



Evaluación del polimorfismo por microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* (Characidae, Serrasalminae) provenientes del río Meta, Colombia

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Hermes Pineda S¹, Biol, MSc; Martha Olivera A¹, MV, Dr. Cien. Agr.; Silvio Urcuqui I², MD, PhD; Esperanza Trujillo B³, Biol, MSc; Juan J Builes G⁴, Biol, MSc.

¹Fisiología y Biotecnología de la Reproducción. ²Inmunovirología, SIU. ³Genética y Mejoramiento Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia. AA 1226. Medellín. ⁴Laboratorio Genes Ltda. CC Monterrey Oficina 612. Medellín. Colombia
herpis@hotmail.com

(Recibido: 18 enero, 2005; aceptado: 2 diciembre, 2005)

Resumen

En este estudio, cuatro microsatélites (*Pme4*, *Pme5*, *Pme20*, *Pme21*) fueron utilizados para tipificar treinta individuos de *Piaractus brachypomus*, provenientes del río Meta, tributario de la cuenca del río Orinoco. Los resultados mostraron un promedio de cuatro alelos por locus; se reportan seis alelos nuevos (*Pme5*²⁰², *Pme5*²⁰⁴, *Pme20*²⁰¹, *Pme20*²¹¹, *Pme20*²¹⁷ y *Pme21*²⁵⁸), no descritos en la especie de referencia *Piaractus mesopotamicus*; el valor promedio de heterocigosidad esperado fue de 46.8% y el observado de 54.2%. El grupo de individuos no estuvo afectado por fenómenos genéticos de poblaciones como entrada o salida de individuos, mutación o selección artificial. Estos microsatélites podrían ser utilizados para el análisis genético en esta especie, dentro de los programas de conservación y selección de reproductores en zonas de cultivo.

Palabras clave: caracterización, genética, neotrópico, peces.

Introducción

Piaractus brachypomus (Cuvier, 1818), conocida como Cachama Blanca, es la más importante especie nativa de peces en cautiverio para el desarrollo de pequeñas economías de sustento en Colombia. El cultivo con esta especie se inició en 1985, utilizando reproductores capturados directamente del río Meta, con el propósito de realizar desoves artificiales y posterior venta de alevinos a otras estaciones piscícolas en el país (3). La excesiva captura, sin reposición en el medio natural, disminuyó drásticamente el número de individuos en las zonas de pesca, convirtiendo a la acuicultura en una buena alternativa comercial que ha alcanzado cerca de 13.000 ton/año, un 31% de la producción íctica nacional (6). Actualmente, el cultivo de esta especie se hace en forma no controlada, utilizando el mismo grupo de reproductores en zonas de alta producción y distribución de alevinos, requiriendo de una renovación del plantel de reproductores con individuos del medio

natural, a los cuales se les desconoce su diversidad genética (10).

Las técnicas moleculares se han convertido en un valioso instrumento para determinar la diversidad genética de las poblaciones. Por ello, la aplicación del análisis de microsatélites en peces, ha permitido establecer la relación genética intra e inter específica entre poblaciones, mapeo genómico, pruebas de parentesco y realizar inferencias sobre un apropiado manejo de individuos en cautiverio dentro de los programas de selección artificial (9). Calcagnotto *et al* (2) reportaron ocho microsatélites (*Pme2*, *Pme4*, *Pme5*, *Pme14*, *Pme20*, *Pme21*, *Pme28*, *Pme32*) para *Piaractus mesopotamicus*, los cuales también amplificaron en varias especies afines, entre ellas, *Piaractus brachypomus*. El propósito de este trabajo fue determinar el polimorfismo de cuatro microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* provenientes directamente del medio natural.

Materiales y métodos

Se utilizaron treinta individuos de *Piaractus brachypomus* descendientes de reproductores capturados directamente en el río Meta para docencia e investigación, los cuales se mantuvieron en estanques de la estación piscícola de San José del Nus (Universidad de Antioquia), durante siete años. Durante dicho período, estos animales no recibieron ningún tratamiento hormonal para inducir su reproducción artificial, por consiguiente, no hubo cruzamiento reproductivo entre ellos, ni con otros individuos provenientes de otros estanques. De cada individuo se obtuvo 1 ml de sangre que se utilizó para extraer el ADN total siguiendo el protocolo descrito por Miller *et al* (8), con algunas modificaciones (11). Se utilizaron cinco microsatélites (Pme4, Pme5, Pme20, Pme21 y Pme28); sin embargo, el microsatélite Pme28 no originó una amplificación exitosa, por lo que fue excluido del estudio. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador PTC 100 (MJ Research™, USA), en un volumen final de 15 ml que contenía 100 ng de ADN, 1.5 ml de tampón 10X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 0.6 ml de BSA (10 mg/ml), 1 mM de cada primer y 1 U de Taq Polimerasa (Promega™, USA). Para Pme20 y Pme21, las condiciones para la reacción de PCR fueron: desnaturalización inicial 4 min. a 95°C, seguido de 30 ciclos a 95°C por 30 s, hibridación 57°C por 30 s y extensión 72°C por 30 s, con una extensión final de 72°C por 10 min. Las temperaturas de hibridación en los microsatélites Pme4 y Pme5 fue optimizada incluyendo temperaturas de hibridación en descenso de dos grados por ciclo a partir de 59°C, durante los cinco primeros ciclos de los 30 programados (1). Los productos de PCR fueron visualizados utilizando geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 4% y posterior tinción con plata (Promega™, USA). Los alelos se identificaron según el tamaño en pares de bases (pb) utilizando un ADN marcador para alelos cuyo tamaño es conocido. Se estimó el número total de alelos con sus respectivas frecuencias, la heterocigosidad esperada y observada por microsatélite con sus promedios y el índice de fijación (F_{IS}) (14). La significancia del valor F_{IS} fue estimada por el método de cadena de Markov (4) implementado en el programa Genepop en la web v. 3.4 (12).

Resultados

Para el caso de *Piaractus brachypomus*, se encontró una variación de alelos similar al reportado para un mismo número de individuos en *Piaractus mesopotamicus* por Calcagnotto *et al* (2). Se encontraron seis alelos para el microsatélite Pme4, el número más alto entre los cuatro microsatélites evaluados; para el caso de Pme21, sólo se encontraron dos (véase Tabla 1). El promedio de alelos para los cuatro microsatélites fue de cuatro. Los alelos nuevos encontrados fueron Pme5²⁰², Pme5²⁰⁴, Pme20²⁰¹, Pme20²¹¹, Pme20²¹⁷ y Pme21²⁵⁸, los cuales no fueron reportados en la especie de referencia *Piaractus mesopotamicus* (véase Tabla 1). Las frecuencias de los diferentes alelos oscilaron entre 0.017 (Pme4¹⁹⁹, Pme5²⁰², Pme20²⁰¹, Pme20²¹¹) y 0.900 (Pme20²¹³) (véase Tabla 1). El rango de alelos se amplió, creando un mayor polimorfismo en la muestra estudiada, comparado con la especie de referencia *Piaractus mesopotamicus* (véase Tabla 2). Los valores de heterocigosidad observada (H_O) para los microsatélites Pme4 ($H_O = 0.967$) y Pme5 ($H_O = 0.767$) fueron altos comparados con la heterocigosidad esperada (H_E) en ambos ($H_E = 0.755$ y $H_E = 0.671$), respectivamente, mientras los microsatélites Pme20 y Pme21 tuvieron valores similares entre lo observado y lo esperado ($H_O = 0.133$, $H_O = 0.300$ y $H_E = 0.188$, $H_E = 0.259$), respectivamente (véase Tabla 2). La heterocigosidad observada y esperada promedio en *Piaractus brachypomus* fue de $H_O = 0.542$ y $H_E = 0.468$, respectivamente, con un exceso de heterocigotos significativo únicamente para el microsatélite Pme4 ($F_{IS} = -0.287$, $p < 0.05$) (véase Tabla 2). Los datos de heterocigosidad observada reportados para *Piaractus mesopotamicus* (2), fueron menores que los detectados en el presente estudio (véase Tabla 2)

Tabla 1. Frecuencias alélicas obtenidas en un grupo de individuos de *Piaractus brachypomus* provenientes del río Meta, tributario de la cuenca del río Orinoco. Alelos nuevos en negrita.

Microsatélites	Alelos	Frecuencias
Pme4	199	0.017
	201	0.200
	203	0.117
	205	0.283
	207	0.033
	209	0.350
Pme5	194	0.433
	198	0.250
	202	0.017
	204	0.300
Pme20	201	0.017
	211	0.017
	213	0.900
	217	0.066
Pme21	258	0.150
	260	0.850

Tabla 2. Rango de alelos, Heterocigosidad esperada (H_e), Heterocigosidad observada (H_o) en *Piaractus brachypomus* (*P) y *Piaractus mesopotamicus* (*C) mediante el uso de cuatro microsatélites. Índice de Fijación (F_{is}) en *Piaractus brachypomus*.

Locus	Rango de alelos (pb)		H_e		H_o		F_{is}
	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
Pme4	199-209	191-213	0.755	0.705	0.967	0.656	-0.287 [‡]
Pme5	194-204	182-200	0.671	0.808	0.767	0.606	-0.146
Pme20	201-217	213-215	0.188	0.375	0.133	0.346	0.295
Pme21	258-260	260-268	0.259	0.303	0.300	0.286	-0.160
Promedio	————	————	0.468	0.548	0.542	0.474	————

[‡]p<0.05

*P: Estudio actual

*C: Calcagnotto *et al* (2001)

Discusión

A pesar del bajo número de individuos utilizados en este estudio, consideramos que los cuatro microsatélites evaluados proporcionaron información muy importante relacionada con la diversidad alélica para la especie *Piaractus brachypomus*, lo que permitió ampliar su rango de alelos. Los resultados presentados muestran que la diversidad genética entre las especies de peces es muy alta, ya que tan solo con cuatro microsatélites se pudieron identificar alelos que no han sido descritos en la especie de referencia *Piaractus mesopotamicus* (2). Las frecuencias alélicas encontradas en los microsatélites Pme4 y Pme5 permitirían un mayor grado de combinación, debido a su distribución uniforme en la muestra. Los microsatélites Pme20 y Pme21 se consideraron polimórficos, ya que las frecuencias de los alelos $Pme20^{213}=0.900$ y $Pme21^{260}=0.850$, no sobrepasaron el nivel de alelo único, es decir, 0.95; por el contrario, los alelos con bajas frecuencias, descritos en todos los microsatélites, requerirán del análisis de un mayor número de individuos para tener una mejor estimación de las frecuencias de estos alelos (5). Los niveles de heterocigosidad observada fueron altos en los microsatélites Pme4 y Pme5, como resultado de la dependencia del número de alelos por microsatélite y la distribución homogénea de sus frecuencias, caso contrario sucedió con los microsatélites Pme20 y Pme21, donde las heterocigosidades observadas y esperadas fueron relativamente bajas con frecuencia alta para un solo alelo. La heterocigosidad observada promedio sugiere que la muestra estudiada posee un nivel de variación genética media, diferente del valor menor reportado para la especie de referencia *Piaractus mesopotamicus* (véase Tabla 2). Desde el punto de vista aplicado, estos resultados sugieren que los individuos estudiados son aptos para el cruzamiento,

para los programas de conservación y para el mejoramiento genético. El microsatélite Pme4 presentó un exceso de heterocigotos significativo, por lo que se requiere un número mayor de individuos para detectar la mayoría de los doce alelos que hacen parte del rango de alelos del microsatélite; en este estudio sólo se registraron seis alelos.

Los resultados sugieren que los individuos estudiados conservan parte de su acervo genético original, como ha sido demostrado por Pineda Santis *et al* (10), en un estudio previo en el que se comparó un grupo de individuos del medio natural (río Meta) y estaciones piscícolas mediante el uso de la técnica de RAPD. Los individuos objeto de estudio en el presente trabajo, no se encontraron afectados por efectos como entrada o salida de individuos, efectos mutagénicos por calidad de agua o selección artificial, debido al aislamiento sometido durante siete años. Este resultado puede ser utilizado como referencia inicial para las poblaciones naturales de *Piaractus brachypomus* existentes actualmente en el río Meta y que, posiblemente, podrían estar alteradas en su estructura genética original por disminución del número de individuos en sus hábitats debido a efectos antrópicos (7). En general, Ryman *et al* (13) consideran que las poblaciones naturales de peces se encuentran amenazadas en su diversidad genética intra específica por extinción, hibridación y pérdida de variación genética, por lo que se requiere de mayores estudios para identificar la amenaza actual sobre los individuos de *Piaractus brachypomus* en su área de distribución geográfica.

Los cuatro microsatélites evaluados fueron muy efectivos como herramienta molecular en el análisis genético de un grupo de individuos de *Piaractus brachypomus*, es decir, pueden ser de gran utilidad

para determinar la diversidad genética en esta especie. Por otro lado, se debe establecer su aplicación potencial en la caracterización de poblaciones naturales, así como, en grupos de reproductores en las diferentes estaciones piscícolas con el propósito de plantear esquemas de cruzamientos controlados.

Summary

*Polymorphism evaluation by microsatellites in individuals of *Piaractus brachypomus* (Characidae, Serrasalminae) from Meta river, Colombia*

*In this study, four microsatellites (Pme4, Pme5, Pme20, Pme21) were used to typify thirty individuals of *Piaractus brachypomus* from the Meta river, tributary of the Orinoco river basin. Results showed an average of four alleles per locus, six new alleles (Pme5²⁰², Pme5²⁰⁴, Pme20²⁰¹, Pme20²¹¹, Pme20²¹⁷ y Pme21²⁵⁸), no reported in the reference species *Piaractus mesopotamicus*; the expected heterozygosity average value was 46.8% and the observed was 54.2%. Individuals were not affected by population genetic phenomena such as individuals entry or exit, mutation or artificial selection. These microsatellites could be used to the genetic analysis in this species in both conservation programs and brood stock selection in culture zones.*

Key words: *characterization, fishes, genetics, neotropical.*

Referencias

1. Beherengaray L, Sunnucks P. Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinenses* and the *O perugiae* species group and their use on other South American silverside fish. *Mol Ecology* 2000; 9:629-644.
2. Calcagnotto D, Russello M, DeSalle R. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Mol Ecology Notes* 2001; 1:245-247.
3. González Alarcón R. El cultivo de la Cachama. In: Rodríguez Gómez H, Daza PV, Carrillo Ávila M. Editores. *Fundamentos de acuicultura continental*. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Bogotá: Grafimpresos Quintero; 2001.
4. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48:361-372.
5. Hedrick PW. *Genetics of population*. 2nd ed. London: Jones and Bartlett Publishers, Inc; 2000.
6. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). *Reporte Anual Estadístico*. Bogotá: Grafimpresos Quintero; 2000.
7. Merino Archila MC. Problemática ambiental de la conservación de poblaciones naturales de peces en la Orinoquía Colombiana. *Rev Col Cien Pec. Sup. Cachama: Biología, Genética y Reproducción*. 2004; 17:60-61.
8. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc Acids Res* 1988; 16: 1215.
9. O'Connell M, Wright J. Microsatellite DNA in fishes. *Rev Fish Biol and Fisheries* 1997; 7:331-363.
10. Pineda Santis H, Pareja Molina D, Builes Gómez JJ, Olivera Ángel M. Análisis de la variación genética en *Piaractus brachypomus* (Pisces: Characidae) en estaciones piscícolas colombianas mediante RAPD. *Rev Col Cien Pec. Sup. Cachama: Biología, Genética y Reproducción*. 2004; 17:17-23.
11. Pineda Santis H, Olivera Ángel M, Trujillo Bravo E, Urcuqui Inchima S. Perfil genético intra específico en dos diferentes especies de peces (Characidae, Serrasalminae) de distinto origen natural. 2005. En revisión.
12. Raymond M, Rousset F. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 1995; 86:248-249. URL: <ftp://ftp.cefe.cnrs-mop.fr/pub/pc/msdos/genepop>.
13. Ryman N, Utter F, Laikre L. Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Rev Fish Biol and Fish* 1995; 5:417-446.
14. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 1994; 38:1358-70.

Agradecimientos

Queremos agradecer a la Estación Piscícola en San José del Nus (Universidad de Antioquia) por proveer las muestras. Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS (contrato 1115-09-10859).