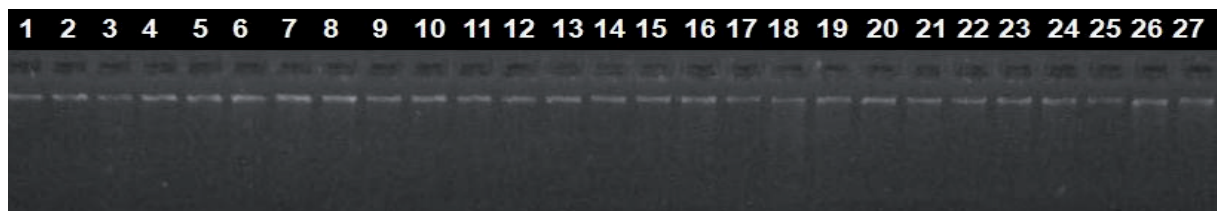


Figura 2. Cuantificación en gel de agarosa al 1 % de las muestras de *Brycon orbignyanus*. Muestras de 1 a 24 reproductores. Muestras de 25 a 27 larvas.

Figure 2. Quantification of the *Brycon orbignyanus* samples in agarose gel at 1 %. Samples of 1 to 24 breeders. Samples of 25 to 27 larvae.

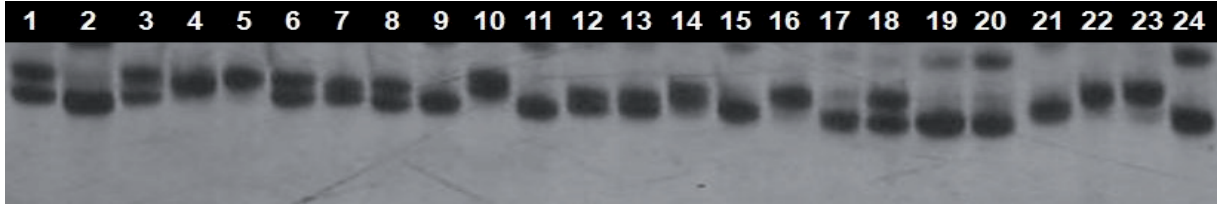


Figura 3. Amplificación en gel de poliacrilamida al 10 % de las muestras de los reproductores de *Brycon orbignyanus*.
Figure 3. Amplification of the samples of *Brycon orbignyanus* breeders with polyacrylamide gel at 10 %.

Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). La prueba de Duncan se usó para determinar las diferencias entre las medias. La determinación de la paternidad de la progenie se realizó con el programa PAPA versión 2.0 (Duchesne *et al.*, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cuatro loci produjeron ocho alelos con tamaños entre 140 pb y 200 pb, observados en los reproductores y en la progenie (Cuadro 1). Se observó presencia de los mismos alelos en los reproductores y en la progenie y ausencia de alelos de baja frecuencia (menor que 0.100) que indicaría pérdida de alelos. Según Innes y Elliott (2006), la pérdida de alelos es la primera señal de la disminución de la variabilidad genética en una población; así los resultados sugieren que se preservó de la variabilidad genética en la progenie.

No se encontraron diferencias ($p > 0.01$) en el equilibrio de Hardy-Weinberg en los reproductores y en la progenie. Los valores estimados de heterocigocidad observada (H_o) y de coeficiente de endogamia (F_{is}), no indicaron aparición de endogamia en los reproductores y exceso de heterocigotos para los loci BoM1, BoM7 y BoM13. El locus BoM2 presentó deficiencia de heterocigotos. Igualmente, los resultados de F_{is} mostraron pérdida de heterocigosis en el locus BoM2 (0.452) (Cuadro 2).

La deficiencia de heterocigotos observado en los reproductores para el locus BoM2 (Cuadro 2) se puede deber a endogamia, presencia de alelos nulos, muestreo no aleatorio o al efecto Wahlund (Hassanien y Gilbey, 2005). Sin embargo, por el F_{is} negativo encontrado en los otros loci y la falta de diferencias ($p > 0.01$) en el equilibrio de Hardy-Weinberg, es improbable que el efecto Wahlund sea una posible causa.

En la progenie, los valores de heterocigocidad y el F_{is} mostraron que hubo exceso de heterocigotos, indicando ausencia de endogamia. La progenie obtenida

nitrate (6 mM) for 10 min and revealed (0.75 M NaOH, 0.22 % formalin-40 %). Each gel was photographed with a digital Nikon camera (E5200). The size of alleles was calculated with the program Kodak - EDAS 290 (USA) using DNA markers of 10 bp and 50 bp (DNA ladder - Invitrogen®) (Figure 3).

The number of alleles, the observed heterozygosity (H_o) and expected (H_e), the Hardy-Weinberg equilibrium, the deficiency or excess of heterozygotes and the inbreeding coefficient (F_{is}) were calculated using the program GENEPOP 3.3 (Raymond and Rousset, 1995). Allele frequencies and the Shannon index were calculated with the programme PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). The analysis of molecular variance AMOVA was calculated with the programme Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). The Duncan test was used to determine differences between means. The determination of paternity of the offspring was performed with the 2.0 version PAPA programme (Duchesne *et al.*, 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

The four loci produced eight alleles of sizes ranging between 140 bp and 200 bp, observed in breeders and offspring (Table 1). The presence of

Cuadro 1. Número, tamaño en pares de bases (pb) y frecuencia de los alelos para los reproductores y progenie de *B. orbignyanus*, en el sistema reproductivo seminatural.

Table 1. Number, size in base pairs (bp) and frequency of alleles for breeders and offspring of *B. orbignyanus* in the semi-natural reproductive system.

Loci	No.	Tamaño (pb)	Frecuencia de los alelos	
			Reproductores	Progenie
BoM1	2	150-169	150 (0.158)	150 (0.165)
			169 (0.842)	169 (0.835)
BoM2	2	170-200	170 (0.583)	170 (0.516)
			200 (0.417)	200 (0.484)
BoM7	2	192-198	192 (0.350)	192 (0.240)
			198 (0.650)	198 (0.760)
BoM13	2	165-172	0.500	165 (0.477)
				172 (0.523)

Cuadro 2. Heterocigicidad observada (H_o) y esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{is}) y prueba de probabilidad para el equilibrio de Hardy-Weinberg (P_{WH}), estimados en los reproductores y en la progenie de *B. orbignyana*, en el sistema reproductivo seminatural.

Table 2. Observed heterozygosity (H_o) and expected (H_e), inbreeding coefficient (F_{is}) and probability test for the Hardy-Weinberg equilibrium (P_{WH}), estimated on breeders and offspring of *B. orbignyana*, in the semi-natural reproductive system.

Parámetros	Reproductores				Medias
	Loci				
	BoM1	BoM2	BoM7	BoM13	
H_o	0.316	0.278	0.700	0.583	0.470b
H_e	0.273	0.500	0.467	0.511	0.438a
F_{is}^\dagger	-0.161	0.452	-0.520	-0.146	-0.116
P_{WH}	0.000 [‡]	0.000 [‡]	0.002 [‡]	0.000 [‡]	---
	Progenie				
	BoM1	BoM2	BoM7	BoM13	
H_o	0.330	0.645	0.456	0.609	0.510a
H_e	0.277	0.502	0.368	0.502	0.412b
F_{is}^\dagger	-0.192	-0.308	-0.254	-0.214	-0.242
P_{WH}	0.000 [‡]	0.001 [‡]	0.001 [‡]	0.000 [‡]	---

[†]=pérdida de homocigosis ♦ loss of homozygosity; [‡] = $p \leq 0.01$.

por el sistema reproductivo seminatural presentó una heterocigosis media mayor (0.510) que la encontrada en los reproductores (0.470), mostrando que la variabilidad genética fue preservada (Cuadro 2).

De acuerdo con la AMOVA la mayor parte de la variación observada está dentro de cada grupo y no entre los grupos, mostrando que a pesar de ser F1 (reproductores) y F2 (progenie) no hubo pérdida de variabilidad genética durante el proceso reproductivo (Cuadro 3). Este resultado es corroborado por el valor de índice de Shannon (Reproductores=0.477; Progenie=0.491).

La preservación de la variabilidad genética en la progenie fue debida posiblemente a la utilización del sistema reproductivo seminatural. Este sistema reproductivo, cuando se realiza correctamente, tiende a reducir el direccionamiento y la selección sin intención en el proceso que ocurre normalmente en el sistema reproductivo por extrusión. Además disminuye significativamente la mortalidad causada por el estrés, posibilitando que un mayor número de reproductores

the same alleles was observed in the breeders and offspring, as well as the absence of low frequency alleles (less than 0.100), which would indicate a loss of them. According to Innes and Elliott (2006), the loss of alleles is the first sign of the decreased genetic variability in a population; thus the results suggest that the offspring genetic variability was preserved.

There were no differences ($p > 0.01$) in the Hardy-Weinberg equilibrium of the in breeders and offspring. The estimates of heterozygosity observed (H_o) and inbreeding coefficient (F_{is}) revealed no occurrence of inbreeding in breeders and an excess of heterozygotes for BoM1, BoM7 and BoM13 loci. The BoM2 locus showed a deficiency of heterozygotes. Similarly, F_{is} results showed a loss of heterozygosity in the locus BoM2 (0.452) (Table 2).

The heterozygote deficiency observed in the breeders for the locus BoM2 (Table 2) may be due to inbreeding, presence of null alleles, nonrandom sampling or the Wahlund effect (Hassanien and Gilbey, 2005). However, because of the negative F_{is} found in other loci and the lack of differences ($p > 0.01$) in the Hardy-Weinberg equilibrium, the Wahlund effect is unlikely to be a possible cause.

In the offspring, the values of heterozygosity and F_{is} showed excess of heterozygotes, indicating absence of inbreeding. The offspring obtained by the semi-natural reproductive system showed a higher mean heterozygosity (0.510) than that found in breeders (0.470), showing that genetic variability was preserved (Table 2).

According to AMOVA most of the observed variation was within each group and not among groups, which reveals that despite being F1 (breeders) and F2 (offspring) there was no loss of genetic variability during the reproductive process (Table 3). This result is corroborated by the Shannon index value (Breeders=0.477; Offspring=0.491).

The preservation of genetic variability in the offspring was possibly due to the use of the semi-natural reproductive system. When the reproductive system is done correctly, it tends to reduce routing and unintentional selection in the process that normally occurs in the reproductive system by extrusion. Also it significantly reduces mortality caused by stress, allowing that a greater number of breeders generate offspring in crosses, as well as a greater preservation of genetic variability. In this work, it was verified that

Cuadro 3. Análisis de variancia molecular (AMOVA) para los reproductores y la progenie de *B. orbignyanus*.
Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) for breeders and offspring of *B. orbignyanus*.

Muestras	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Coefficiente de variación	Porcentaje de variación
Reproductores	E.G	3.439	0.0318	3.09 [†]
X	D.G	235.750	0.9989	96.91
Progenie	Total	239.189	1.0307	100

E.G: entre grupos; D.G: Dentro de grupos ♦ EG: among groups; DG: within groups †: $p > 0.05$.

genere progenie durante los cruzamientos y que exista una mayor preservación de la variabilidad genética. En el presente trabajo se verificó que todos los reproductores quedaron vacíos (por presión abdominal al final del proceso reproductivo), no hubo mortalidad de los reproductores y la variabilidad genética se preservó en la progenie.

Además, es común en los programas de repoblación se usen pocos individuos (por ejemplo, un macho para varias hembras) ya que las especies migratorias, como el *B. orbignyanus*, son muy prolíficas y la utilización de numerosos individuos está limitado por falta de infraestructura adecuada. En el presente estudio, cuando fueron cruzados 24 reproductores (12♂ y 12♀) con alta variabilidad genética, es probable que la contribución reproductiva en la fertilización de los huevos también fuera alta, favorecida por la utilización del sistema seminatural y de un número similar de hembras y machos, preservando la variabilidad genética. Estos resultados concuerdan con las recomendaciones de Pante *et al.* (2001), Oota y Matsuishi (2005) y Frost *et al.* (2006), donde el uso de un adecuado número de reproductores (N_c) junto con la formación correcta de cruzamientos (1:1) y el uso de sistemas reproductivos apropiados, puede controlar el apareamiento de endogamia en las futuras generaciones y permitir una alta variación y contribución reproductiva entre los individuos y sus progenies (Qin *et al.*, 2007).

Se determinó sólo 50 % de la paternidad. Esta baja determinación está correlacionada con el bajo número de alelos encontrados (ocho alelos) provocada posiblemente por la utilización de loci heterólogos (desarrollados para *Brycon opalinus*). Estos resultados divergen del estudio realizado por Barroso *et al.* (2003) en el que se reportan 12 y 31 alelos entre 78 a 212 pb en *B. orbignyanus*; pero fueron similares a los encontrados por Sanches y Galetti Jr. (2006), los cuales investigaron siete loci para *Brycon hilarii* con la presencia de pocos alelos para *B. orbignyanus* (tres

all breeders were left empty (by abdominal pressure at the end of the reproductive process), there was no mortality of breeders and genetic variability was preserved in the offspring.

It is common in restocking programs to use few male individuals (for example, one male for several females) since migratory species, like *B. orbignyanus*, are very prolific and the utilization of numerous individuals is limited due to the lack of adequate infrastructure. In the present study, when 24 breeders with high genetic variability were crossed (12♂ and 12♀), it is likely that the reproductive contribution to the fertilization of eggs was also high, facilitated by the use of the semi-natural system and a similar number of males and females, preserving genetic variability. These results agree with the recommendations by Pante *et al.* (2001), Oota and Matsuishi (2005) and Frost *et al.* (2006), where the use of an adequate number of breeders (N_c), together with the correct formation of crosses (1:1) and the use of appropriate reproductive systems could control the occurrence of inbreeding in future generations and allow a high variation and reproductive contribution among individuals and their offspring (Qin *et al.*, 2007).

Only 50 % of paternity was determined. This observation is correlated with the number of alleles found (eight alleles), caused possibly by the use of heterologous loci (developed for *Brycon opalinus*). These results diverge from the study by Barroso *et al.* (2003) which reported 12 and 31 alleles between 78 to 212 bp in *B. orbignyanus*; but they were similar to those found by Sanches and Galetti Jr. (2006), who investigated seven loci for *Brycon hilarii* with the presence of few alleles for *B. orbignyanus* (three to eight between 138 to 220 bp). However, the alleles obtained in our study were informative and allowed to calculate genetic variability and determine the participation and reproductive behavior of breeders on a certain percentage of the offspring using a semi-natural reproductive system.

a ocho entre 138 a 220 pb). No obstante, los alelos obtenidos en el presente estudio fueron informativos y permitieron calcular la variabilidad genética y determinar la participación y comportamiento reproductivo de los reproductores en un porcentaje de la progenie usando el sistema reproductivo seminatural.

De los 12 machos y 12 hembras usados sólo cuatro machos (M1, M8, M9 y M10) y nueve hembras (F1, F2, F3, F5, F6, F8, F9, F10 y F11) fueron responsables por 50 % de la progenie. El macho 1 (M1) y la hembra 5 (F5) fueron responsables de la mayor contribución en la progenie (75.51 % y 28.57 %). Como consecuencia, el número efectivo de posibles progenitores (24) se redujo al determinar que el N_e fue realmente 11.08. Sin embargo, por sólo tener datos del 50 % de la paternidad este valor no es representativo para toda la progenie (Figura 4).

Todos los machos que contribuyeron con 50 % de la progenie fertilizaron más de una hembra, caracterizando la paternidad múltiple. El M1 fertilizó la mayor cantidad de hembras (100 %), seguido del macho M9 (33.33 %) y de los machos M8 y M10 (22.22 %). La composición de las familias fue afectada directamente por la mayor participación del M1, y los cruzamientos F5xM1 y F10xM1 tuvieron mayor contribución en la progenie (44.69 %) (Figura 5). Este comportamiento determina que el sistema reproductivo seminatural pudo haber influenciado en la variación y en la contribución reproductiva. A pesar de que sólo se determinó 50 % de la paternidad, es evidente que el sistema reproductivo seminatural permitió la participación activa de los reproductores en la fertilización y el posible efecto de dominancia

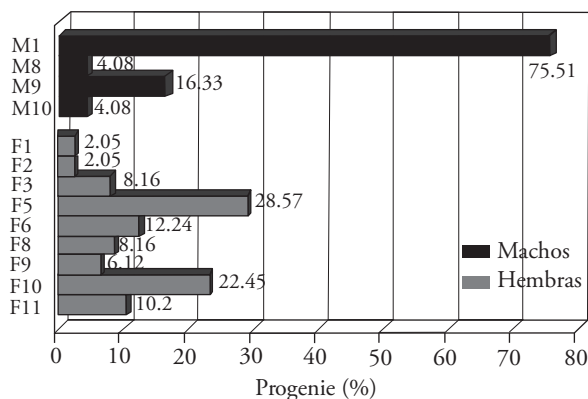


Figura 4. Contribución reproductiva de la progenie de *B. orbignyana* en el sistema reproductivo seminatural.

Figure 4. Reproductive contribution of the *B. orbignyana* offspring to the semi-natural reproductive system.

Of the 12 males and 12 females used only four males (M1, M8, M9 and M10) and nine females (F1, F2, F3, F5, F6, F8, F9, F10 and F11) were responsible for 50 % of the offspring. Male 1 (M1) and female 5 (F5) were responsible for most of the contribution to the offspring (75.51 % and 28.57 %). As a result, the actual number of possible parents (24) fell when determining that the N_e was actually 11.08. However, for having data only of 50 % of parenting this value is not representative of the entire offspring (Figure 4).

All males that contributed 50 % to the offspring fertilized more than one female, characterizing multiple paternity. The male M1 fertilized the largest number of females (100 %), followed by M9 (33.33 %) and M8 and M10 (22.22 %). The composition of families was directly affected by the increased involvement of M1, and crosses F5xM1 and F10xM1 had a greater contribution to the offspring (44.69 %) (Figure 5). This behavior determines that the semi-natural reproductive system may have influenced the variation and the reproductive contribution. Although only 50 % of paternity was determined, it is clear that the semi-natural reproductive system allowed the active participation of breeders in

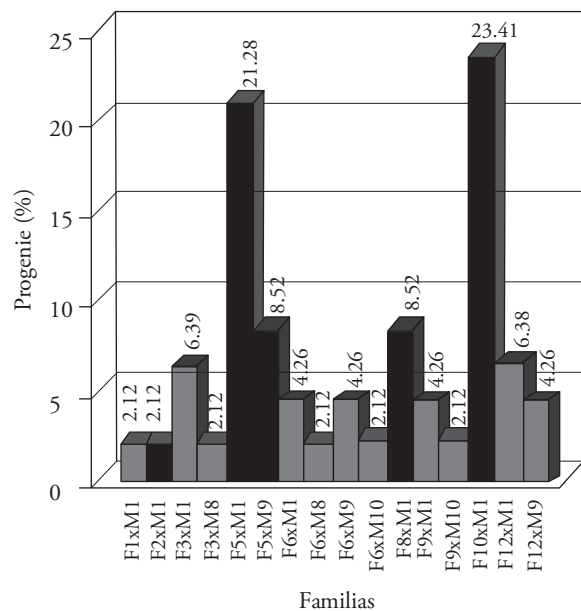


Figura 5. Composición de las familias en la progenie de *B. orbignyana*, usando el sistema reproductivo seminatural.

Figure 5. Composition of families in the *B. orbignyana* offspring using the semi-natural reproductive system.

durante el cruzamiento, comportamiento que no es obtenido en el sistema reproductivo por extrusión, donde el cruzamiento es direccionado.

La dominancia reproductiva, también conocida como hipótesis de la calidad intrínseca del macho o hipótesis del buen esperma (Sivinski, 1984), puede afectar la variabilidad genética 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 la variabilidad genética de la progenie (Nordeide, 2007). Este fenómeno ya se observó en peces exóticos y nativos del Brasil. Porta *et al.* (2006) para *Solea senegalensis* observaron que dos machos de 11 fueron responsables en mayor porcentaje por la progenie. Igualmente, Sekino *et al.* (2003) señalan que 99 % de la progenie fue originada por la participación reproductiva de un macho, lo que redujo la variabilidad genética en lotes de *Paralichthys olivaceus*.

Los resultados del presente estudio son importantes, porque con ellos se puede orientar objetivamente el manejo reproductivo y genético usado en programas de repoblación de *B. orbignyanus*. Por esta razón, durante la formación de cruzamientos destinados para producción de nuevos lotes o en la realización de programas de conservación en *B. orbignyanus* usando el sistema reproductivo seminatural, es recomendable usar la mayor cantidad posible de reproductores en proporciones iguales de sexo y así preservar la variabilidad genética, al disminuir la correlación negativa entre la similitud genética y el número de generaciones (Freitas y Galetti Jr., 2005). Sin embargo, se debe analizar la eficiencia del sistema reproductivo seminatural en la preservación de la variabilidad genética, incluyendo estudios de su efecto sobre la paternidad y la contribución reproductiva.

De esta forma, el monitoreo de la diversidad genética de lotes de peces mantenidos en piscícolas es fundamental para la conservación de las especies y de la ictiofauna (Lopera Barrero *et al.*, 2007; Lopera Barrero *et al.*, 2009), siendo necesario para que los individuos liberados durante los programas de repoblación puedan adaptarse y reproducirse sin provocar alteraciones en las poblaciones naturales (Sønstebo *et al.*, 2007). Es necesario efectuar análisis de variabilidad genética en poblaciones naturales de *B. orbignyanus* en el río Paranapanema para determinar el potencial genético de esta importante especie

fertilization and the possible effect of dominance during mating, a behavior which is not found in the reproductive system by extrusion, where crossing is directed.

Reproductive dominance, also known as hypothesis of the intrinsic quality of the male or hypothesis of good sperm (Sivinski, 1984), may affect genetic variability when using semi-natural reproductive systems because the dominance of some males (presumably the strongest and with better reproductive characteristics) in the fertilization of eggs can influence the offspring genetic variability (Nordeide, 2007). This phenomenon was already observed in exotic and native fish of Brazil. In relation to *Solea senegalensis*, Porta *et al.* (2006) noted that two males out of 11 were responsible to the greater percentage of the offspring. Similarly, Sekino *et al.* (2003) indicate that 99 % of the offspring came from the reproductive participation of one male, which decreased the genetic variability in batches of *Paralichthys olivaceus*.

The results of this study are important because they may objectively supervise the reproductive and genetic management used in restocking programs of *B. orbignyanus*. For this reason, during the formation of crosses for production of new lots, or in the implementation of preservation programmes for *B. orbignyanus* using a semi-natural reproductive system, it is recommended to use as many breeders as possible in equal proportions of sex and thus preserve genetic variability by lowering the negative correlation between genetic similarity and the number of generations (Freitas and Galetti Jr., 2005). However, the efficiency of the semi-natural reproductive system in the preservation of genetic variability must be analyzed, including studies of its effect on paternity and reproductive contribution.

Thus, the monitoring of the genetic diversity of lots of fish kept under fish farming conditions is essential for the conservation of species and ichthyofauna (Lopera Barrero *et al.*, 2007; Lopera Barrero *et al.*, 2009); being necessary for the individuals released during restocking programmes to adapt and reproduce without causing changes in natural populations (Sønstebo *et al.*, 2007). It is necessary to undertake analysis of genetic variability in natural populations of *B. orbignyanus* in the river Paranapanema to determine the genetic potential of this important

migratoria y la orientación de programas efectivos de repoblación.

CONCLUSIONES

El sistema reproductivo seminatural fue efectivo en la conservación de la variabilidad genética de progenies de *B. orbignyana* usadas en programas de repoblación. Se encontró paternidad múltiple y una contribución reproductiva diferenciada en la composición de las familias en el 50 % de la progenie.

AGRADECIMIENTOS

A la Duke Energy Internacional (Geração Paranapanema) por proveer las muestras de *B. orbignyana* y al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por la beca de estudio.

LITERATURA CITADA

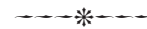
- Agostinho, A. A., S. M. Thomaz, and L. C. Gomes. 2005. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conserv. Biol.* 19: 646-652.
- Barroso, R. M., A. W. S. Hilsdorf, H. L. M. Moreira, A. M. Mello, S. E. F. Guimarães, P. H. Cabello, and Y. M. Traub-Cseko. 2003. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Mol. Ecol. Notes* 3: 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: 80-83.
- 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: 191-193.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin Ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1:47-50.
- Feng, Y., Z. Peijun, W. Keling, and X. Jianhai. 2007. Genetic variation of natural and cultured stocks of *Paralichthys olivaceus* by allozyme and RAPD. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 25: 78-84.
- 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.
- Ganeco, L., L. Nakaghi, E. Urbinati, R. Dumont-Neto, e L. H. Vasques. 2001. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba (*Brycon orbignyana*) durante o ciclo reproductivo. *B. Inst. Pesca* 27: 131-138.
- Hassani, H. A., and J. Gilbey. 2005. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquac. Res.* 36: 1450-1457.

migratory species and effective programmes of restocking.

CONCLUSIONS

The semi-natural reproductive system was effective in the conservation of genetic variability of *B. orbignyana* offspring used in restocking programmes. We found multiple paternity and a reproductive contribution differentiated in relation to the composition of families in 50 % of the offspring.

—End of the English version—



- Hatanaka, T., F. Henrique-Silva, and P. M. Galetti Jr. 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica* 126: 513-517.
- 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, Corumbá. 44 p.
- Innes, B. H., and N. G. Elliott. 2006. Genetic diversity in a Tasmanian hatchery population of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) compared with its Canadian progenitor population. *Aquac. Res.* 37: 563-569.
- Lopera Barrero, N. M., R. P. Ribeiro, J. A. Povh, L. Vargas, C. B. Jacometo, y P. C. Gomes. 2009. Diversidad genética de lotes de *Piaractus mesopotamicus* usados en programas de repoblamiento y sus implicaciones en la conservación. *Agrociencia* 43: 249-256.
- Lopera Barrero, N. M., J. A. Povh, R. P. Ribeiro, P. C. Gomes, C. B. Jacometo, y T. S. Lopes. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). *Cien. Inv. Agr.* 35: 15-24.
- Lopera Barrero, N. M., R. P. Ribeiro, e J. A. Povh. 2007. O repovoamento de peixes: uma estratégia multidisciplinar? *Aqüicultura & Pesca* 30: 71-74.
- 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, and G. M. Drummond (eds). Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 160 p.
- 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.
- 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: 1-16.
- Oota, T., and T. Matsuishi. 2005. Increase of inbreeding by stocking on wild population assessed by using individual-based life history model. *Fish. Sci.* 71: 73-78.

- Pante, M., B. Gjerde, and I. McMillan. 2001. Inbreeding levels in selected populations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 192: 213-224.
- 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.
- Qin, Y., X. Liu, H. Zhang, and G. Zhang. 2007. Effect of parental stock size on F1 genetic structure in the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). *Aquac. Res.* 38: 174-181.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86: 248-249.
- Sanches, A., and P. M. Galetti Jr. 2006. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Mol. Ecol. Notes* 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: 255-263.
- Sivinski, J. 1984. Sperm in competition. *In*: Smith, R. L. (ed). *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. Academic Press, London. pp: 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: 33-44.
- Yeh, F. C., T. Y. Z. Boyle, and J. M. Xiyan. 1999. PopGene Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, USA. 29 p.
- Zaniboni-Filho, E., D. Reynalte-Tataje, y M. Weingartner. 2006. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19: 233-240.
- Zaniboni-Filho E., and U. H. Schulz. 2003. Migratory Fishes of the Uruguay River. *In*: Carolsfeld, J., B. Harvey, C. Ross, and A. Baer. (Eds.), *Migratory Fishes of South America*. Biology, Fisheries and Conservation Status. World Fisheries Trust, Victoria. pp: 253-271.