

Análisis de la variación genética en *Piaractus brachypomus* (Pisces, Characidae) en estaciones piscícolas colombianas mediante RAPD

Hermes Pineda Santis¹, Biol; Diego Pareja Molina¹, Biol; Juan Builes Gómez², Biol, MSc; Martha Olivera Ángel¹, MV, Dr. Cien. Agr.
¹Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Antioquia, AA 1226.

²Laboratorio Genes Ltda. CC Monterrey Oficina 612. Medellín, Colombia.
hpinedas@agronica.udea.edu.co

(Recibido: 19 enero, 2004; aceptado: 2 abril, 2004)

Resumen

*La información sobre la variación genética en especies de cultivo es esencial para un apropiado manejo de los animales tanto en medio natural como en cautiverio. En este estudio fue utilizado el Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD) para evaluar la variación genética de juveniles de *Piaractus brachypomus* (Characiformes, Characidae, Serrasalminae), provenientes de cuatro estaciones piscícolas localizadas en cercanías de Villavicencio, departamento del Meta (oriente de Colombia). Se consideraron como control intraespecífico, la progenie de parentales provenientes del medio natural, y como control interespecífico se utilizaron los individuos de la familia Characidae; *Colossoma macropomum*, de la subfamilia Serrasalminae y *Brycon moorei* de la subfamilia Bryconinae. Treinta y cuatro de cuarenta iniciadores de RAPD, kits OPA y OPB con 20 iniciadores cada uno (10 nucleótidos por iniciador), proporcionaron 1168 fragmentos amplificados de ADN, de los cuales 440 fueron fragmentos únicos que discriminaron entre los individuos en estudio. La Distancia Genética (DG) mostró que los juveniles de *Piaractus brachypomus* tuvieron una menor distancia respecto al control intraespecífico proveniente del medio natural, sugiriendo una disminución de la variación genética manifestado en un menor número de fragmentos únicos. Posiblemente ocasionado por el uso de un mismo grupo de parentales confinados, no renovados, en las zonas de reproducción. Los efectos antrópicos en la región como la contaminación de aguas por agroquímicos, la sobrepesca, la deforestación y la sedimentación del río, han disminuido el número de individuos en las principales zonas de pesca forzando a los cultivadores a tener un reducido número de reproductores. *Colossoma macropomum* y *Brycon moorei* se separaron del grupo de *Piaractus brachypomus*, dando validez a la clasificación taxonómica, como especies diferentes.*

Palabras clave: *Bryconinae, manejo pesquero, peces, Serrasalminae.*

Introducción

Piaractus brachypomus (Cuvier, 1818); es la primera especie nativa y segunda más comercial de aguas continentales colombianas, con aproximadamente 13.000 ton/año; tiene a Villavicencio, capital del departamento del Meta, como el principal productor y distribuidor de alevinos para crecimiento y reproducción en estanques en diferentes regiones del país desde 1985 (8, 11).

En los inicios de la acuicultura para esta especie, la mayoría de los peces, sexualmente maduros, eran capturados por pescadores directamente del río Meta, y llevados a las estaciones piscícolas para iniciar los procesos de desove y venta de alevinos. Los efectos antrópicos como contaminación de aguas por agroquímicos, sobrepesca, deforestación y sedimentación del río (15), redujeron el número de

individuos en el medio natural, por lo que los propietarios de las estaciones piscícolas optaron por tener su propio grupo de reproductores (8), y hacer los cruces necesarios para asegurar la presencia del producto en el mercado.

La acuicultura, en general, ha ganado popularidad en las dos últimas décadas en nuestro país, durante las cuales, las políticas gubernamentales han promocionado la exploración para cultivo de nuevas especies de peces nativos. Si bien se ha avanzado en aspectos como reproducción, nutrición y cultivo (11), son pocos los trabajos encaminados a conocer la variación genética de las especies. *Piaractus brachypomus* a pesar de su gran relevancia económica, aun no cuenta con estudios genéticos que muestren los posibles efectos deletéreos en los individuos mantenidos en estanques, ni su viabilidad a largo plazo para obtener individuos con características genéticas productivas, mejoradas por selección artificial. El interés de este trabajo fue evaluar el componente genético existente en juveniles (alevinos) de *Piaractus brachypomus* en las estaciones piscícolas comerciales localizadas en Villavicencio, para realizar un adecuado manejo pesquero de los reproductores en cultivo.

La identificación y discriminación genética de grupos de individuos en acuicultura es un requerimiento fundamental en cualquier programa de cultivo, ya sea dirigido hacia la realización de un producto comercial, o para la rehabilitación de poblaciones naturales (5). La técnica de Polimorfismos de ADN Amplificado al Azar (RAPD), ha sido una herramienta útil para establecer la variación genética en varias especies de peces (12, 13, 24); por lo que se considera apropiada para obtener un acercamiento a la situación genética actual de los individuos en las estaciones piscícolas. RAPD es la amplificación de pequeños fragmentos de ADN por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), distribuidos a lo largo del genoma, utilizando un único iniciador de secuencia arbitraria (22, 23). Es un método sensible para detectar variación, pero, su propiedad de dominante y su inestabilidad en la repetición debido a la calidad del ADN, rango de temperaturas y condiciones de PCR han limitado su uso, sin embargo, una vez estandarizados los procesos, su valor informativo es significativo (9).

Materiales y métodos

Muestras

Se utilizaron muestras de aleta de 20 juveniles de *Piaractus brachypomus*, entre 30 y 60 días de nacidos, de reproductores mantenidos en cautiverio por largo tiempo, y provenientes de cuatro estaciones piscícolas (A, B, C y D) localizadas en cercanías de Villavicencio (4°9' N, 73°38' W) (véase Figura 1). Los juveniles, en cada estación piscícola, fueron obtenidos al azar, debido a que toda la progenie de una misma edad y provenientes de diferentes reproductores se mantienen agrupados en grandes estanques. Como control intraespecífico se tomaron 5 individuos adultos provenientes del medio natural (río Meta), y localizados en la estación piscícola en San José de Nus (SJM) (6°14' N, 75°1' W), donde han permanecido por siete años para docencia e investigación. Estos individuos conservan la composición genética original de la especie, ya que no han tenido reposición. Como grupo control interespecífico se tomaron 10 individuos, 5 de *Colossoma macropomum* y 5 de *Brycon moorei*, ambas de la familia Characidae, de las subfamilias Serrasalminae y Bryconinae, obtenidos de los ríos Meta y Magdalena respectivamente. Las muestras de aletas de los individuos fueron mantenidos en tubos de ensayo que contenían 100% etanol y guardados a 4°C para posterior análisis.

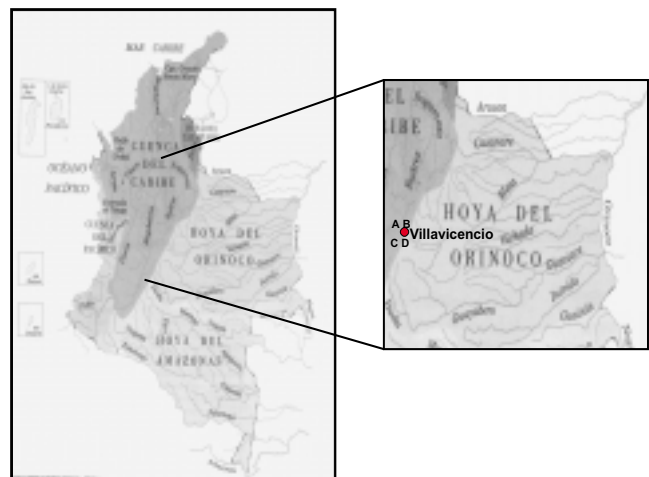


Figura 1. Villavicencio y cuadro estaciones piscícolas de muestreo de juveniles de *Piaractus brachypomus*. Localización del río Meta.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo descrito por Murray & Thompson (16), al cual se le hicieron algunas modificaciones para peces. Las aletas fueron pulverizadas con nitrógeno líquido y depositadas en tubos eppendorf con 1 ml de tampón de lisis (0.4 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 2% CTAB). El homogenizado fue incubado por cuatro horas a 65°C con 20 ml de proteinasa K (20 mg/ml) y centrifugado por 12000 rpm por 5 minutos a 4°C. Pasos sucesivos con fenol, fenol/cloroformo (1:1) y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) fueron realizados al sobrenadante en cada paso, luego de centrifugado a 12000 rpm durante 5 minutos entre cada uno de los pasos. Después de la última centrifugación, se adicionó isopropanol (2:1) al sobrenadante para permitir la precipitación del ADN. Se adicionó 20 ml de 3M C₂H₃O₂Na pH 5.2 a las muestras y fueron mantenidas a -20°C por una hora o de un día para otro. Después de una centrifugación de 12000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 300 ml de etanol al 70%; el ADN se dejó secar a temperatura ambiente, y se resuspendió en 30 ml de TE. La solución fue incubada durante 15 minutos a 60°C para permitir su disolución. La cuantificación de ADN se realizó en un espectrofotómetro PerkinElmer®, USA. Para conocer la variación genética existente en cada una de las estaciones piscícolas, se preparó una mezcla total de ADN con 20 ml (50 ng/ml) proveniente de cada uno de los individuos que integran cada muestra.

Condiciones de amplificación

La reacción de amplificación de ADN fue realizada en un termociclador PTC 100 (MJ Research®, USA), con el siguiente rango de temperaturas descrito por Yu & Pauls, (25): un ciclo de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos: 94°C por 35 segundos, 36°C por 35 segundos y 72°C por un minuto. El volumen de reacción fue de 25 ml que contenía: 10 ng de ADN molde, 10 pmol del iniciador de RAPD a probar, 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Promega®, USA), 0.2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Promega®, USA), 2 mM de MgCl (Promega®, USA) y 2.5 ml de tampón Taq 10X. Un control negativo, con todos los reactivos excepto el ADN molde, fue incluido en todas las amplificaciones. Las condiciones de reacción fueron estandarizadas con resultados similares en los casos repetidos.

Detección de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron corridos en geles de poliacrilamida al 4%. Para conocer el tamaño de cada uno de los fragmentos de ADN obtenido se utilizó un marcador de peso molecular de ADN (20), su visualización se hizo mediante tinción con plata (Promega®, USA) siguiendo el protocolo descrito por Dinesh *et al* (2). La lectura de los geles fue realizada por dos personas de manera independiente.

Análisis de los datos

Dos kits de 20 iniciadores cada uno (OPA y OPB) con un tamaño de 10 nucleótidos por iniciador, con al menos 60-70% de contenidos de GC, fueron adquiridos de Operon Technologies®, USA. Solo se consideraron los fragmentos intensos y reproducibles entre 222 y 2.645 pb, a los que se les asignó 1 (presencia) ó 0 (ausencia) con relación a los otros grupos comparados en un gel de poliacrilamida al 4%, y con un mismo iniciador (véase Figura 2), lo anterior proporcionó una matriz de comparación para el cálculo de la Distancia Genética (DG). Los iniciadores de RAPD que no produjeron fragmentos nítidos fueron OPA-12, OPB-02, OPB-03, OPB-09, OPB-16 y OPB-19.

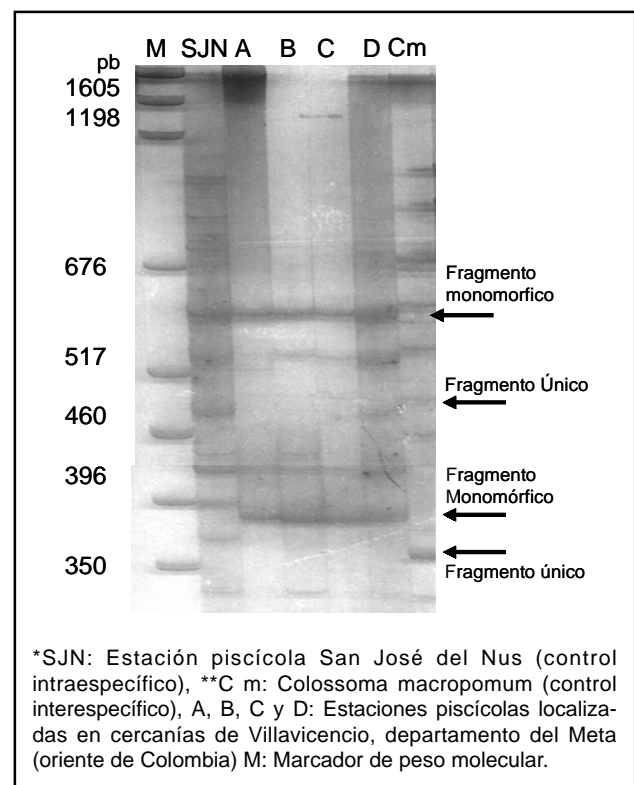


Figura 2. Fragmentos de RAPD generados en cinco estaciones piscícolas. Iniciador OPA-17.

Los valores de Distancia Genética (DG) se calcularon mediante la fórmula de Nei y Li (17):

$$DG_{ij} = 1 - [2n_{ij} / (n_i + n_j)]$$

donde n_{ij} es el número total de fragmentos compartidos por dos grupos, y n_i y n_j son el número total de fragmentos en los grupos i y j , respectivamente. El soporte de ramas (3, 4) del dendrograma Neighbour Joining (NJ) (19) fue obtenido mediante 10.000 réplicas realizado con el programa de computador PAUP* 4.0 (21).

Resultados

Treinta y cuatro (85%) de los cuarenta diferentes iniciadores de RAPD utilizados, produjeron 1168 fragmentos amplificados, reproducibles y consistentes, de los cuales, 440 correspondieron a fragmentos únicos (véase Tabla 1), sugiriendo un alto número de fragmentos amplificados para estas especies. En

Piaractus brachypomus, se presentaron 666 fragmentos de los cuales un número mayor de ellos correspondió al control intraespecífico SJN (261), y números menores se presentaron en los juveniles provenientes de estaciones piscícolas en los Llanos Orientales (véase Tabla 1). De la misma manera y conservando la misma tendencia, se obtuvieron los fragmentos únicos en todos los grupos de individuos analizados (véase Tabla 1). El porcentaje de fragmentos únicos obtenido, de los juveniles provenientes de las estaciones piscícolas en cercanías de Villavicencio fue bajo, entre 14.6% y 27.9%, respecto al control intraespecífico SJN (33.3%) (véase Tabla 1). Los números de fragmentos totales y únicos más altos se observaron en los individuos del control interespecífico (véase Tabla 1). Los iniciadores OPA-05, OPA-06, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-15, OPA-019, OPB-01, OPB-05, OPB-12 y OPB-18 produjeron fragmentos amplificados de ADN únicos, los cuales discriminaron entre individuos provenientes de diferentes estaciones piscícolas.

Tabla 1. Resumen de fragmentos amplificados de ADN mediante PCR utilizando 34 iniciadores de RAPD (OPA Y OPB) en *Piaractus brachypomus* provenientes de estaciones piscícolas colombianas.

Muestra	Número total de fragmentos	Número promedio de fragmentos por iniciador	Número total fragmentos únicos	Porcentaje de fragmentos únicos (%)
SJN*	261	7.7	87	33.3
A	130	3.8	19	14.6
B	61	1.8	17	27.9
C	46	1.4	9	19.6
D	168	5.0	33	19.6
Subtotal	666	-----	132	-----
C m**	264	7.8	142	53.8
B m**	238	7.0	133	55.9
Total	1168	-----	440	-----

*SJN: Estación piscícola San José del Nus (control intra específico), **C m: *Colossoma macropomum* y **B m: *Brycon moorei* (controles inter específicos), A, B, C y D: Estaciones piscícolas localizadas en cercanías de Villavicencio, departamento del Meta (oriente de Colombia).

En *Piaractus brachypomus* las distancias oscilaron entre 0.150 (SJN vs A) y 0.401 (SJN vs C) (véase Tabla 2). Para los controles interespecíficos, los valores de DG oscilaron entre 0.239 (SJN vs *Colossoma macropomum*) y 0.563 (B vs *Brycon moorei*) (véase Tabla 2). El dendrograma NJ presentó un agrupamiento de los juveniles pertenecientes a las

estaciones piscícolas cercanas a Villavicencio, distante de los grupos control intra e inter específicos (véase Figura 3).

El soporte de ramas en un árbol filogenético presenta la confiabilidad de la relación existente entre los grupos comparados (4). El dendrograma NJ

Tabla 2. Distancia Genética estimados según la fórmula de Nei y Li (1979) en individuos obtenidos de diferentes estaciones piscícolas colombinas considerando presencia (1) /ausencia (0) de los fragmentos de ADN amplificados mediante 34 iniciadores de RAPD.

Muestras	SJN*	A	B	C	D	C m**	B m**
SJN*	—						
A	0.150	—					
B	0.325	0.203	—				
C	0.401	0.239	0.253	—			
D	0.163	0.158	0.239	0.215	—		
C m**	0.239	0.318	0.539	0.530	0.281	—	
B m**	0.264	0.308	0.563	0.554	0.288	0.258	—

*SJN: Estación piscícola San José del Nus (control intra específico), **C m: *Colossoma macropomum* y **B m: *Brycon moorei* (controles inter específicos), A, B, C y D: Estaciones piscícolas localizadas en cercanías de Villavicencio, departamento del Meta (oriente de Colombia).

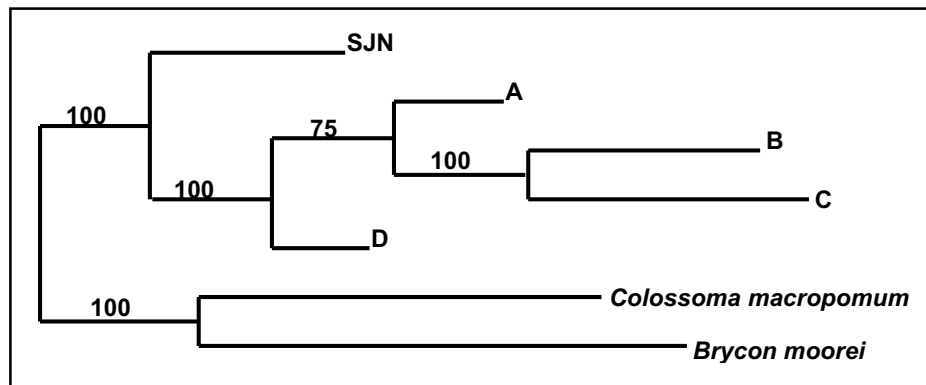


Figura 3. Dendrograma NJ con la relación existente entre los individuos de *Piaractus brachypomus* obtenidas de diferentes estaciones piscícolas. Soporte de ramas 10.000 réplicas.

obtenido en este estudio presentó altos valores de discriminación (75-100) entre los diferentes grupos de individuos comparados (véase Figura 3).

Discusión

El número de fragmentos totales obtenidos es significativo para las especies de la familia Characidae, y se constituye en un acercamiento de tipo genético a estas especies, ya que no se han realizado estudios previos en ellas.

La variación observada mediante esta técnica, se fundamentó en el número de fragmentos únicos que se pueden encontrar en el genoma de un determinado grupo de individuos comparados, los cuales se generan a partir de iniciadores de diez nucleótidos que

encuentran un sitio de unión en el genoma y no están en otros (22, 23). Considerando lo anterior, los juveniles provenientes de grupos de reproductores localizados en estaciones piscícolas en los Llanos Orientales, presentaron un porcentaje menor de fragmentos únicos comparados con el grupo de individuos provenientes del medio natural, lo que sugiere un alto porcentaje de fragmentos compartidos, esto es, una similitud entre los grupos de reproductores en cautiverio. Este resultado es factible, ya que los propietarios de las estaciones piscícolas vecinas a Villavicencio, han estado realizando los apareamientos necesarios entre reproductores disponibles en las cercanías (piscicultores, comunicación personal).

El muestreo realizado en las estaciones piscícolas sólo representó una parte de la variación genética total

existente en el medio natural, por lo que dejó abierta la posibilidad de la renovación del plantel de reproductores mediante los apareamientos controlados con individuos nativos, con el fin de mantener la variación en cautiverio. La protección de reproductores localmente adaptados y genéticamente diferenciados en las fuentes naturales, promueve la productividad y el sostenimiento de los recursos pesqueros por largos períodos, permitiendo un mayor desarrollo de esta actividad.

Para los peces se han reportado en la literatura, efectos deletéreos en individuos cercanamente relacionados, como reducción en viabilidad, supervivencia y crecimiento, disminución en la producción de ovas y aumento de fenotipos anormales (6), ninguno ha sido reportado en Colombia, lo cual no quiere decir que no se estén presentando. Por lo tanto, debe ser implementado un programa apropiado de manejo de apareamientos de individuos en confinamiento para preservar la variación genética y prevenir una disminución de la eficacia biológica, ya que en caso de fomentar la repoblación en zonas de pesca deprimidas, el componente genético es de vital

importancia para el seguimiento de los individuos. Así mismo, es necesario el fomento de programas de mejoramiento genético con el fin de obtener individuos lo suficientemente competitivos a nivel internacional con buena calidad de carne, bajo número de espinas y buen tamaño de filete.

El bajo número de individuos, no proporciona una sobre estimación de las distancias genéticas obtenidas, ya que la confiabilidad de los resultados tiene un buen soporte de ramas en 10.000 réplicas, lo que sugiere una topología ajustada al fenómeno que se observa en las estaciones piscícolas (véase Figura 3).

En este trabajo, la técnica de RAPD fue apropiada para discriminar entre individuos provenientes del medio natural y de cultivo e inferir el manejo pesquero. Además, se confirmó la relación taxonómica existente entre *Piaractus brachypomus*, *Colossoma macropomum* y *Brycon moorei* descrita previamente por Dalh (1), Gery (7), Howes (10) y Machado Allison (14) mediante datos morfológicos, y Orti *et al* (18), a través de la comparación de secuencias de ARN ribosomal.

Agradecimientos

Agradecemos a Camilo Prieto, Carlos Marín y al personal en las diferentes estaciones piscícolas en Villavicencio y San José del Nus por su colaboración con la toma de muestras. Este trabajo fue financiado por *Comité para el Desarrollo de la Investigación* (CODI) Universidad de Antioquia, COLCIENCIAS (contrato N° 1115-09-10859) y Laboratorio Genes Ltda.

Summary

Genetic variation analysis in *Piaractus brachypomus* (Pisces, Characidae) in Colombian hatcheries by the use of RAPD

Information on genetic variation in cultured fish species is essential for an appropriate animal management both in the wild and in captivity. In this study was used the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to evaluate the genetic variation in juveniles of *Piaractus brachypomus* (Characiformes, Characidae, Serrasalminae) from four hatcheries located near Villavicencio, Meta department (eastern Colombia). It were considered as an intra specific control, the progeny of broodstocks from the wild, and as an inter specific controls were used the individuals of the family Characidae; *Colossoma macropomum*, of the subfamily Serrasalminae and *Brycon moorei* of the subfamily Bryconinae. Thirty four out of forty RAPD primers, kits OPA and OPB with 20 primers each (10 nucleotides per primer), yielded 1168 amplified fragments of DNA, of which 440 were unique fragments that discriminated among individuals in this study. The Genetic Distance (DG) showed that juveniles of *Piaractus brachypomus* had a lower distance respect to the intra specific control from the wild, suggesting a decrease genetic variation manifested in a lower number of unique fragments. Possibly caused by the use of the same broodstock confined, no renewed, in the

reproductive zones. Anthropogenic effects in the region such as the water pollution by agrochemicals, the overfishing, the deforestation and the river sedimentation have decreased the individuals number in the fishing zones, forcing farmers to have a reduced broodstock numbers. Colossoma macropomum and Brycon moorei got apart from the Piaractus brachypomus cluster, giving validity to the taxonomic classification, as different species.

Key words: *Bryconinae, fishing management, fishes, Serrasalminae.*

Referencias

- Dahl G. Los peces del norte de Colombia. Bogotá. Litografía Arco. 1971
- Dinesh KR, Lim TM, Chua KL, Chan WK, Phang VPE. RAPD analysis: an efficient method of ADN fingerprinting in fishes. Zoological Sc. 1993; 10:849-854.
- Efron B. Bootstrap methods: another look at the jackknife. Ann Statist, 1979, 7:1-26.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 1985, 39:783-791.
- Ferguson M. The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes. In Carvalho, Pitcher, (eds): Molecular genetics in fisheries. Chapman & Hall, London, 1994. 103 pp.
- Ferguson M, Danzmann RG. Fish diseases and disorders: Genetic disorders. Eds JF Leatherland y PTK Woo. Vol. 2. Cab International. London. 1998. pp.19-36
- Gery J. Characoids of the world. New Jersey. Publications Inc. Ltd. 1977.
- González-AR. El cultivo de la Cachama. In Rodríguez-GH, Daza PV, Carrillo-AM. (eds.): Fundamentos de acuicultura continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Grafimpresos Quintero, Bogotá. 2001. 423 pp.
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK. Eds. Molecular systematics. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, 655pp. 1996.
- Howes G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). Bull Br Mus (Nat Hist) Zool. 1982, 43:1-47.
- Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Fishing statistical annual report. Grafimpresos Quintero, Bogotá, 2000. 350 pp.
- Koh TL, Khoo G, Fan LQ, Phang VPE. Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of *Discus* (*Symphysodon* spp.) as revealed by Random Amplified Polymorphic ADN (RAPD) fingerprinting. Aquaculture 1999, 73: 485-497.
- Kuusipalo L. Genetic differentiation of endemic Nile perch *Lates stappersi* (*Centropomidae*, *Pisces*) populations in Lake Tanganyika suggested by RAPD markers. Hydrobiologia 1999, 407:141-148.
- Machado-AA. Estudios sobre la familia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte I. Discusión sobre la condición monofilética de la subfamilia. Acta Biol Venez 1983, 11: 145-196.
- Merino-AMC. Problemática ambiental de la conservación de poblaciones naturales de peces en la Orinoquía Colombiana. Rev Col Cien Pec. Sup. 2004.
- Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl Acids Res 1980, 8: 4321-4325.
- Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA. 1979, 16:5269-5273.
- Ortí G, Petry P, Porto JIR, Jegu M, Meyer A. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of Piranhas. J Mol Evol 1996, 42: 169-182.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987, 4:406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- Swofford DL. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), version 4.0. Sinauer Ass., Sunderland, Massachusetts. 1996.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl Acids Res 1990, 18:7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. ADN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res 1990, 18: 6531-6535.
- Yoon JM, Kim GW. Randomly Amplified Polymorphic ADN-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) analysis of two different populations of cultured Korean catfish *Silurus asotus*. J Biosc 2001, 26:641-647.
- Yu K, Pauls KP. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. Nucl Acids Res 1993, 20:2606.