



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE  
INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO**

**INTEGRAL REGIONAL**

**UNIDAD-SINALOA**



---

**DEPARTAMENTO DE ACUACULTURA**

**“ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN GENES CANDIDATOS Y SU  
ASOCIACIÓN A LA CALIDAD DE HUEVO Y JUVENILES EN POBLACIONES  
DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)”**

**BREIDY LIZETH CUEVAS RODRÍGUEZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**GUASAVE, SINALOA, ENERO DEL 2016**



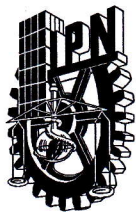
**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día 25 del mes de Noviembre del año 2015, el (la) que suscribe **MC. Breidy Lizeth Cuevas Rodríguez** alumno(a) del Programa del **Doctorado en ciencias en Biotecnología**, con número de registro B110364, adscrito(a) al **CIIDIR-SINALOA**, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) **Dr. Hervey Rodríguez González y Dra. Ana María Sifuentes Rincón** y cede los derechos del trabajo titulado Análisis de polimorfismos de genes candidatos y su asociación a calidad de huevo y juvenil en poblaciones de tilapia *Oreochromis niloticus*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones **breidyc@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**MC Breidy Lizeth Cuevas Rodríguez**  
Nombre y firma del alumno(a)



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 12: 00 horas del día 06 del mes de Diciembre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa

para examinar la tesis titulada:

Análisis de polimorfismos en genes candidatos y su asociación a calidad de huevo y juvenil en poblaciones de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Presentada por el alumno:

Cuevas  
Apellido paterno

Rodríguez  
Apellido materno

Breidy Lizeth  
Nombre(s)

Con registro: 

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 1 | 1 | 0 | 3 | 6 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

\_\_\_\_\_  
Dr. Hervey Rodríguez González

\_\_\_\_\_  
Dra. Ana María Sifuentes Rincón

\_\_\_\_\_  
Dr. Antonio Luna González

\_\_\_\_\_  
Dr. Cipriano García Gutiérrez

\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

\_\_\_\_\_  
Dra. Diana Cecilia Escobedo Urías



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCIÓN

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Sinaloa y el Centro de Biotecnología Genómica (CBG) Unidad Reynosa, Tamaulipas del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la dirección del Dr. Hervey Rodríguez González y Dra. Ana María Sifuentes Rincón. La autora agradece el apoyo económico otorgado por IPN como becario PIFI y del programa de becas. Así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada CVU 269508 durante la realización de este trabajo.

*A lo que más amo:*

*Mathias y Paco*

## *Agradecimientos*

*A mi papi Faustino Cuevas que en el lugar donde te encuentres sé que estas a mi lado y me ayuda para salir adelante. A mi mami Graciela Rodríguez te doy las gracias por estar siempre a mi lado siendo parte fundamental en mi vida brindándome todo tu amor y comprensión, y sobre todo, por la confianza y el apoyo para realizar una meta más en mi vida si usted esto no hubiera sido posible.*

*A mi hermanos René, Roque, Lorena, Víctor, Germán, Marlene, Fredy, Edith y Faustino, gracias por estar siempre apoyándome y nunca decirme que no cuando los necesitaba los quiero mucho. A mi familia Política: Valdez Pardini, Valdez Gutiérrez, Valdez Castro y Valdez Espinoza, gracias por su apoyo.*

*A Dios que me dio la oportunidad de disfrutar y compartir con mi familia y amigos de una etapa más en mi vida.*

*A mi director de tesis Dr. Hervey Rodríguez por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica pero sobre todo por su amistad. Así como a la Dra. Ana María Sifuentes Rincón por su apoyo y la dirección de este trabajo, muchas gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted.*

*A los miembros del comité tutorial: Dr. Antonio Luna González, Dr. Cipriano García Gutierrez, y Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez; por sus comentarios, críticas y observaciones acertadas que sirvieron para realizar un mejor trabajo y sobre todo por el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo.*

*A mis amigas Ma. Del Carmen, Blanca y Cesar, así como también a mis amiguitas de cafecito Aye, Nadia y Sandra, creo que con ustedes he adquirido mis mejores conocimientos, por su amistad y el apoyo brindado en la realización de este trabajo.*

*Arturo Polanco Torres y Elisara López gracias por todo el apoyo y enseñanzas brindadas.*

*A todas y cada una de las personas que de una u otra forma fueron parte de la realización de este trabajo.*

**Gracias !!!**

## Índice general

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Índice general</b>   | <b>I</b>    |
| <b>Índice de tablas</b>   | <b>VI</b>   |
| <b>Glosario</b>   | <b>VII</b>  |
| <b>Abreviaturas</b>   | <b>XIV</b>  |
| <b>Abstract</b>   | <b>XVI</b>  |
| <b>Resumen</b>  | <b>XVII</b> |
| <b>1.-Introducción</b>  | <b>23</b>   |
| <b>2.- Antecedentes</b>   | <b>25</b>   |
| <b>2.1.-Acuacultura en México</b>   | <b>25</b>   |
| <b>2.1.2.-Principales estados productores</b>   | <b>26</b>   |
| <b>2.1.3.- Cultivo de tilapia</b>   | <b>27</b>   |
| <b>2.2.-Datos biológicos básicos de tilapia</b>   | <b>27</b>   |
| <b>2.2.1.-Descripción taxonómica y morfológica de tilapia del género <i>Oreochromis</i></b> | <b>27</b>   |
| <b>2.3.-Hábitat</b>   | <b>28</b>   |
| <b>2.4.- Reproducción y sexualidad</b>  | <b>29</b>   |
| <b>2.5.-Crecimiento y desarrollo</b>  | <b>29</b>   |
| <b>2.6.- Ventajas del cultivo de tilapia</b>  | <b>30</b>   |
| <b>2.7.- Calidad de huevo</b>   | <b>30</b>   |
| <b>2.8.-Calidad de Juvenil</b>  | <b>32</b>   |

|   |    |
|---|----|
| 2.8.1.-Pruebas de estrés  | 32 |
| 2.9.-Estrategias biotecnológicas  | 33 |
| 2.9.1.-Selección por prueba de progenie   | 34 |
| 2.9.2.-Herramientas moleculares y la búsqueda de genes candidatos                   | 35 |
| 2.9.3.-Genes seleccionados para la búsqueda de nuevos polimorfismos SNPs            | 38 |
| 2.9.3.1.- GH (Hormona de crecimiento)   | 38 |
| 2.9.3.2.- IGF- I (Factor de crecimiento de la insulina tipo I)                      | 39 |
| 2.9.3.3.-Miogenina (MyoG)   | 40 |
| 3.- Objetivo general  | 41 |
| 3.1.- Objetivos específicos   | 41 |
| 4.- Hipótesis   | 42 |
| 5.- Materiales y Métodos  | 42 |
| 5.1.- Evaluación de la progenie de tres poblaciones de <i>Oreochromis niloticus</i> | 42 |
| 5.1.2.-Calidad de huevo   | 42 |
| 5.2. Calidad de Juvenil   | 44 |
| 5.2.1- Bioensayo de crecimiento   | 44 |
| 5.2.1.1.- Sistema de cultivo  | 44 |
| 5.2.1.2 - Evaluación de bioensayos de crecimiento de juveniles de tres poblaciones  | 44 |
| 5.2.1.3.-Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos                                 | 45 |
| 5.2.1.3.- Calidad de Juvenil  | 45 |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>5.3.- Determinación de LT<sub>50</sub> y LC<sub>50</sub> para amonio total, salinidad e hipoxia en juveniles de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i></b>   | <b>45</b> |
| <b>5.4- Análisis estadístico</b>  | <b>46</b> |
| <b>5.4. Búsqueda de nuevos polimorfismos de tres genes candidatos en reproductores de tres poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i>.</b>  | <b>47</b> |
| <b>5.4.1. Selección de la muestra</b>   | <b>47</b> |
| <b>5.4.2. Extracción de ADN</b>   | <b>47</b> |
| <b>5.4.2.1. Aislamiento de ADN</b>  | <b>47</b> |
| <b>5.4.2. Cuantificación y Verificación de la calidad del DNA</b>   | <b>48</b> |
| <b>5.4.3.- Selección de los oligonucleótidos para la búsqueda de nuevos polimorfismos de reproductores de tres poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i>.</b>  | <b>48</b> |
| <b>5.4.3.1-Gen Hormona de crecimiento (GH)</b>  | <b>48</b> |
| <b>5.4.3.2.- IGF1 (Factor de crecimiento insulínico tipo 1)</b>   | <b>49</b> |
| <b>5.4.3.3. MyoG (Miogenina)</b>  | <b>50</b> |
| <b>5.5.- Optimización de las reacciones de PCR</b>  | <b>51</b> |
| <b>5.5.1.- Búsqueda de Polimorfismos</b>  | <b>52</b> |
| <b>5.5.1.1.- Secuenciación de los fragmentos de PCR de los genes GH, IGF-I y Myo</b>  | <b>52</b> |
| <b>5.5.1.2.- Análisis de las secuencias y detección de los SNPs</b>   | <b>53</b> |
| <b>5.6.- Validación de polimorfismos GHpA1 G/A, GHpB1 T/C y MyoG C/T de población de descubrimiento en genes observados en genes candidatos para crecimiento en poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i>.</b> | <b>54</b> |
| <b>6.- Resultados</b>   | <b>55</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6.1.- Variables de calidad de huevo evaluadas en poblaciones de tilapia <i>O.niloticus</i>.</b>   | <b>55</b> |
| <b>6.1.1.- Variables relacionadas con el desempeño reproductivo de poblaciones de <i>O. niloticus</i></b>  | <b>55</b> |
| <b>6.2.-Tamaño y composición bioquímica de huevos de hembras de tres poblaciones de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i></b>   | <b>56</b> |
| <b>6.3.- Análisis de contenido químico (Proteína, Lípidos y Carbohidratos) en el huevos de tres poblaciones de hembras de tilapia <i>O. niloticus</i></b>  | <b>57</b> |
| <b>6.4.- Evaluación de Calidad de Juvenil</b>  | <b>58</b> |
| <b>6.4.1.- Bioensayo de crecimiento</b>  | <b>58</b> |
| <b>6.4.2.- Contenido bioquímico en el juvenil después de 45 días de cultivo de poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i>.</b>   | <b>59</b> |
| <b>6.4.3.- Determinación de <math>LT_{50}</math> para amonio total, salinidad e hipoxia en juveniles de tilapia <i>O. niloticus</i>.</b>   | <b>62</b> |
| <b>6.4.4 Datos obtenidos de mortalidad obtenida de <math>LC_{50}</math> calculada en las tres poblaciones de tilapia <i>O.niloticus</i>.</b>   | <b>63</b> |
| <b>6.5.-Búsqueda de variación genética de genes candidatos para crecimiento en poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i></b>  | <b>65</b> |
| <b>6.5.1.- Identificación de los polimorfismos</b>   | <b>65</b> |
| <b>6.5.1.2.- Polimorfismos en el gen GH</b>  | <b>65</b> |
| <b>6.5.1.3.- Polimorfismos SNP's en el gen IGF -I</b>  | <b>66</b> |
| <b>6.5.1.4.- Polimorfismos SNP's en el gen MyoG</b>  | <b>67</b> |
| <b>6.6.- Validación de polimorfismos GHpA1 G/A, GHpB1 T/C y MyoG C/T de población de descubrimiento en genes observados en genes candidatos para crecimiento en poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i></b> | <b>67</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6.6.1.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los marcadores (GHpA1 G/A y GHpB1 T/C)</b>                                    | <b>68</b> |
| <b>7.- Discusiones</b>   | <b>69</b> |
| <b>7.1.- Calidad de huevo</b>  | <b>69</b> |
| <b>7.2.- Calidad de juvenil de juveniles de tilapia <i>O. niloticus</i></b>  | <b>72</b> |
| <b>7.3.- Búsqueda de variación genética de genes candidatos para crecimiento en poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i></b> | <b>75</b> |
| <b>8.- Conclusiones</b>  | <b>78</b> |
| <b>9.- Referencias bibliográficas</b>  | <b>79</b> |

## Índice de figuras

| <b>Número</b> | <b>Título</b>   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| Figura 1      | Correlación entre las variables de contenido químico y talla de huevos de hembras de tilapia <i>O. niloticus</i>  | 41            |
| Figura 2      | Correlación negativa entre las variables de contenido de lípidos en el juvenil y el contenido de proteínas en juveniles de poblaciones <i>O. niloticus</i> después de 45 días de cultivo. | 45            |
| Figura 3      | Correlación positiva entre las variables de estrés (Amonio) y el contenido de carbohidratos en el huevo.  | 49            |

## Índice de tablas

| Número   | Título   | Página |
|----------|--|--------|
| Tabla 1  | Características de desarrollo y crecimiento de tilapia   | 11     |
| Tabla 2  | Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen GH  | 30     |
| Tabla 3  | Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen IGF-I   | 31     |
| Tabla 4  | Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen MyoG  | 32     |
| Tabla 5  | Programas empleados para las amplificaciones del gen GH  | 33     |
| Tabla 6  | Programas empleados para las amplificaciones del gen IGF-I   | 33     |
| Tabla 7  | Programas empleados para las amplificaciones del gen Myod  | 34     |
| Tabla 8  | Protocolo para la purificación de productos de PCR   | 34     |
| Tabla 9  | Descripción de secuencias de iniciadores y sondas para validación de marcadores de tipo SNPs GHpA1 G/A, GHpB1 T/C y MyoG C/T en poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i> | 36     |
| Tabla 10 | Número de desoves e infértiles, peso húmedo y seco, número de huevos y porcentaje de eclosión de hembras de tres poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i>                | 39     |
| Tabla 11 | Promedio más desviación estándar de Longitud mayor, menor, volumen y área de huevos de hembras de 3 poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i>                             | 42     |
| Tabla 12 | Contenido bioquímico (Proteína, Lípidos y carbohidratos) de huevos de hembras de tilapia <i>O. niloticus</i>   | 43     |
| Tabla 13 | Media más desviación estándar de bioensayo de crecimiento, Peso Inicial, final longitud y supervivencia sobrevivencia de tres poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i> . | 44     |
| Tabla 14 | Contenido bioquímico (Proteína, Lípidos y carbohidratos) de juveniles de tilapia <i>O. niloticus</i>   | 46     |
| Tabla 15 | Toxicidad de diferentes concentraciones de amonio y salinidad para juveniles de tilapia <i>O. niloticus</i>  | 47     |
| Tabla 16 | Mortalidades obtenidas de pruebas de estrés (amonio y salinidad) en juveniles de tilapia <i>O. niloticus</i>   | 48     |
| Tabla 17 | Polimorfismos observados en los genes GH en la población de descubrimiento seleccionada  | 50     |
| Tabla 18 | Polimorfismos observados en el gen IGF-I en la población de descubrimiento   | 51     |
| Tabla 19 | Polimorfismos observados en el gen IGF-I en la población de descubrimiento   | 52     |
| Tabla 20 | Frecuencias genotípicas de los marcadores GHpA1 G/A y GHp B1 T/C respecto a las tres poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i>  | 53     |
| Tabla 21 | Frecuencias alelicas de los marcadores GHpA1 G/A y GHp B1 T/C respecto a las tres poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i>   | 53     |
| Tabla 22 | Frecuencias genotípicas y alelicas de los marcador MyoGC/T respecto a las tres poblaciones de tilapia <i>O. niloticus</i>  | 62     |

## Glosario

**Acuicultura:** es el conjunto de actividades, técnicas y conocimientos de crianza de especies acuáticas vegetales y animales.

**Adaptación biológica:** proceso fisiológico o rasgo morfológico o del comportamiento de un organismo que ha evolucionado durante un período mediante la selección natural de tal manera que incrementa sus expectativas a largo plazo para reproducirse con éxito.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico responsable de contener toda la información genética de un individuo o ser vivo, información que es única e irreplicable en cada ser ya que la combinación de elementos se construye de manera única.

**Aireación:** Mezcla mecánica de aire y agua, en general se refiere a un proceso al mismo tiempo que provoca una reducción en la variación genética dentro de razas, aleatoria de determinados alelos de una generación a otra.

**Alelo:** es cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen. (Producen variaciones en características heredadas como, por ejemplo, el color de ojos o el grupo sanguíneo).<sup>1</sup> Dado que la mayoría de los mamíferos son diploides, poseen dos juegos de cromosomas, uno de ellos procedente del padre y el otro de la madre. Cada par de alelos se ubica en igual locus o lugar del cromosoma.

**Biodiversidad o diversidad biológica:** según el Convenio Internacional sobre la Diversidad Biológica, el término por el que se hace referencia a la amplia variedad de seres vivos sobre la Tierra y los patrones naturales que la conforman, resultado de miles de millones de años de evolución según procesos naturales y también de la influencia creciente de las actividades del ser humano. La biodiversidad comprende igualmente la variedad de ecosistemas y las diferencias genéticas dentro de cada especie que permiten la combinación de múltiples formas de vida, y cuyas mutuas interacciones con el resto del entorno fundamentan el sustento de la vida sobre el planeta.

**Blastómero:** son un tipo de células embrionarias animales indiferenciadas resultantes de la segmentación del cigoto después de la fecundación. Estas células poseen pluripotencialidad, o sea que pueden dar origen a células de cualquier tejido excepto los que rodean al embrión.

**Blástula:** Estadio temprano de un embrión que habitualmente está formado por una esfera hueca de células, antes de que empiece la gastrulación.

**Calidad del huevo:** Potencial del huevo para producir crías (larvas) viables.

**Conservación:** El manejo del uso de la biosfera para que pueda producir el mayor

**Cromosoma:** Es el resultado del empaquetamiento del ADN y las proteínas previo a la manera aleatoria con la separación de los cromosomas en anafase. de parámetros estadísticos estándar como cuadros y distribuciones de frecuencia, medias, varianza y desviaciones estándar.

**Deriva genética:** Es un proceso natural que tiende a homogeneizar la información

**Desequilibrio del ligamiento:** a la propiedad de algunos genes de las poblaciones

**Diploide:** El número de cromosomas en la mayoría de las células, excepto en los gametos o células germinales. En los humanos el número diploide es 46. El término diploide describe el número completo de copias del genoma en una célula determinada. Di significa dos y ploide se refiere al número de copias. Así, la inmensa mayoría de las células normales contienen dos copias del genoma, cada una proveniente de cada progenitor y se conocen como células diploides.

**Distancia genética:** El grado de afinidad entre subgrupos o poblaciones estimado mediante diversos estadísticos.

**Diversidad biológica:** La totalidad de genes, especies y ecosistemas en una región dada, sea ésta un microhábitat o la biosfera. Se llama también biodiversidad.

**Diversidad de especies:** Es una función de la distribución y abundancia de las especies.

**Diversidad genética:** Es la variación en la composición genética de los individuos dentro de la especie o entre especies diferentes; es la variación genética hereditaria dentro de las poblaciones y entre ellas.

**Domesticación:** Evolución de las plantas o los animales, de manera natural o por selección artificial, hacia las formas más útiles para el hombre.

**Eclosión.-** Proceso en el cual se rompe el corion o envoltura del huevo y emerge la larva vitelina

**Embrión:** Fase inicial del desarrollo de un organismo, mientras éste se encuentra contenido dentro de las membranas del huevo o dentro del cuerpo materno.

**Endogamia:** Apareamiento entre individuos de un mismo linaje.

**Enzima:** Proteína que cataliza una reacción química específica

**Especie:** se denomina especie (del latín *species*) a cada uno de los grupos en que se dividen los géneros, es decir, la limitación de lo genérico en un ámbito morfológicamente concreto.

**Factor de conversión alimenticia.-** Se determina estableciendo la relación entre el alimento proporcionado y la ganancia de peso en el tiempo de administración del alimento.

**Fenotipo:** Apariencia física de un organismo, producto de la interacción de su genotipo y el ambiente en el que se encuentra.

**Gástrula:** Estadio temprano del desarrollo embrionario en el que los blastómeros, por medio de movimientos morfogenéticos, forman las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo)

**Gen:** La unidad física y funcional de la herencia, que se pasa de padres a hijos. Los genes están compuestos por ADN y la mayoría de ellos contiene la información para elaborar una proteína específica.

**Genética de poblaciones:** El estudio cuantitativo y la medida de las poblaciones en términos estadísticos; por ejemplo, el estudio de los fenómenos genéticos en función genéticas de no segregar de forma independiente, esto es, poseen una frecuencia de

**Genoma:** Todo el ADN contenido en un organismo o célula, que incluye tanto los cromosomas dentro del núcleo como el ADN en las mitocondrias.

**Genotipo:** La identidad genética de un individuo que no se muestra como características externas.

**Glóbulo de aceite:** Lisosomas modificados que adquieren forma esférica y que se forman al fusionarse las vesículas de vitelo, muchas especies presenta uno o más glóbulos en, o cerca de, la masa vitelina. Sirve inicialmente como una estructura de flotación o equilibrio y que al consumirse es utilizado como fuente de energía.

**Glucógeno:** Polisacárido compuesto exclusivamente por unidades de glucosa, utilizado para almacenar energía en las células animales.

**Glucólisis:** Proceso catalizado por enzimas, mediante el cual una molécula de glucosa se convierte anaeróticamente en dos moléculas de ácido pirúvico.

**Gluconeogénesis:** Biosíntesis de un glúcido a partir de precursores más sencillos no glucídicos tales como oxalacetato o piruvato. Ruta por la que se sintetiza glucosa a partir de sustratos no glucídicos.



**Haploide:** Una dotación sencilla de cromosomas (la mitad de la serie completa de material genético) presente en cada óvulo y célula espermática de los animales.

**Heterocigoto:** Que posee dos formas diferentes de un gen en particular; cada una heredada de cada uno de los progenitores. Un individuo diploide que tiene diferentes alelos en uno o varios *loci* genéticos. (Del griego: heteros, igual).

**Homocigoto:** Que posee dos formas idénticas de un gen específico heredadas de cada uno de los progenitores.

**Informatividad:** Para un marcador genético, la probabilidad de que un descendiente de una pareja sea informativo, es decir, que se pueda deducir el origen parental de cada uno de los alelos de ese locus.

**Locus:** El lugar del cromosoma donde está localizado un gen específico, es la dirección física del gen. El plural es "*loci*". los ciclos biológicos de los organismos en cuestión.

**Marcador microsatélite:** Un tipo de secuencia simple de longitud polimorfa de unidades di, tri o tetranucleótidos repetidas en tándem. También llamadas repeticiones cortas en tándem (STR por sus siglas en inglés).

**Metabolismo:** Suma total de los procesos químicos catalizados por enzimas, que tienen lugar en las células vivas.

**Mutación:** Cambio en el ADN que modifica su información génica. Puede darse por inserción, sustitución o pérdida de nucleótidos. Comúnmente se emplea también para designar un cambio en el número o en la disposición de los cromosomas.

**Nucleótido:** Monómero de ácidos nucleicos, cada uno con tres partes: un azúcar (ribosa o desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada; el fosfato está unido al azúcar y al carbono 5' y a la base del carbono 1'.

**Ontogenia:** Comprende la serie de cambios morfo fisiológicos que ocurren durante el ciclo de vida de los animales, incluyendo a los peces.

**Oreochromis:** es un gran género de tilapiine cíclidos, peces endémicos de África. Los miembros de este género, así como las de los géneros *Tilapia* y *Sarotherodon*, comparten el nombre común "tilapia".

**Organogénesis:** Fase del desarrollo embrionario donde se lleva a cabo la formación de los órganos.

**Población:** Biológicamente hablando, debe llenar las siguientes características: a) ser un grupo de organismos de una especie, b) que puedan intercambiar genes, c) que interactúen, d) que se desarrollen bajo condiciones ambientales similares, e) que se encuentren bajo la influencia de sus propios efectos sobre el ambiente y la de sus vecinos y f) cuya selección natural está afectada por sus atributos demográficos y por el medio físico y biótico.

**Polimorfismo:** Es la variación existente entre y dentro de los individuos de una población. Desde el punto de vista molecular, esta variación se denomina polimorfismo y deriva de cambios espontáneos en el ADN que van desde la sustitución, delección o inserción de un solo nucleótido (SNPs), hasta mutaciones que involucran mayores números de sitios nucleotídicos (STRs).

**Proteína:** Principal constituyente macromolecular de las células. Polímero lineal de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos, siguiendo una secuencia determinada

**Ruta de las pentosas fosfato:** Ruta metabólica estrechamente relacionada con la glucólisis durante la cual se utiliza la glucosa para generar ribosa, que es necesaria para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (Lehninger, 1995). Ruta que sirve para interconvertir hexosas y pentosas y que es fuente de equivalentes de reducción y pentosas para procesos biosintéticos satisfacer las necesidades y aspiraciones de las generaciones futuras. En estos

**Sobrevivencia.-** Número de organismos vivos después de un intervalo de tiempo, dividido por el número inicial. Generalmente expresado sobre base anual o para el periodo de cría.

**Sustrato:** Compuesto específico sobre el cual actúa una enzima tales como dinucleótidos, trinucleótidos o tetranucleótidos.

**SNP:**(*Single Nucleotide Polymorphism*, pronunciado *snip*) o polimorfismo de un solo nucleótido o es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma. Sin embargo, algunos autores consideran que cambios de unos pocos nucleótidos, como también pequeñas inserciones y delecciones (*indels*) pueden ser consideradas como SNP, siendo entonces más adecuado el término Polimorfismo de nucleótido simple.<sup>1</sup> Una de estas variaciones debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP. Si no se llega al 1% no se considera SNP y sí una mutación puntual.

**Taq ADN polimerasa:** Enzima termoestable derivada de la bacteria *Thermus aquaticus* que cataliza la síntesis de ADN.

**Tilapia.-** Grupo de peces de origen africano que habita mayoritariamente en regiones tropicales del mundo. Sus extraordinarias cualidades, como crecimiento acelerado, tolerancia a altas densidades, adaptación al cautiverio, aceptación a una amplia gama de alimentos, resistencia a enfermedades, carne blanca de calidad y amplia aceptación, han despertado gran interés comercial en la acuicultura mundial.

**Vitelo:** Sustancia nutritiva del embrión al iniciarse el desarrollo, que se encuentra acumulado en la célula sexual femenina; sus componentes principales son: proteínas, fosfolípidos y en menor grado grasas neutras y carbohidratos (fosfoglicolipoproteína) (Balinsky, 1983).

## Abreviaturas

|                         |  |
|-------------------------|--|
| ADN                     | Ácido desoxirribonucleico  |
| °C                      | Grados centígrados   |
| dNTPs                   | Desoxirribonucleótidos trifosfatados                                   |
| EDTA                    | Ácido Etilendiaminotetra-acético                                       |
| Ee                      | Error Estándar   |
| FCA                     | Factor de conversión Alimenticia                                       |
| g                       | Gramos   |
| h                       | Horas  |
| L                       | Litro  |
| m <sup>3</sup>          | Metro cúbico   |
| LM                      | Longitud Mayor   |
| Lm                      | Longitud Menor   |
| mL                      | Mililitro  |
| mg/L                    | Miligramo por litro  |
| mm                      | Microgramo   |
| µg                      | Microgramo   |
| µl                      | Microlitro   |
| ng                      | Nanogramo  |
| pb                      | Pares de bases (Nucleótidos)   |
| PIC                     | Contenido de información Polimorfica (Polymorphic Information Content) |
| PCR                     | Polymerase Chain Reaction  |
| %                       | Porcentaje   |
| PH-log(H <sup>±</sup> ) | Potencial de iones de hidrógeno  |
| SNPs                    | Polimorfismos de un solo nucleótido                                    |
| STRs                    | Repeticiones cortas en tandem  |
| Taq                     | ADN polimerasas de <i>thermus aquaticus</i>                            |

## Abstract

Variation in egg and larval quality of tilapia represents an important limiting factor for fingerling production and one of the main obstacles for its aquaculture development. The egg, larval quality and identify and validate single nucleotide variations located in candidate genes to growth of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* from three commercial sources (H1, H2 and H3) used in Mexico, was evaluated. Adult fish ( $297.03 \pm 36.28$  g) from each source ( $n = 45$ ) were labelled, cultivated in  $7.3 \text{ m}^3$  tanks at a sex ratio of 2:1 (female : male) and checked weekly. Females holding eggs or sac fry in their mouths were transferred to the hatchery to continue their incubation. Quality criteria were expressed as the number of egg and larvae produced, egg hatching rate, wet weight, size and biochemical composition (protein, lipid and carbohydrate). Larvae were evaluated in its primary nursery growth phase by means of fish weight, specific growth rate, survival and feed conversion. Ammonia and salinity stress tests were applied to 45-days-old juveniles. There was no variation for each egg quality parameter studied among the three tilapia populations ( $P > 0.05$ ). There was a significant relationship ( $y = 0.3082x - 65.836$ ;  $r = 0.80$ ;  $P < 0.05$ ) between protein and lipid content of eggs. For juveniles, significant differences ( $P < 0.05$ ) were found for the newly-hatched larvae weight, final weight, specific growth rate and carbohydrate content. There was a significant correlation between the carbohydrate content in eggs and larvae survival when the ammonia stress test was applied ( $y = 2.8846x + 7.789$ ;  $r = 0.64$ ;  $P < 0.05$ ). While in search of genetic variation of selected candidate genes for growth could be observed two transitions were identified in the promoter region of the growth hormone gene (GH), eight nucleotide changes were identified in introns and promoter region of the IGF-I gene; and a transition (T/C) was identified in the Myogenin gene (MyoG). Based on their allelic frequencies, it was possible the validation as novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of those variations located at *O. niloticus* GH and MyoG genes. We concluded that the origin of the strains of *O. niloticus* brood stock produced in Mexico, do not affect egg quality, but juvenile performance in terms of growth, carbohydrate content and survival when exposed to the salinity stress test, which could be considered as potential quality criterium. These new markers will allow explore its association to growth traits in tilapia in order to determine its potential use as assisted selection markers.

## Resumen

La variación en el huevo y la calidad de las larvas de tilapia representa un importante factor para la producción de alevines y uno de los principales obstáculos para el desarrollo de la acuicultura. La calidad del huevo y larvas fueron evaluados y correlacionados con la variación de genes candidatos para crecimiento en tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus*, utilizando tres stocks reproductivos de laboratorios de producción comercial (H1, H2 y H3) utilizados en México. Los reproductores ( $297.03 \pm 36.28$  g) de cada laboratorio de producción ( $n = 45$ ) fueron marcados (microchip), y puestos en tanques en una proporción de sexos de 2:1 (hembra: macho) para su reproducción. Semanalmente se registraban las hembras que presentaban huevos en su boca y los cuales eran extraídos para ser incubados artificialmente. Los criterios de calidad se determinó mediante la determinación de los siguientes parámetros: número de huevos y larvas producidas, tasa de eclosión de los huevos, peso húmedo, tamaño y composición bioquímica (proteínas, lípidos y carbohidratos). Las larvas se evaluaron en su fase de crecimiento, tasa de crecimiento específico, supervivencia y conversión alimenticia. Pruebas estrés (amonio y salinidad) se aplicaron a los menores de 45 días de edad. No hubo variación de cada parámetro de la calidad del huevo estudiados entre las tres poblaciones de tilapia ( $P > 0.05$ ). Para los juveniles, las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) se observó en el peso final, tasa de crecimiento específico y contenido de carbohidratos. Hubo una correlación significativa entre el contenido de carbohidratos en el huevo y la supervivencia de larvas cuando se aplicó la prueba estrés a amonio ( $y = 2.8846x + 7,789$ ;  $r = 0,64$ ;  $p < 0.05$ ). En la búsqueda de variación de genes candidatos para crecimiento seleccionados se pudo observar, dos transiciones en la región promotora del gen de la hormona de crecimiento (GH), se identificaron ocho cambios de nucleótidos en intrones y la región promotora del gen de IGF-I; y una transición (T/C) se identificó en el gen miogenina (MyoG). Sobre la base de sus frecuencias alélicas, fue posible la validación como nuevos polimorfismos de nucleótido único (SNP) de esas variaciones localizadas en genes *O. niloticus* GH y MyoG. Se concluye que el origen de las cepas de *O. niloticus* reproductores producido en México, afectan a la calidad del juvenil en crecimiento. El contenido de carbohidratos en el huevo y supervivencia a la prueba de estrés por salinidad, presentar una relación con la calidad del juvenil por lo que se recomienda ser considerado como un criterio de calidad. Las

variaciones en genes candidatos, permite generar las bases para realizar una asociación con características de crecimiento en tilapia con el fin de determinar su uso potencial como marcadores de selección asistida.

## 1.- Introducción

La contribución de la acuicultura al suministro mundial de pescado, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos ha seguido aumentando, pasando de un 3.9 % de la producción total en peso en 1970 a un 46 % en 2013 (FAO, 2014). En el mismo periodo, el crecimiento de la acuicultura fue más rápido que el de la población, ya que el suministro per cápita pasó de 0.7 kg en 1970 a 7.8 en 2012, lo que supone un crecimiento medio anual del 7 %. Con base en lo anterior se desprende que la acuicultura proporcionó el 47 % del suministro mundial de pescado para alimentación en 2013 (FAO, 2014). El cultivo de peces dulceacuícolas representa el mayor volumen de producción (56.6 %) comparado con los demás grupos de especies cultivadas (FAO, 2012). Dentro de este grupo, el cultivo de tilapia es el de mayor importancia en la acuicultura tropical, por ser una fuente importante de proteína y generación de divisas en los países con economías menos aceleradas (Fitzsimmons, 2000).

El cultivo comercial de tilapia en Latinoamérica ha crecido enormemente en los últimos 25 años (FAO, 2014). Uno de los países con potencial acuícola es México, debido a sus condiciones y preferencias económicas (FAO, 2012; Castillo-Campo, 2012). Actualmente, la tilapia se encuentra prácticamente en todos los mercados, su precio en México ha aumentado de los \$3 pesos hacia el año 1980 a valores tan altos como \$70 en el 2012 (FAO, 2014). En esta última década, México se ha distinguido por ser uno de los principales consumidores y productores de tilapia, generando anualmente más de 80,000 toneladas (FAO, 2012). En el año 2012, las importaciones de tilapia en el mercado de Estados Unidos crecieron en un 35 %. Toda esta expansión se basó en el incremento de las importaciones desde China (FAO, 2014).

Sinaloa cuenta con una de las industrias acuícolas más desarrolladas de México por sus volúmenes de producción, número de granjas en operación, estudios de investigación y personal técnico calificado. El Estado tiene más de 28,000 ha disponibles para el establecimiento de granjas productoras de camarón.

Actualmente se considera que la variación en la calidad de huevo y juveniles constituye uno de los problemas para la producción acuícola, que generalmente se refleja en los organismos que se determinan para el crecimiento (Bromage *et al.*, 1991) y en algunos



casos, representa un factor para determinar si una especie puede ser potencialmente considerada para cultivo (Fernández-Palacios *et al.*, 1994). Sin embargo el aprovisionamiento de huevos y /o larvas en cantidades suficientes y calidad aceptables representa uno de los principales “cuellos de botella” en la producción de organismos acuáticos bajo condiciones controladas (García-Ulloa, 2000). Existen factores que afectan la calidad de los óvulos las cuales están determinadas por las propiedades intrínsecas del propio óvulo y el entorno en el que el óvulo es fertilizado y encubado posteriormente. La calidad de los huevos de los peces es muy variable, algunos de los factores que afectan la calidad de los huevos de los peces son conocidos, pero muchos (probablemente la mayoría) son desconocidos (Broks *et al.*, 1997). Los componentes que afectan la calidad del huevo incluyen el estado endocrino de la hembra durante el crecimiento de los ovocitos en el ovario, la dieta de los reproductores, el complemento de los nutrientes depositados en el ovocito, y las condiciones fisicoquímicas del agua en la que los huevos son posteriormente incubados. En reproductores en cautiverio, las prácticas de cría de peces a los que son sometidos son probablemente un importante factor que afecta la calidad del huevo. Los conocimientos de las influencias genéticas sobre la calidad del huevo son muy limitados. Sabemos que los genes de los padres influyen tanto la fecundidad y la calidad de los huevos, pero casi nada se sabe acerca de la expresión génica y / o la traducción del ARNm en los ovocitos de los peces / embriones. A mediados del siglo pasado se implementaron técnicas basadas en la fisiología reproductiva de los animales, tales como la inseminación artificial (IA), trasplante de embriones (TE), entre otras, que impulsaron el mejoramiento genético de los peces, al facilitar la diseminación de material genético de alta calidad y actualmente siguen siendo herramientas de rutina en el manejo reproductivo de los peces (Van Eenennaam, 2006). Recientemente, con la tecnología del ADN recombinante y la elucidación de genomas completos, se han descubierto una gran cantidad de polimorfismos génicos (Liu *et al.*, 2009). Las variaciones de mayor importancia para el mejoramiento genético son los ubicados en regiones asociadas a características cuantitativas, mejor conocidos como QTLs (loci de características cuantitativas por sus siglas en inglés), así como también genes mayores o asociados a características cuantitativas, llamados genes candidatos. La identificación de los QTLs se puede realizar con marcadores indirectos, cuando su proximidad es tal que se coheredan con marcadores directos, que residen dentro

del *locus* que constituye el QTL en cuestión. Dentro de los marcadores directos se encuentran los polimorfismos de nucleótido simple o SNPs, que hoy en día su identificación es el análisis de los genomas más fino (Van Enennaam, 2006). Todos estos polimorfismos pueden ejercer un cambio significativo del fenotipo en los ejemplares, de manera que han tenido gran impacto en el mejoramiento genético asistiendo la selección temprana de animales portadores de variantes favorables. A esta estrategia se le conoce como selección asistida por marcadores (MAS) (Decker & Hospital, 2004; Van Enennaam, 2006; Van Enennaam *et al.*, 2007). Por lo tanto, el presente proyecto busca analizar nuevos polimorfismos y su asociación en rasgos productivos (calidad de huevo y juvenil) en poblaciones de tilapia *Oreochromis niloticus*.

## **2.- Antecedentes**

### **2.1.-Acuacultura en México**

En México, como en muchos países del mundo, la piscicultura se inició con la explotación de las poblaciones silvestres de peces de lagos y ríos. Antes de la conquista, los indígenas explotaron y cultivaron peces, como lo demuestran los estanques piscícolas construidos por los Zapotecas, que causaron admiración en tiempos de la Colonias (Rosas, 1981).

A partir de que la tilapia se introdujo a México, en el año de 1964, su reproducción se extendió a la mayoría de los estados. Para el cultivo de este pez se utilizan presas, lagos, ríos, reservorios y granjas construidas especialmente para su reproducción en altas densidades (Rodríguez y García., 2009).

Según la intensidad del método de cultivo que se aplique la piscicultura se divide en:

- a) *Extensivo*: El sistema extensivo se caracteriza por aquellos que se realizan en grandes áreas de agua, por sus bajos costos operativos debido a la baja densidad de siembra, y por ende, produciendo cosechas que oscilan entre los 500 a 5,000 kilos de tilapia por hectárea en cada ciclo de producción. No se necesita infraestructura para el requerimiento de agua, más es recomendable que el nivel no se sitúe por debajo de un metro de profundidad; debe promoverse y mantenerse la productividad primaria (natural) del estanque (agua verde) ya que

representa la única fuente de alimento; y debe establecerse cierta vigilancia para evitar el robo o la depredación (Rosas, 1981).

- b) *Semi intensivo*: Se caracteriza por el control de algunos factores de los ecosistemas; se fertiliza y se ofrece alimentación complementaria; el cuerpo de agua que se usa es creado para este fin. Se realiza principalmente en estanques, corrales y jaulas. Se practican dos modalidades de cultivo intensivo, el cultivo en jaulas flotantes y el “raceway” (Barreda, 1999). Este método cultivo se caracteriza por ser altamente tecnificado; se usan alimentos peletizados, comederos automáticos, fertilizantes inorgánicos y aireadores cuando se cultivan en grandes estanques (Rosas, 1981).
- c) *Intensivo*: Los cultivos intensivos se realizan normalmente en instalaciones separadas del medio natural, en tanques o piscinas aisladas con sistemas técnicos de captación y recirculación de agua, con un control casi total del medio y de los individuos. Son mucho más caros que los procesos menos tecnificados, pero el aumento de rendimiento o la necesidad de un mayor control de la producción es determinante (Rosas, 1981).

### **2.1.2.-Principales Estados productores**

La tilapia se cultiva en 31 estados de la república mexicana, siendo los mejores sitios para su desarrollo las zonas tropicales de los estados de: Veracruz, Michoacán, Tabasco, Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Chiapas y Guerrero.

El Litoral del Golfo y Caribe, lo integran seis entidades, de las cuales Veracruz el principal productor, aportando el 27.4% del total; también se encuentra Tabasco ocupando el segundo sitio, con una participación del 12.7%. Mientras que al Litoral del Pacífico son 11 entidades las que lo conforman; entre ellas están Michoacán con una participación del 17.1%, Sinaloa 6.7%, Jalisco 5.1%, Chiapas 4.5%, Nayarit 3.9% y Guerrero con 2.5%. Las entidades sin litoral son 14, teniendo estas, una baja participación en la producción nacional de tilapia. En Conjunto las entidades que integran el Litoral del Golfo y Caribe aportan el 45% de la producción de tilapia nacional, en tanto que las entidades del Litoral del Pacífico

participan con el 44%, mientras que las entidades sin Litoral aportan solamente el 11% de la producción nacional ( CONAPESCA, 2004).

### **2.1.3.- Cultivo de tilapia**

La tilapia es originaria del sur de África Central y a partir del año 1939, comenzó su distribución en otros países, de tal forma que, hoy en día, se la encuentra en casi todo el mundo. Esto es debido especialmente, a su alto valor comercial y social. La tilapia es una especie destinada a la alimentación familiar y de autoconsumo cuando se cultiva a baja densidad en estanques. Su cultivo se realiza en numerosos países de América del Norte, Central, incluyendo al Caribe, Sudamérica, Sudeste Asiático, norte de Australia y algunos países europeos. El entusiasmo inicial por su cultivo, se detuvo cerca de la década del 50 al 60 debido al problema suscitado por el exceso de población resultante en estanques, al trabajarse con individuos de ambos sexos. Estos problemas fueron en parte resueltos a partir del año 1960, con la obtención de poblaciones mono sexos y el control de los cultivos. En México, la tilapia fue introducida en el año 1964 extendiendo su producción en la mayoría de los estados, incluyendo Sinaloa.

Para el cultivo de este pez se utilizan presas, lagos, ríos, reservorios y granjas construidas especialmente para su reproducción a altas densidades. Las especies de tilapia más utilizadas han sido tilapia del nilo (*O. niloticus* con sus diversas variedades), tilapia mozambique (*O. mossambicus*) y tilapia plateada (*O. aureus*). Cada una de estas especies presenta características específicas que optimizan su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. Por ejemplo, *O. niloticus* es la especie más usada por adaptarse fácilmente al manejo, mostrar un crecimiento más rápido y de mayor producción de carne, siendo cultivada en ambientes semi tropicales y tropicales. Por otro lado, *O. aureus*, crece mejor a temperaturas frías (Rodríguez & García, 2009).

## **2.2.-Datos biológicos básicos de tilapia**

### **2.2.1.-Descripción taxonómica y morfológica de tilapia del género *Oreochromis***

El género *Oreochromis* es de origen africano, perteneciente a la familia de los cíclidos y está representado por cerca de 100 especies. La mayor parte de ellas se encuentra

en África y algunas en Asia Menor. Muchas de éstas han sido introducidas en otras partes del mundo, en aguas dulces y salobres.

Descripción taxonómica según Berg y modificado por Trewavas (1983).

Phylum - Chordata

Subphylum - Vertebrata

Superclase - Gnathostomata

Serie - Pisces

Clase - Actinopterygii

Orden - Perciformes

Suborden - Percoide

Familia - Cichlidae

Géneros - *Tilapia*; *Oreochromis*

Especies - *rendalli*, *aureus*, *niloticus*, *mossambicus*, *urolepis*, *hornorum*

A cada lado de la cabeza, la tilapia presenta un solo orificio nasal que sirve simultáneamente como entrada y salida de la cavidad nasal. El cuerpo es generalmente comprimido y discoidal, es decir, raramente alargado. La boca es frecuentemente ancha y bordeada por los labios gruesos; las mandíbulas presentan dientes cónicos y, en algunas ocasiones, incisivos. Para su locomoción posee aletas pares e impares; las aletas pares las constituyen las pectorales y las ventrales mientras que las impares incluyen las dorsales, caudal y anal. La parte anterior de la aleta dorsal y anal es corta, consta de varias espinas; sus aletas dorsales se disponen en forma de cresta. La aleta caudal es redonda y trunca (Rodríguez y García, 2009).

### **2.3.-Hábitat**

Dentro de sus áreas originales de distribución, las tilapias han colonizado hábitats muy diversos tales como arroyos permanentes y temporales, ríos anchos y profundos o con rápidos, lagos profundos y/o pantanosos, lagunas dulces, salobres o saladas, alcalinas, estuarios y lagunas costeras e incluso hábitats marinos. Son de aguas cálidas y su distribución se limita a un mínimo de temperatura (Philippart y Ruwet, 1982), ya que no crecen por debajo de los 16 °C (Chervinski, 1982).

Todas las tilapias tienen una tendencia hacia hábitos alimenticios herbívoros, a diferencia de otros peces que se alimentan o bien de pequeños invertebrados o son piscívoros. Las adaptaciones estructurales de las tilapias a esta dieta son principalmente un largo intestino muy plegado, dientes bicúspides o tricúspides sobre las mandíbulas y la presencia de dientes faríngeos. Debido a la diversidad de alimentos que varían desde vegetación macroscópica como pastos, hojas, plantas sumergidas, etc., hasta algas unicelulares y bacterias. Los dientes también muestran variaciones en cuanto a dureza y movilidad. (Rodríguez y García., 2009).

#### **2.4.- Reproducción y sexualidad**

Las tilapias poseen la habilidad de madurar sexualmente a tallas pequeñas, cuando el cuerpo tiene alrededor de 8 y 10 centímetros de largo, y a temprana edad. En regiones templadas, la época de reproducción inicia durante los meses de primavera (Morales - Díaz, 2003).

Externamente, el macho y la hebra se diferencian en que el primero presenta dos orificios bajo el vientre (ano y orificio urogenital), mientras que las hembra cuenta con tres (ano, poro genital y orificio urinario). El ano siempre está visible, es un agujero redondo; por su parte, el orificio urogenital del macho es un pequeño punto, mientras que el orificio urinario de la hembra es microscópico, apenas visible a simple vista. El poro genital se encuentra en una hendidura perpendicular al eje del cuerpo (Rodríguez y García, 2009).

#### **2.5.-Crecimiento y desarrollo**

El crecimiento de la tilapia se divide en cinco fases: huevos, alevín, cría, juvenil y adulto. La talla y peso que se alcanza en cada estadio está directamente relacionada con los factores ambientales, como alimento, espacio, calidad de agua, etc. En la tabla 1 se muestra la talla, peso y duración de cada estadio de la tilapia (Morales - Díaz, 2003).

Tabla 1. - Características de desarrollo y crecimiento de tilapia

| Estadio | Talla          | Peso   | Tiempo   |
|---------|----------------|--------|----------|
| Huevo   | 2 a 4mm        | 0.01g  | 1-5 días |
| Alevín  | 2.4mm a 6.2 cm | 4 a 8g | 10 días  |

|         |                 |            |         |
|---------|-----------------|------------|---------|
| Cría    | 6.1mm a 11.4 cm | 8 a 30g    | 30 días |
| Juvenil | 13.7 a 15.9cm   | 60g a 150g | 60 días |
| Adulto  | > a 19.9cm      | > a 250g   | 90 días |

## 2.6.-

### **Ventajas del cultivo de tilapia**

Dentro de las especies piscícolas de mayor explotación las tilapia son consideradas como las mejores para la acuicultura de agua dulce por las siguientes características (FAO, 2000):

- Son especies de aguas cálidas (Philipart y Ruwet, 1982).
- Se adaptan a condiciones diversas de salinidad y de temperatura. (Chervinski, 1982).
- Presentan alta fecundidad.
- Son de rápido crecimiento.
- Presentan tolerancia a desarrollarse en condiciones de alta densidad.
- Son omnívoras (Morales-Díaz, 2003).

## 2.7.- Calidad de huevo

Las poblaciones de peces, tanto cultivadas como silvestres, dependen de la producción de huevos de calidad. La mala calidad de huevo es uno de los principales obstáculos en la expansión de la acuicultura. Calidad de huevo en peces se puede definir como la capacidad del óvulo para ser fecundado y posteriormente, convertirse en un embrión normal (Bonnet *et al.*, 2007). El potencial del huevo en su calidad puede verse afectado por diferentes factores biológicos que actúan en los distintos pasos del proceso oogénico. La calidad de huevo también puede estar bajo la influencia de factores genéticos. Existe una amplia diversidad de criterios de calidad de huevo, que son utilizados en forma indiscriminada para las diferentes especies. Algunos de los parámetros que han sido empleado como estimadores de calidad son: el tamaño del huevo, la fertilización, el contenido energético, el volumen de huevo, el contenido de vitaminas, peso seco y la morfología larval (De Caluwé, 1995). Los criterios morfológicos, como cambios en la proporción de huevos que flotan, el tamaño del huevo, la cantidad de reservas energéticas, la presencia de anomalías de los blastómeros en las primeras divisiones mitóticas, han

sido utilizados como indicadores de la calidad del huevo (Faulk y Holt, 2008). Por ejemplo, en *Gadus morhua* y *Oncorhynchus mykiss* existe una correlación positiva entre el tamaño de los huevos y el de las larvas al momento de la eclosión, favoreciendo la supervivencia al momento de la primera alimentación; esto debido a que larvas más grandes tienen una mayor resistencia a la inanición (Kamler, 2008). En contraste, en *Salvelinus fontinalis* no se encontró una correlación positiva entre el tamaño del huevo y la supervivencia durante el desarrollo embrionario hasta la eclosión; sin embargo, se correlacionó positivamente con la supervivencia larvaria durante los primeros 50 días de alimentación exógena (Jónsson y Svavarsson, 2000). En *Sparus aurata* y *Diplodus puntazzo* se reportó una relación cuadrática entre el porcentaje de supervivencia con el diámetro máximo y mínimo de la gota de aceite (Lahnsteiner y Patarnello, 2005). Esto es debido a que existe interacción entre las partes hidrofóbicas e hidrofílicas de los lípidos por lo que la naturaleza y calidad de estas moléculas afectan la forma del glóbulo de aceite.

Los parámetros morfológicos que se usan para predecir la calidad de los desoves no explican las razones subyacentes del bajo porcentaje de eclosión. Es por esto que estos criterios se han correlacionado con parámetros bioquímicos (Rideout *et al.*, 2004). La concentración de aminoácidos y proteínas (Ronnestad y Fyhn, 1993; Sarasquete *et al.*, 1993; Fyhn y Govoni, 1995; Faulk y Holt, 2008); así como de lípidos (Ronnestad *et al.*, 1994 y 1998; Mazonza *et al.*, 2003) ha sido considerada como indicadores en la calidad de los desoves. Bulut *et al.*, (2005) observaron en *Pagellus erythrinus* una correlación positiva entre la cantidad de lípidos y proteínas en los embriones y los porcentajes de supervivencia larvaria. Lahnsteiner y Patarnello (2003) mencionan que los niveles de aminoácidos libres en huevos no viables son significativamente menores que en huevos viables, lo cual afecta su flotabilidad, así como la síntesis de proteínas y el estado energético de los embriones. Esto es importante, debido a que se ha reportado en especies como *Scophthalmus maximus* y *Microstomus kitt* que el 20 y 30%, respectivamente, de los aminoácidos libres son utilizados en la síntesis proteica y que el 80 y 70%, respectivamente, se emplean en el metabolismo energético de los embriones y larvas vitelinas, siendo un proceso clave en la supervivencia de los organismos (Ronnestad y Fyhn, 1993). En el caso de los lípidos, se ha observado que los ácidos grasos polinsaturados (HUFA) de las series n-3 y n-6 son la clave



de la supervivencia y del crecimiento de las larvas en la primera alimentación (Ronnestad y Fyhn, 1993).

Mediante estudios bioquímicos se ha encontrado una relación estrecha entre la composición de las reservas alimenticias en los huevos y larvas vitelinas de los teleósteos y la dieta de los reproductores (Sarasquete *et al.*, 1993; Carnevali *et al.*, 1998; Morehead *et al.*, 2001; Kamler, 2005; Faulk y Holt, 2008; Kamler, 2008; Sawanboonchun *et al.*, 2008; Sink y Lochmann, 2008). Racotta *et al.*, 2003, consideran que la cuantificación del nivel inicial de reservas en el huevo pueden determinar en gran medida la calidad larval posterior; es decir que consideran a la composición química del huevo (proteína, lípidos, carbohidratos) como un criterio predictivo de la progenie.

## **2.8.-Calidad de Juvenil**

### **2.8.1.-Pruebas de estrés**

Algunos autores han desarrollado la condición de los juveniles y /o larvas, a menudo referida esta como “calidad”. Dicha evaluaciones son conocidas como pruebas de resistencia o estrés (Racotta *et al.*, 2003). Estas son usadas como un criterio de control de calidad en los laboratorios de producción de juveniles y /o larvas (Álvarez *et al.*, 2004). Tales pruebas consisten en someter a los juveniles y/o larvas a cambios bruscos de algún factor ambiental como salinidad, cambios en la temperatura del agua o bien a factores que han sido propuestos como bajas concentraciones de oxígeno o exposiciones de aire (Ibarra *et al.*, 1998), altas concentraciones de amonio (Cavalli *et al.*, 1999; Cavalli *et al.*, 2000), entre otros.

Las pruebas de estrés salino consiste en someter a los juveniles a un cambio abrupto en la concentración de sal durante cierto periodo (Cavalli *et al.*, 2000). La supervivencia a la prueba de estrés de salinidad se basa principalmente en la capacidad osmoreguladora de los organismos, y esto depende a su vez del grado de desarrollo de la postlarva, por lo que en su forma de evaluar la condición fisiológica (Autin, 1995; Charmantier *et al.*, 1998; Racotta *et al.*, 2004). La tilapia tolera diferentes concentraciones de salinidad (Morales - Díaz, 2004). Por lo que, al realizar las pruebas de estrés se debe considerar su intervalo de tolerancia.

Por otro lado, pruebas agudas de toxicidad al amonio han sido desarrolladas para estimar la tolerancia de organismos acuáticos. El amonio es el principal producto final del metabolismo de proteínas, siendo la forma de excreción nitrogenada y una de las sustancias tóxicas más comunes en los sistemas de cultivo (Chen y Kou, 1999, Hernández, 2001). El amonio es un componente que al estar en grandes cantidades en el medio, se diluye y su desequilibrio en las reacciones enzimáticas del organismo, como es la inhibición del transporte del sodio. Además, este compuesto provoca daños en los epitelios branquiales y reduciendo la capacidad del organismo de captación del oxígeno y transporte del mismo provocando su muerte (Armstrong *et al.*, 1978). Para la realización de dichas pruebas, es necesario calcular la dosis considerada letal para un 50% de la población (LC<sub>50</sub>), esto en un periodo de 24 h (Jayasankar y Muhu, 1983).

La calidad de los juveniles es uno de los problemas para el desarrollo de la producción acuícola que generalmente se ve reflejada en los organismos que se destinan para la engorda (Bromage *et al.*, 1991) y en algunos casos, como factor para determinar si una especie puede ser potencialmente considerada para cultivo (Fernández - Palacios *et al.*, 1994).

## **2.9.-Estrategias biotecnológicas**

Una de las herramientas biotecnológicas que está contribuyendo, de gran manera, en el proceso de selección, mejoramiento y consolidación de las características genéticas de especies de interés productivo en la genotipificación o caracterización a escala molecular de poblaciones animales. El estudio genético de poblaciones de peces y de cualquier otra especie económicamente importante, toma especial relevancia por el impacto que causa a nivel productivo. En la actualidad, la implementación de la biotecnología en la industria acuícola ha permitido caracterizar la variabilidad genética presente en la secuencia de ADN de los organismos, alcanzando una mejor comprensión de la relación genotipo-fenotipo, generando diferencias en la selección de individuos como progenitores candidatos, acortamiento del intervalo generacional y el incremento en la ganancia genética (Casas, 2002; Khatkar *et al.*, 2004).

El genoma de la tilapia se ha dado a conocer, algunos aspectos; un ejemplo son los cariotipos de varias especies de tilapia los cuales son muy similares, estos consisten de 22 pares de cromosomas sin distinción sexual. De hecho solo dos pares son identificables, los otros 20 son similares en tamaño y morfología. A nivel molecular, el tamaño del genoma de varias especies mide 1000 Mb, aproximadamente una tercera parte del genoma de mamíferos y el tamaño varía entre las especies hasta en un 44% (Majumdar y McAndrew, 1986). Lee *et al.*, (2004) realizaron el mapa genético de la tilapia *O. niloticus*, utilizando marcadores de ADN.

Los marcadores genéticos han permitido detectar algunos QTL en los cromosomas y la identificación de dichos marcadores, y su subsiguiente ubicación en los mapas de ligamiento ha permitido identificar las regiones cromosómicas donde residen éstos. La distancia entre el marcador y el gen o QTL que codifica una característica cuantitativa es importante para su efecto, es decir, es necesaria una distancia entre 15 a 50 centimorgan (cM, unidad arbitraria utilizada para medir distancia entre locus en los cromosomas) para lograr un efecto de medio a alto (Dekkers, 2004) o de 5 cM para garantizar un efecto mayor (Huiying *et al.*, 2001). Una vez identificado y medido el efecto de un QTL, es posible incorporarlo a esquemas de mejoramiento genético (Casas, 2006). De esta forma, el uso de la genómica es útil para mejorar características productivas que se limitan por el sexo, que tienen una baja heredabilidad (valor de la variación fenotípica dentro de un grupo de individuos debido a factores genéticos, en donde alta heredabilidad corresponde a un valor de 1, baja heredabilidad de 0.2 a 0.3 y nula heredabilidad de 0), que son costosas de medir o que se miden hasta que el animal alcanza una talla adulta. (Broker, 1999; Meuwissen, 2003; Casas, 2004).

### **2.9.1.-Selección por prueba de progenie**

El fundamento de la prueba de progenie, es evaluar el genotipo de un reproductor con base a rasgos cuantitativos a través del desempeño de su progenie. La prueba de progenie consta de dos fase; evaluación de los reproductores y uso masivo del material genético del reproductor probado. Históricamente no se conoce cuáles son los genes que contribuyen para que se expresen las características de comportamiento productivo y por ello se han utilizado registros de comportamiento fenotípico (Montaldo y Meza-Herrera,

1998), así como herramientas para inferir el mérito genético de los animales (diferencia esperada en la progenie [DEP]). Estas herramientas son útiles para el mejoramiento de características productivas en animales de granja, sin embargo, no se sabe cuáles genes son los que contribuyen para una DEP dada, más aún porque las características complejas como peso después de la eclosión, talla comercial, producción de huevo, reproducción, calidad de filete, entre otros, están controlados por muchos genes y también se ven afectados por el medio ambiente (por ejemplo, condiciones de alimentación), por lo que el estudio de la variación dentro de genes está teniendo un gran impacto sobre el fenotipo de animales acuáticos (Casas, 2006). Si se considera el aspecto genético de una característica, se sabe que los genes se heredan por una misma vía: el individuo recibe dos copias, una del lado paterno y otra del lado materno, el o los alelos que controlan la característica en estas copias pueden ser idénticos o bien diferir uno de otro, por lo que el resultado de su expresión para un fenotipo de interés productivo puede ser positivo o negativo. Por otro lado, cuando se tiene una DEP positiva para cierta característica se considera correcta porque está basada en el pedigrí (árbol genealógico) y en el fenotipo, y su grado de herencia es mayor que el número promedio de variantes genéticas de cada gen que afecta la característica en particular. El éxito de las herramientas mencionadas se basa en la creencia de que hay un grupo de genes que contribuyen cada uno con poco efecto a tal o cual característica; tal es el caso de los caracteres complejos (como el de crecimiento) que son producto de la expresión de varios genes ligados, cuya expresión individual disminuye notablemente el fenotipo. A este modelo se le conoce como infinitesimal y también se basa en la selección de los posibles progenitores a través de valores de crianza o crusa (Dekkers, 1999).

### **2.9.2.-Herramientas moleculares y la búsqueda de genes candidatos**

La aplicación de las tecnologías genéticas no había sido considerada como un componente estándar de la producción acuícola. Sin embargo, en la última década, la aplicación de las teorías de genética cuantitativa en la mejora de especies que se cultivan ha ido en aumento; y ahora 10 de las 19 especies acuícolas cultivadas están bajo algún tipo de selección genética (Hershberger, 2006). Lo anterior es el resultado de un aumento en la investigación de las bases genéticas, enfocándose en los rasgos fenotípicos (heredabilidad y correlaciones genéticas; Gjerde, 1986; Vandeputte *et al.*, 2004), además, de una adaptación

exitosa de los planes de mejoramiento genético diseñado para las especies utilizadas en la acuicultura (Dupont-Nivet *et al.*, 2006). Este mejoramiento se realiza mediante la genética molecular, la cual ha revolucionado una serie de tecnologías con un solo objetivo, estudiar la composición genética del individuo a nivel de la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) para reforzar la selección de crías a una edad temprana y garantizar la predicción fenotípica en su edad adulta. Para lograr este propósito, es importante localizar e identificar genes y sus polimorfismos que estén involucrados a rasgos de interés para emplearlos posteriormente como marcadores moleculares en diferentes especies de los sistemas productivos, estrategia conocida como GAS (Gene assisted selection; De Santi y Jerry, 2007).

El crecimiento es un rasgo productivo prioritario en muchas especies acuícolas por lo que el uso de herramientas como el GAS en las estrategias de mejoramiento genético de este rasgo, puede representar ventajas económicas al acortar el tiempo requerido para lograr mejoras en la producción.

En peces como en la mayoría de los mamíferos el crecimiento y desarrollo son rasgos primariamente regulados por el eje somatotrófico. La identificación de polimorfismos genéticos en los genes que conforman este eje ha permitido la aplicación del GAS en diferentes especies de peces y mamíferos (De Santi y Jerry, 2007).

Los genes candidatos, son aquellos cuya función biológica se conoce y por lo general están involucrados en el desarrollo o fisiología de alguna característica. Estos genes pueden ser estructurales, reguladores y genes que participan en vías metabólicas.

La estrategia de genes candidatos, se basa principalmente en la identificación y elección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), que a menudo implica la secuenciación del gen completo en la población bajo estudio. Los SNPs, son variaciones genéticas más abundantes en todas las especies, en el genoma humano se ha estimado una frecuencia de un polimorfismo por cada 1000 pb. Otro objetivo principal del uso de SNPs en ésta estrategia, es debido a la sustitución nucleotídica que se presenta en alguna posición del codón, que puede o no modificar la secuencia aminoacídica. Los dos tipos de sustituciones nucleotídicas puntuales son:

- Sustituciones nucleotídicas sinónimas (sSNP) o silenciosas: Sustitución nucleotídica que no modifica el aminoácido.
- Sustituciones nucleotídicas no sinónimas (nsSNP) o antónimas: Sustitución nucleotídica que modifica el aminoácido.

Los SNPs, localizados en exones y sobre todo snSNP han tomado gran importancia, ya que el cambio aminoácido en la región codificante generado por un snSNP, se ha visto un gran impacto sobre el fenotipo (Ramensky *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos estudios han reportado sustituciones nucleotídicas puntuales en las regiones no codificantes (intrón) con asociación significativa sobre algún rasgo de interés.

Los genes del eje somatotrófico y algunos involucrados en el desarrollo muscular, han sido ampliamente caracterizados para la identificación de polimorfismos genéticos que permitan la selección de individuos con mayor potencial productivo en peces. En la tilapia *O. niloticus*, los principales genes del eje somatotrófico han sido secuenciados sin reportar variación genética que permitan su evaluación y la asociación a rasgos productivos como el crecimiento. Ambekar *et al.* (2007) sugieren que la variación en crecimiento presenta mayor relación con la genética del organismo que con las condiciones de cultivo, ya que observa que a medida que aumentó la variación genética, el peso de la cosecha aumenta. Blanck *et al.* (2009), observó una asociación entre el polimorfismo (GH1- pstl), en el intrón 1 del gen de la hormona de crecimiento con las características corporales de diferentes variedades de la tilapia del Nilo (Chitralada y GIFT), ya que el polimorfismo descrito para el intrón 1 del gen GH1 de tilapia del Nilo tuvo una correlación significativa con la longitud total, altura y ancho del cuerpo, así como, una asociación con un mejor rendimiento mediante la regulación del gen de la GH (GH1-PstI). Gross *et al.* (1996), Almuly *et al.* (2000), y Yue y Orban (2001), han encontrado que la mayoría de las variación genética del gen GH se presenta en los intrones y puede ser por inserción o deleción, repeticiones y SNPs. Strelman y Kocher (2002) asociaron la longitud de un microsatélite localizado en el promotor del gen prolactina con el crecimiento y niveles de expresión de este gen a diferentes condiciones de salinidad en cruza de las especies de tilapia *O. mossambicus* (adaptada a salinidad) con *O. niloticus* (adaptada a agua dulce). La asociación entre peso y polimorfismos en las regiones codificantes y no codificantes del gen de la GH también ha

sido descrita en otras especies de peces como *Paralichthys olivaceus* (Kang *et al.*, 2002), *Salmo salar* (Gross y Nilsson, 1999) y *Salvelinus alpinus* (Tao y Boulding, 2003).

### **2.9.3.- Genes seleccionados para la búsqueda de nuevos polimorfismos SNPs**

#### **2.9.3.1.- GH (Hormona de crecimiento)**

La hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) es un polipéptido que juega un papel, fundamental en la estimulación del crecimiento en vertebrados incluyendo los teleósteos. En general sus secuencias de aminoácidos está conservada en distintos niveles filogenéticos Watahiki, *et al.*, 1989, esto también se manifiesta a nivel de su actividad biológica; por ejemplo, se ha demostrado que la Hormona de crecimiento de humanos es activa en ratas (Forsyth y Wallis, 2002). La principal función de la GH en vertebrados es regular el crecimiento somático a través de la hipertrofia y (o) la hiperplasia celular. En los teleósteos desempeña, además, otras muchas funciones, como la osmorregulación (Bolton *et al.*, 1987; Mancera y McCormick, 1998), el control de la esmolificación (Björnsson *et al.*, 2000) y la síntesis de proteínas anticongelantes (Idler *et al.*, 1989).

En los telósteros esta hormona además de esta involucrada en el crecimiento, está asociada a la osmorregulación de electrolitos, y muchas otras funciones metabólicas. Debido a los estudios de clonación y caracterización del gen que la codifica, en peces de interés comercial (Almuy *et al.*, 2000), como: carpa común (*Cyprinus carpio*) (Chiou *et al.*, 1990), carpa herbívora (Hi *et al.*, 1991), bagre de canal (Tang *et al.*, 1993), dorada (Almuy *et al.*, 2000), salmón del Atlántico (Johansen *et al.*, 1989), salmón rey (Du *et al.*, 1993), hirame (Tanaka *et al.*, 1995). Además de estos estudios de clonación y caracterización, existen otros enfocados a determinar el grado de polimorfismos en cada región de este gen. En tilapia *O. niloticus* el gen de la hormona de crecimiento está conformado por 2361pb aproximadamente y conformado por 6 Exones y 5 intrones. En general se ha encontrado que muchas de ellas son polimórficas en diversas especies de vertebrados, incluyendo los telósteros. Unas de las regiones es el intrón I, el cual que ha demostrado ser polimórfico en especies como tilapia mossambica, tilapia nilotica (Yue y Orban, 2002). Para el intrón II se

han detectados polimorfismos en peces como las carpas (Mo, 2004), y en roedores (Kunieda *et al.*, 1989). Para el intron III se han observado polimorfismos en especies como ovejas (Dybus, 2002), bovinos (Agrrey *et al.*, 1994) y perca gigante (Yowe y Epping, 1996). El intrón 4 se ha mostrado ser polimórfico en ovejas (Sorensen *et al.*, 2002) y aves de corral (Nie *et al.*, 2002) y ovejas (Sorensen *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2007).

### **2.9.3.2.- IGF- I (Factor de crecimiento de la insulina tipo I)**

Los peces son los vertebrados más longevos, se desarrollaron sobre hace 500 millones de años. Son pocas las secuencias de IGF-I que se han obtenido de los peces óseos, principalmente de la pequeña familia de los salmónidos, es decir, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss*, y *O. tshawytschwa*. La Tilapia pertenece al orden de Perciformes, que es la más diversificada de todas las órdenes de peces óseos, así como el mayor orden de los vertebrados. Debido a que la tilapia es un incubador bucal, y por lo tanto todo el desarrollo etapas se pueden obtener fácilmente, que representa una excelente animal experimental para los estudios sobre la regulación durante primeros años de vida. Por otro lado, el crecimiento muscular en peces difieren de los mamíferos en que en estos últimos el crecimiento del músculo es continuo a través del ciclo de vida, notablemente por hipertrofia de células musculares (LaTonya *et al.*, 2009). Se han identificado factores que influyen la activación y proliferación de células miogénicas en vertebrados superiores. Estos factores incluyen el factor tipo insulina I y II (IGF-I e IGF-II) polipéptidos conocidos por promover la proliferación y diferenciación de células en vertebrados (LaTonya *et al.*, 2009). El sistema de IGF (IGF-I, IGF-II y IGF-R) en conjunto con GH y su receptor son potentes reguladores positivos de crecimiento muscular (De-Santi y Jerry 2007), la expresión de estos factores se han asociado a diferentes características productivas en distintas especies de peces, el Factor Insulínico tipo I (IGF-I), no solo se ha asociado con el crecimiento, sino también con el metabolismo (Thomson *et al.*, 2004), el desarrollo (Greene y Chen, 1999), reproducción (Tao y Boulding, 2003) y la osmorregulación en agua de mar (McCormick, 2000) en peces. El gen IGF-1 ha sido ampliamente investigado como gen candidato para la mejora del crecimiento. IGF-I es un potente mitógeno factor que induce el crecimiento y la diferenciación que es expresa también en sitios extra hepáticos, sin embargo, son pocos los estudios donde se han reportado polimorfismos y su asociación en



el efecto de crecimiento en peces. Tao y Boulding (2003) han investigado polimorfismos en IGF-I y efectos de crecimiento en peces, especialmente con Ártico charr, donde no pudieron encontrar asociaciones significativas entre los polimorfismos SNPn en la región promotora de IGF-I y tasa de crecimiento.

### **2.9.3.3.-Miogenina (MyoG)**

Los miembros de la familia MyoG, son factores de transcripción con una estructura hélice-vuelta-hélice, han sido estudiados con detalle en el músculo esquelético de vertebrados superiores (Weintraub *et al.*, 1991). Nombrados en su conjunto como MRFs, incluyen los genes de MyoD y miogenina, así como los genes myf-5 y MRF4 (o myf-6). Los MRFs forman heterodímeros con los productos de la proteína E y se unen a las secuencias de ADN -CANNTG- presentes en las regiones reguladoras de muchos genes específicos del músculo (Olson, 1992). En los mamíferos, la expresión forzada de cada uno de los MRFs es capaz de transformar células no musculares en mioblastos (Weintraub, 1993), mostrando los estudios en ratones *knock-out* que estos factores de transcripción tienen funciones distintas pero que, en cualquier caso, se solapan (Rudnicki *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1994). Varios miembros de la familia MEF2 y MyoD han sido identificados en el pez cebra (Watabe, 2001). En trucha, se han clonado y secuenciado varios MRFs (Rescan., 2001), y dos genes de MyoD, al igual que en dorada (Tan y Du, 2002). Los ADNc de MyoD y MEF2 también se han clonado y secuenciado en carpas (Kobiyama *et al.*, 1998), por lo que se menciona que los mecanismos de formación y regulación del músculo esquelético se han conservado notablemente a lo largo de la evolución de los vertebrados. Además, en estas especies, las fibras musculares rápidas cambian las isoformas de la cadena pesada de la miosina con la temperatura (Guo *et al.*, 1994; Watabe *et al.*, 1995; Imai *et al.*, 1997; Hirayama y Watabe, 1997), por lo que varios autores han sugerido que los MRFs participan en el reclutamiento de las fibras musculares en respuesta al incremento de la temperatura y del crecimiento. MyoG como Ulloa *et al.* (2013), evaluaron la respuesta de crecimiento y la expresión de crecimiento muscular relacionados con genes candidatos de pez cebra adultos (*Danio rerio*), donde se evaluaron los efectos de una dieta basada solo en la proteína de harina de pescado y una dieta basada en la proteína plantas (PP) buscando la respuesta de crecimiento en una población de 24 familias de pez

cebra adultos (*D. rerio*), evaluando también la expresión de genes relacionados con el crecimiento en el músculo donde se buscaba el efecto de la Dieta (PP) en la expresión génica, evaluando los genes relacionados con el crecimiento IGF1, IGF2, mTOR, Pld1a , MRF4 Myod, Myogenina y Myostatina, pudiendo observar que la expresión génica en los machos con los genes estudiados (Myogenin , MRF4 y Igf2) mostraron cambios atribuibles a la dieta basada en la proteína de plantas mientras que las hembras, el efecto de la dieta de proteínas de plantas no modularon la expresión en los ocho genes estudiados, también pudieron observar el efecto de la variación entre los familiares en la expresión génica de las 24 familias. Pudiendo demostrar que la dieta PP y la variación de la familia tienen efectos sobre la expresión génica en músculo de pescado.

### **3.- Objetivo general**

Análisis de polimorfismos en genes candidatos y su asociación con la calidad de huevo y juveniles en poblaciones de tilapia (*O. niloticus*).

#### **3.1.- Objetivos específicos**

- 1) Evaluar las diferencias productivas (calidad de huevo y crecimiento de juveniles) que presentan las diferentes líneas de tilapia (*O. niloticus*) y establecer grupos de reproductores.
- 2) Establecer un panel de marcadores asociados a calidad de huevo y crecimiento de juveniles en la población de reproductores seleccionados.

### **4.- Hipótesis**

Familias de tilapia de la especie *O. niloticus* evaluadas mostrarán diferencias en calidad de huevo y juveniles, la cual se asocia a marcadores moleculares en genes candidatos para esas características.

## 5.- Materiales y Métodos

### 5.1.- Evaluación de la progenie de tres poblaciones de *O. niloticus*

#### 5.1.2.-Calidad de huevo

La calidad de huevo ha sido evaluado en 3 poblaciones de la especie *O. niloticus* procedentes de Centro Acuícola de Jala, Colima (H1), de la empresa privada Grupo Acuícola Mediterráneo SC de RL (H2), ubicada en Guadalajara, Jalisco y de la empresa costarricense distribuidora de Alevines de tilapia TIL-GEN L.A. S.A. (H3). Se tomaron 10 hembras (H) de cada familia de  $54 \pm 323$  gr. Y fueron marcadas con un microchip (Avid México CA de CV) y fueron colocadas en estanques (capacidad  $7.3\text{m}^3$  y 3m de diámetro). Cinco machos (M) Y fueron marcadas con un microchip (Avid México CA de CV) fueron colocados bajo las mismas condiciones que las hembras para su aclimatación por siete días. A fin de propiciar la cópula, se colocaron machos azarosamente en los estanques donde se encontraron las hembras en una relación de 10H:5M.

Cada semana se registraran el número de hembras grávidas en cada estanque. Las hembras se les evaluaron peso promedio y fueron recolectados 20 huevos de la boca de las hembras y se registraran los siguientes parámetros:

- Los huevos fueron recolectados de la boca de las hembras, y colocados en un recipiente de vidrio y fueron medidos en un microscopio estereoscópico ocular con objetivo 1X y obtener su Longitud mayor y menor
- Volumen ( $\text{mm}^3$ ) Se estimó por medio de la fórmula para el volumen de una elipse:

$$V = \frac{3}{4} \pi (R1 * R2 * R3)$$

- Área ( $\text{mm}^2$ ) Se estimó por medio de la fórmula para el Área de una elipse:

$$A = \pi (R1 * R2)$$

- Peso húmedo: Se eliminó el exceso de agua y se pesó en una balanza analítica.

- **Peso Seco:** La humedad de las muestras se determinó por desecación en un horno a 105 °C hasta obtener un peso constante.

$$\% \text{ Materia seca} = \frac{\text{Peso muestra seca}}{\text{Peso inicial muestra}}$$

- **Número de huevos:** Se contó la masa total de huevos de manera manual.
- **El porcentaje de eclosión:** se calcularon de acuerdo a la fórmula:

$$E = [L / (L+H)] * 100,$$

Dónde: E = porcentaje de eclosión, L = número de larvas, y H = número de huevos.

- **Contenido químico de los huevos (proteína, carbohidratos, lípidos totales),** mediante la siguiente metodología:
  - **Proteína:** fue evaluada a partir del homogeneizado con solución salina al 1.2 %, se realizó la digestión de proteínas con Na OH 0.5N. Se cuantificó las proteínas por el método de Bradford (1976), usando albúmina como estándar, y posteriormente la lectura se realizó a 595 nm.
  - **Carbohidratos:** Fueron evaluados a partir del mismo homogeneizador se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 20 % y se centrifugaron en frío a 2608g por 10 min. A 4°C. Del sobrenadante resultante se realizó la cuantificación de carbohidratos totales por el método de antrona (Van Handel, 1967). Se utilizó glucosa como estándar y se realizó la lectura a 620nm.
  - **Lípidos:** se utilizó una adaptación del método de Barnes y Blastock (1973), en el que una alícuota de homogeneizado se mezcló con H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> y se encubó a 80 °C durante 10 min. La solución ácida obtenida se mezcló con el reactivo de fosfovalina y la absorbancia fue medida con un lector

de microplacas (Biorad) a 560nm. Como estándar se utilizó una mezcla de triglicéridos (12mg/mL) y colesterol (8 mg/mL).

## **5.2. Calidad de Juvenil**

### **5.2.1- Bioensayo de crecimiento**

#### **5.2.1.1.- Sistema de cultivo**

Para los ensayos de crecimiento se empleó un sistema de cultivo, los alevines de  $0.01 \text{ g} \pm 1.0 \text{ g}$ . Posteriormente, se sembraron 50 organismos por tina en un sistema de 12 tanques cuadrados de plástico 270 litros donde se colocó la progenie de cada una de las hembras de manera separada teniendo la progenie de 6 hembras por cada población para su evaluación de crecimiento. La alimentación de los organismos fue basada en pellet comercial con un contenido proteico de 45% durante. El alimento fue suministrado en tres raciones por día a las 9, 14 y 17 horas. Cada unidad estaba equipada con suministro independiente de agua, la aireación fue proporcionada por un sistema de sopladores de 2 hp, a través de una red de pvc y piedras difusoras en el fondo de cada tina. Se realizaron recambios de agua cada semana del 30% del volumen de la tina. El bioensayo tuvo una duración de 45 días.

#### **5.2.1.2 - Evaluación de bioensayos de crecimiento de juveniles de tres poblaciones**

Se realizaron biometrías de organismos al inicio y final del bioensayo. Se registró el peso de los organismos, mediante una balanza electrónica de precisión ( $250 \pm 0.1 \text{ g}$ ). Posteriormente a los datos tomados se determinaba los siguientes valores:

- a) Peso después de la eclosión
- b) Peso total ganado (peso promedio) = Peso total final – peso total inicial.
- c) Tasa de Crecimiento ( $\text{g} \cdot \text{t}^{-1}$ ) = (Peso promedio final – peso promedio inicial) X  $\text{t}^{-1}$ .
- d) Factor de conversión alimenticia (FCA),  $\text{FCA} = \text{Alimento suministrado (g) X peso ganado.}$

e) Sobrevivencia (%) = (número final de organismos x 100) X número sembrado<sup>-1</sup>.

### **5.2.1.3.-Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos**

La temperatura y oxígeno disuelto (OD) del agua fueron monitoreados cada tercer día a las 8:00 y 16:00 horas. La concentración de oxígeno disuelto y temperatura se registró con un multianalizador marca YSI 150.

### **5.2.1.4.- Composición bioquímica de Juvenil**

Se determinó la composición bioquímica (proteína, carbohidratos y lípidos totales) de los juveniles completos, mediante la metodología descrita anteriormente para la calidad del huevo.

## **5.3.- Prueba de estrés.**

### **5.3.1. Determinación de LT<sub>50</sub> y LC<sub>50</sub> para amonio total, salinidad e hipoxia en juveniles de tilapia *O. niloticus***

Para la determinación de LT<sub>50</sub> y LC<sub>50</sub> de amonio total y salinidad se extrajeron seis hembras (323.9± 66.2) del stock de reproducción. Posterior a la eclosión de los organismos se seleccionaron 100 juveniles al azar de cada hembra. Los juveniles utilizados se registró un peso de 0.05 ±0.01g. Para la evaluaciones los organismos se colocaron en recipientes de 1000 ML por triplicado y un grupo control. En cada recipiente se colocaron 10 juveniles y se mantuvo una temperatura de 25 ± 1 °C. A partir de los datos registrados de mortalidad en las pruebas de estrés, se calculó la LC<sub>50</sub> para las diferentes concentraciones, con un intervalo de confianza del 95%, mediante un análisis de Probit (Hernández, 2001).

### **5.3.2. Amonio total**

Se sometieron 10 alevines por triplicado juveniles a seis concentraciones de amonio total 20.52, 30.78, 25.65, 35.91, 51.6 y 102.6 mg/L por un periodo de 24 hrs para registrar el número de organismos vivos y muertos, Las diferentes concentraciones fueron preparadas a partir de una solución base (1000mg/L) y se diluyó con agua destilada y se ajustó a PH 8.2 con hidróxido de sodio. La solución base fue preparada con cloruro de amonio (Sigma

Aldrich®). Para corroborar la concentración de amonio total en el agua se tomó una muestra.

Para la preparación de las diferentes concentraciones se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde  $C_1$ = concentración inicial,  $V_1$ = volumen inicial;  $C_2$  = concentración final y  $V_2$ = volumen final

#### Salinidad

Se sometieron a los juveniles de tilapia a cinco diferentes salinidades (15, 17, 18, 19 y 20 UPS), por un periodo de 24 hrs. Las diferentes concentraciones fueron preparadas con agua de mar filtrada y diluciones con agua destilada. La salinidad fue medida con la ayuda de un refractómetro (Lenox®, Massachussets EUA). Se realizaron muestreos cada hora para registrar el número de organismos vivos y muertos.

### **5.4. Búsqueda de nuevos polimorfismos de tres genes candidatos en reproductores de tres poblaciones de tilapia *O. niloticus*.**

#### **5.4.1. Selección de la muestra**

Se seleccionaron 5 hembras de cada población, para la búsqueda de nuevos los polimorfismos, a las hembras seleccionadas y se les tomo muestra de sangre de la aleta caudal a esta selección de hembras se les denomino como población de descubrimiento para la búsqueda de nuevos polimorfismos

#### **5.4.2. Extracción de ADN**

##### **5.4.2.1. Aislamiento de ADN**

El aislamiento de ADN se realizó con el kit comercial de la compañía Sigma – Aldrich (Genelute Mammalian Genomic Cat.G1N350). Se tomaron 200µl de sangre con EDTA como anticoagulante a un tubo de 1.5 ml y se adicionaron 20µl de proteinasa K, y se mezcló al vortex (Mini Vortex VWR3434) por 15 segundos, y posteriormente se adicionaron 20µl de RNasa, se mezcló e incubó por 2 minutos a temperatura ambiente, un vez pasado

el tiempo se adicionó 200µl de solución de lisis C (B8803); y se mezcló al vortex por 15 segundos y se encubó a 55°C por 10 minutos y se adicionaron 200µl de etanol al lisado y se llevó al vortex por 20 segundos. De manera separada se realizó la preparación de la columna, adicionando 500µl de solución de preparación de columna a la misma y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto, y se descartó la solución. Se transfirió el lisado más el etanol a la columna antes preparada y se centrifugó a 16,000 rpm (micro centrífuga HERMLE<sub>Z160M</sub>). Por 30 minutos se transfirió la columna a un tubo nuevo y se adicionó 500µl de solución de lavado y centrifugó a 6500rpm por 1 minuto, nuevamente se transfirió la columna a un tubo nuevo y se adicionó nuevamente 500µl de solución de lavado y se centrifugó a 12,000 rpm por 3 minutos para secar la columna. Por último se transfirió la columna a un tubo nuevo y adicionó 80µl de solución de elusión (10mMTris- HCL, 0.5Mm EDTA, PH 9.0) y centrifugó a 6500 rpm por 3 minutos.

#### **5.4.2.2 Cuantificación y Verificación de la calidad del ADN**

El ADN fue cuantificado y con el fin de verificar su calidad, las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1.5ml, a 100 Volts durante 30 min. Usando un marcado de peso molecular LAMBDA DNA (GibcoBBL® Cat N° 25250-10) a una concentración de 50 ng/1µl, esto con el fin de saber si las muestras contienen ADN. El ADN obtenido fue cuantificado en un Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific. Y se hicieron diluciones a una concentración de 10 ng /µl de cada una de las muestras de ADN seleccionadas.

#### **5.4.3.- Selección de los oligonucleótidos para la búsqueda de nuevos polimorfismos de reproductores de tres poblaciones de tilapia *O. niloticus*.**

##### **5.4.3.1-Gen Hormona de crecimiento (GH)**

El gen de la hormona de crecimiento de tilapia *O. niloticus*, posee 2341pb y su secuencia se encuentra disponible en la base de datos del Centro Nacional de Información en Biotecnología de Estados Unidos (National Center of Biothecnology Information, NCBI), bajo el código LOC100534452 en su última versión para los cuales, se diseñaron los oligos específicos en regiones flanqueantes con el programa Primer Select V7.0.0 de la Suite Lasergene, DNASTAR.



Tabla 2.- Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen GH

|   | Nombre del Primer | Secuencia<br>(5'- 3')   | Tamaño del producto de PCR en pb |
|---|-------------------|---|----------------------------------|
| 1 | GH1               | A:atgttgatgtcagagcacttt<br>B: tgaaaa agaccaaag ttacc              | 545pb                            |
| 2 | GH2               | A:ttctgtatgcacctgtgtatt<br>B:agtcaggtggtagtcgattggt               | 510pb                            |
| 3 | GH3               | A: acacaggaca gaagagcgca<br>tactgaagacta<br>B: ctgctggtgagggaggac | 552pb                            |
| 4 | GHp               | A: gtcgacctttatttcaga<br>B:gctcagagttttgcttta                     | 466pb                            |

#### 5.4.3.2.- IGF1 (Factor de crecimiento insulínico tipo 1)

El Gen de IGF1 en tilapia *O. mossambicus* el exón I posee 2001 pb, mientras que el exón 2 posee 223pb, el exón 3 posee 38pb y el exón 4 posee 221 pb estas secuencias se encuentran disponible en la base de datos del Centro Nacional de Información en Biotecnología de Estados Unidos (National Center of Biothecnology Information, NCBI), bajo el código AF033797 en su última versión, para los cuales, se diseñaron los oligos específicos en regiones flanqueantes con el programa Primer Select V7.0.0 de la Suite Lasergene, DNASTAR.

Tabla 3.- Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen IGF-I

|  | Nombre del Primer | Secuencia | Tamaño del producto de PCR en pb |
|--|-------------------|-----------|----------------------------------|
|--|-------------------|-----------|----------------------------------|

| (5'-3') |         |  |        |
|---------|---------|--|--------|
| 1       | IGF1    | A:cttaggacgagtaggaggcaaatg<br>B:gaaatacaagcaagcgataagaa  | 447pb  |
| 2       | IGF2    | A: actcttttccgatgatgctgtga<br>B: gaaataaaagcctcgctctccac | 223 pb |
| 3       | IGF3    | A: aataaaccaacaggctatggc<br>B: tcgcctgctttgaaactcttatg   | 568pb  |
| 4       | IGF4    | A: aaatgtgtttatgtttgc<br>B: ttgtttacagtgaaccattc         | 221pb  |
| 5       | IGF-Ip1 | A:atgatgatcgcttttgacc<br>B:ggcaccgtgtatctgacca           | 789pb  |
| 6       | IGF-Ip2 | A:gccaaattacgcacaacag<br>B:aatacaagcaagcgataagaat        | 696pb  |

#### 5.4.3.3. MyoG (Miogenina)

El Gen MyoG en tilapia *O. niloticus* posee 1892 pb, y está conformado por tres exones y cuatro intrones estas secuencias se encuentran disponible en la base de datos del Centro Nacional de Información en Biotecnología de Estados Unidos (National Center of Biothechnology Information, NCBI), bajo el código GU246717.1 en su última versión, para los cuales, se diseñaron los oligos específicos en regiones codificantes y no codificantes del gen de interés con el programa Primer Select V7.0.0 de la Suite Lasergene, DNASTAR.

Tabla 4.- Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen MyoG

| Nombre del Primer | Secuencia | Tamaño del producto de PCR en pb |
|-------------------|-----------|----------------------------------|
|-------------------|-----------|----------------------------------|

(5'-3')

|   |      |   |     |
|---|------|---|-----|
| 1 | Myo1 | A:<br>acacaggacagaagagcgcatactgaagacta<br>B: ctgctggttgaggaggac | 556 |
| 2 | Myo2 | A:tgtgcatctccatggcaacaggtg<br>B:aataatthaatcagcagaagc           | 431 |
| 3 | Myo3 | A: aataaaccaa caggctatggc<br>B: tcgcctgctttgaaactcttatg         | 590 |

### 5.5.- Optimización de las reacciones de PCR

Las amplificaciones de los fragmentos de cada gen requirieron variaciones en las concentraciones de ADN molde, magnesio, temperatura y programas de PCR empleados, mientras que no variaron las concentraciones de dNTPs (0.4 mM), primers (0.5  $\mu$ M) y GoTaq DNA Polimerasa (2.5 U); las condiciones óptimas para GH, IGF-I y MyoG se resumen en las tablas 5,6 y 7 respectivamente.

Tabla 5.- Programas empleados para las amplificaciones del gen GH

| Fragmento | Programa de PCR | ADN  | MgCl  |
|-----------|-----------------|------|-------|
| 1         | Touchdown 60    | 50ng | 1.5mM |
| 3         | Touchdown 60    | 50ng | 1.5mM |
| 4         | Touchdown 55    | 50ng | 1.5mM |

Tabla 6.- Programas empleados para las amplificaciones del gen IGF-I

| Fragmento | Programa de PCR | ADN  | MgCl  |
|-----------|-----------------|------|-------|
| 1         | Touchdown 65    | 50ng | 1.5mM |
| 2         | Touchdown 65    | 50ng | 1.5mM |

|   |              |      |       |
|---|--------------|------|-------|
| 3 | Touchdown 65 | 50ng | 1.5mM |
| 4 | Touchdown 55 | 50ng | 1.5mM |
| 5 | Touchdown55  | 50ng | 1.5mM |
| 6 | Touchdown55  | 50ng | 1.5mM |

Tabla 7.- Programas empleados para las amplificaciones del gen MyoG

| Fragmento | Programa de PCR | ADN  | MgCl  |
|-----------|-----------------|------|-------|
| 1         | Touchdown 55    | 50ng | 1.5mM |
| 3         | Touchdown 60    | 50ng | 3mM   |

### 5.5.1.- Búsqueda de Polimorfismos

#### 5.5.1.1.- Secuenciación de los fragmentos de PCR de los genes GH, IGF-I y MyoG

Todos los fragmentos de PCR obtenidos de la amplificación de los genes GH, IGF-I y MyoG en los individuos de la población uno fueron purificados utilizando el protocolo de Exo-SAP-it, el cual, brevemente se describe en el tabla 8.

Tabla 8.- Protocolo para la purificación de productos de PCR

| Reactivos de secuenciación |        |
|----------------------------|--------|
| Producto de PCR            | 2.0 µL |
| ExoSAP                     | 1.0 µL |
| Total                      | 3 µL   |

Los tubos fueron colocados en el programa EXO2 (37 °C por 15 min y 80 °C por 30 min) del termociclador MJ Research. Al finalizar guardar las reacciones a -20 °C. Posteriormente, los productos purificados fueron secuenciados bidireccionalmente

utilizando los mismos iniciadores de amplificación y utilizando el protocolo del estuche comercial BigDye® Terminador, el cual se describe a continuación:

Una vez purificada la muestra se procedió a preparar la reacción de secuenciación la consistió en colocar 1.0 µl de ADN templado de la purificación, 0.5 de primer, 2.0µl de la reacción Ready Reaction Premix 2X, 2.0µl Big Dye Seq. Buffer y 4.5 de agua destilada para cada muestra a secuenciar, se colocaron los tubos en programa SEC3130 del termociclador MJ Research. Por último se realizó la purificación de Xterminador donde se colocaron 22.5 µl de buffer SAM y 5 µl de Xterminador y se incubo con agitación el termomixer durante exactamente 30 min a 25°C de 1050 a 1200 rpm. Centrifugar las reacciones a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se tomó 21µ L del sobrenadante (sin tomar de la resina), se colocó en un nuevo tubo de PCR y se envió al secuenciador automático por capilaridad ABI PRISM 3100.

### **5.5.3.2.- Análisis de las secuencias y detección de los SNPs**

Al obtener las secuencias nucleotídicas se procedió a elaborar los contigs respectivos empleando el programa Cap3 Win V6.0.6000 (Huang & Madan, 1999), luego se procedió a realizar el alineamiento empleando el programa Mega5.10 (Tamura *et al.*, 2011)

### **5.6.- Validación de polimorfismos GHpA1 G/A, GHpB1 T/C y MyoG C/T de población de descubrimiento en genes observados en genes candidatos para crecimiento en poblaciones de tilapia *O. niloticus*.**

Para la validación de las variaciones génicas observadas en los genes GH (Hormona de crecimiento) y MyoG (Miogenina), se utilizaron un total de 86 crías de los reproductores previamente seleccionados como población de descubrimiento. La progenie (31 crías de los reproductores de H1, 27 de H2 y 28 de H3) tenía un peso promedio de  $0.9g \pm 0.007g$  y fueron liofilizados (Freezone plus 2.5L de LABCONCO). A partir de una muestra liofilizada se aisló ADN siguiendo el método CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Doyle & Doyle 1987).

Las variaciones génicas fueron analizadas utilizando ensayos de discriminación alélica diseñados y sintetizados en la compañía Applied Biosystems tomando como base las

secuencias en la población de descubrimiento anteriormente descrita (Tabla 2, 3 y 4). Todas las muestras fueron tipificadas utilizando 0.25µl de ADN (25 ng), 6.25µl de Taqman PCR Master mix (Applied Biosystems) y 0.3125µl de la mezcla de las sondas. Cada ensayo se realizó de forma individual en placas ópticas de 96 pozos en el equipo ABI Prism® 7000 (Sequence Detection System), bajo las siguientes condiciones; un ciclo a 50°C/2 min y 95°C/10 min, 40 ciclos de dos pasos 92°C/15 s y 60°C/1 min. Para el análisis de cada genotipo se utilizó el programa ABI Prism 7000 (Real-Time Sequence Detection Software). Los resultados fueron analizados con el programa ABI Prism® 7000 (Real-Time Sequence Detection Software). Por inspección visual se confirmaron los genotipos de cada muestra. Se generaron las frecuencias alélicas y genotípicas, de los 2 marcadores (GHpA1 G/A, GHpB1 T/C) de acuerdo a (Falconer & Mackay, 2001).

Tabla 9. Descripción de secuencias de iniciadores y sondas para validación de marcadores de tipo SNPs GHpA1 G/A, GHpB1 T/C y MyoG C/T en poblaciones de tilapia *O. niloticus*.

| Marcador | Primer Forward     | Primer Reverse                  | Sonda   |
|----------|--------------------|---------------------------------|---|
| GHpA1    | GGAGTTTTTGAAAACCTT | CACACCGCTGGTGACTAAAGT           | VIC-  |
|          | TACATTAGATCTCCTTT  |                                 | TCTGACATCCAGCATGTT<br>FAM-                          |
| GHpB1    | GGAGTTTTTGAAAACCTT | ACATTAACACCTCAATCATCATATTGATGCT | VIC-  |
|          | ACATTAGATCTCCTTT   |                                 | CTGACATCCAACATGTT<br>CTGGTGACTAAAAGTTTCTGAC<br>FAM- |
| MyoG     |                    |                                 | TGGTGACTAAAAGTCTCTGAC<br>VIC-                       |
|          |                    |                                 | FAM-  |

### 5.7.- Análisis estadístico

Para determinar si los datos productivos obtenidos eran significativamente diferentes, se usó el software computacional STATISTICA 7, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA,  $p < 0.05$ ) y las diferencias entre medias (Prueba de ducan), para definir qué tratamiento o tratamientos fueron estadísticamente diferentes se compararon por la con un intervalo de confianza del 95% (Sokal y Rohlf, 1981). Para sobrevivencia primero se transformaron los datos  $\ln(x)$ . En las variables de calidad de huevo y juvenil, se realizó un análisis de correlación con una  $P < 0.05$  para

determinar la repuesta al peso inicial en juveniles a variaciones en los niveles de proteína, lípidos y carbohidratos. Se usó el software computacional STATISTICA 7.

## 6.- Resultados

### 6.1.- Variables de calidad de huevo evaluadas en poblaciones de tilapia *O. niloticus*.

#### 6.1.1.- Variables relacionadas con el desempeño reproductivo de poblaciones de *O. niloticus*.

En la tabla 10 muestra una serie de variables relacionadas con el desempeño reproductivo de poblaciones de *O. niloticus* después de 7 días de aclimatación. No se presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para ninguna de las variables mencionadas. Sin embargo las hembras de la población H2 registraron el número de desoves más alto, mientras que las hembras de la población H1 presentaron el mayor peso húmedo de huevos con  $0.38 \pm 0.1$  g con respecto a las otras dos poblaciones.

Tabla 10.- Número de desoves e infértiles, peso húmedo y seco, número de huevos y porcentaje de eclosión de hembras de tres poblaciones de tilapia *O. niloticus*

| Población | Peso Hembras (g) | Desoves | Peso húmedo (20 huevos) (g) | No. de huevos       | Eclosión%          | No. de desoves infértiles (%) |
|-----------|------------------|---------|-----------------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------|
| H1        | 136.0 a 339.9    | 8       | $0.38 \pm 0.1^a$            | $859.75 \pm 66.2^a$ | $48.55 \pm 1.23^a$ | 20                            |
| H2        | 176.0 a 417.5    | 12      | $0.34 \pm 0.1^a$            | $991.25 \pm 66.2^a$ | $47.65 \pm 1.17^a$ | 41                            |
| H3        | 232.1 a 596.6    | 11      | $0.35 \pm 0.05^a$           | $762.75 \pm 66.2^a$ | $48.25 \pm 1.0^a$  | 18                            |

Letras iguales no hay diferencias significativas (a), Letras diferentes si presentan diferencias significativas entre las variables evaluadas.

## 6.2.-Tamaño y composición bioquímica de huevos de hembras de tres poblaciones de tilapia *O. niloticus*.

En la figura 1 se presentan las correlaciones entre las variables en el contenido químico de huevo y su tamaño, observando correlaciones positivas en las variables de área del huevo y el contenido de lípidos en huevo ( $R^2= 0.2445$  y una ecuación de  $Y=2.903x + 90.8$ ), y a su vez la variable anterior se observó una correlación lineal con el contenido de proteína en el huevo mostrando una ecuación ( $y= 0.3082x - 65.836$ ,  $R^2= 0.6524$ ). Así como también una correlación entre las variables de contenido de lípidos en el huevo y el contenido de lípidos en el juvenil ( $y= 1.1799x - 16.942$ ,  $R^2=0.02279$ ). Mientras para los carbohidratos en el juvenil es una correlación potencial negativa ( $P<0.01$ ) con respecto al contenido de lípidos en el huevo.

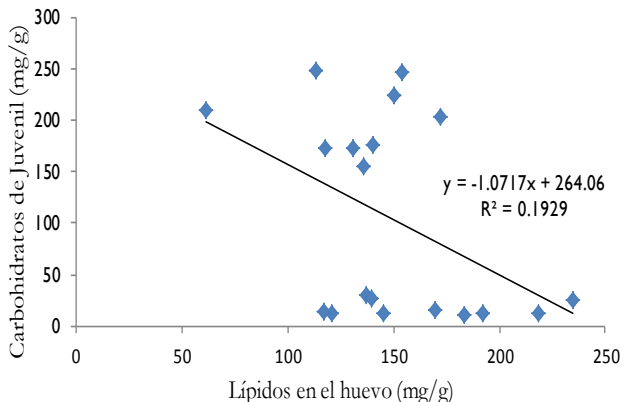
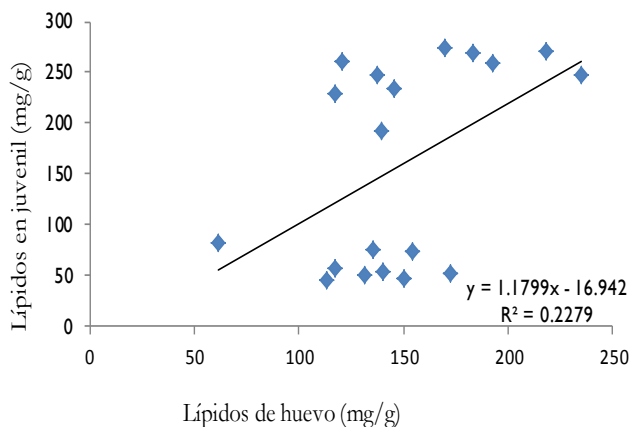
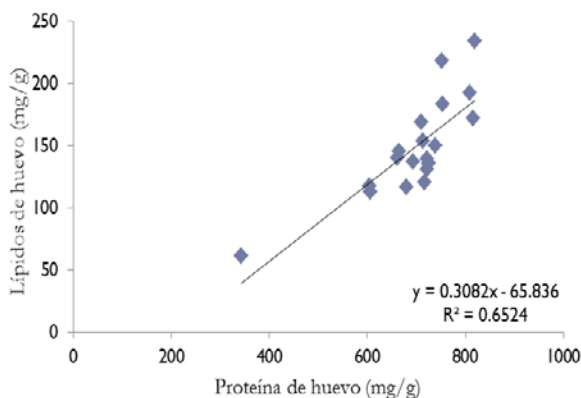
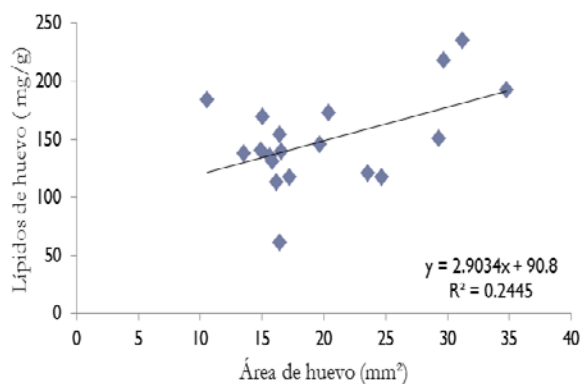




Figura 1. Correlaciones entre las variables de contenido químico y talla de huevos de hembras de tilapia *O. niloticus*

En la tabla 11 Se evaluaron los parámetros de Longitud mayor y menor de la superficie de los huevos de las población 3 en estudio. Teniendo como resultados que la población H3 presentó una longitud mayor ( $2.81\pm 0.5\text{mm}$ ) y una Longitud menor ( $2.36\pm 0.4\text{mm}$ ) superior a la poblaciones H1 y H2, así como también un volumen mayor ( $77.88\pm 10.28$ ) y un área mayor ( $21.39\pm 1.34$ ) con respecto a la poblaciones H1 y H2. No se presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los parámetros evaluados en las tres poblaciones de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 11.- Promedio más desviación estándar de Longitud mayor, menor, volumen y área de huevos de hembras de 3 poblaciones de tilapia *O. niloticus*

| Población | LM (mm)           | Lm(mm)            | Volumen(mm <sup>3</sup> ) | Área               |
|-----------|-------------------|-------------------|---------------------------|--------------------|
| H1        | $2.72 \pm 0.08^a$ | $2.19 \pm 0.09^a$ | $67.77 \pm 11.66^a$       | $19.37 \pm 1.65^a$ |
| H2        | $2.73 \pm 0.05^a$ | $2.21 \pm 0.09^a$ | $68.56 \pm 7.78^a$        | $19.52 \pm 1.03^a$ |
| H3        | $2.81 \pm 0.5^a$  | $2.36 \pm 0.4^a$  | $77.88 \pm 10.28^a$       | $21.39 \pm 1.34^a$ |

LM (Longitud Mayor) Lm (Longitud menor), mm (Milímetros) mm<sup>3</sup>(Milímetros cúbicos) Letras iguales no hay diferencias significativas (a), Letras diferentes si presentan diferencias significativas entre las variables evaluadas (a).

### 6.3.- Análisis de contenido químico (proteína, lípidos y carbohidratos) en el huevos de tres poblaciones de hembras de tilapia *O. niloticus*.

Los contenidos de proteína, lípidos y carbohidratos en los huevos no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ; tabla 12). La población H1 obtuvieron valores promedios más altos de concentración de proteína ( $739.64\text{mg/g}$ ;  $P < 0.05$ ) y Carbohidratos ( $10.50\text{mg/g}$ ;  $P < 0.05$ ) en los huevos de hembras evaluadas, mientras que la concentración de lípidos fue mayor en la población H3 ( $157.52\text{ mg/g}$ ;  $P < 0.05$ ).

Tabla 12.- Contenido bioquímico (proteína, lípidos y carbohidratos) de huevos de hembras de tilapia *O. niloticus*.

| Poblaciones | Proteína totales<br>(mg g <sup>-1</sup> ) | Lípidos totales<br>(mg g <sup>-1</sup> ) | Carbohidratos totales<br>(mg g <sup>-1</sup> ) |
|-------------|---|--|--|
| <b>H1</b>   | 721.48± 20.4 <sup>a</sup>                 | 165.3± 7.7 <sup>a</sup>                  | 7.9± 10.50 <sup>a</sup>                        |
| <b>H2</b>   | 640.18 ±61.6 <sup>a</sup>                 | 129.2± 15.4 <sup>a</sup>                 | 9.6±1.74 <sup>a</sup>                          |
| <b>H3</b>   | 739.94±22.1 <sup>a</sup>                  | 156.1± 30.8 <sup>a</sup>                 | 8.3± 0.80 <sup>a</sup>                         |

Valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticas.

#### 6.4.- Evaluación de calidad de juvenil.

##### 6.4.1.- Bioensayo de crecimiento

Al finalizar el período de engorda (45 días) el peso promedio inicial la población H1 presentó valores promedio (0.0098 ± 0.005), mientras que la población H2 y H3 tuvieron pesos muy similares de 0.0157g y 0.015g siendo estadísticamente diferentes a la población H1 (Tabla 11; P > 0.05) con un mayor peso inicial. En el peso final la población H1 tuvo un peso de 0.9934g, mientras que la población H2 presentó un peso final de 1.203g, y por último la población H3 presentó un peso final de 0.7877g de acuerdo al modelo estadístico aplicado se encontraron diferencias estadísticas entre las tres poblaciones (p< 0.05). Entre las poblaciones tilapia en relación a su sobrevivencia, no se presentaron diferencias significativas (p > 0.5), registrando para la población H1 de 62 % ± 26 %, mientras que para la población H2 presentó una sobrevivencia del 64 % ± 9.66 % aparentemente y la población H3 fue la especie que presentó una menor supervivencia (82.67% ± 10.47%) aunque no fue estadísticamente diferente (Tabla 13).

Tabla 13.- Media más desviación estándar de bioensayo de crecimiento, peso inicial, final longitud y supervivencia sobrevivencia de tres poblaciones de tilapia *O. niloticus*.

| Población | Peso Inicial | Peso Final | SGR | Supervivencia | FCR |
|-----------|--------------|------------|-----|---------------|-----|
|-----------|--------------|------------|-----|---------------|-----|

|    | (g)                       | (g)                      | (% BW d <sup>-1</sup> )   | (%)            |                         |
|----|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------|-------------------------|
| H1 | 0.01 ± 0.002 <sup>a</sup> | 0.81 ± 0.34 <sup>b</sup> | 10.03 ± 0.14 <sup>a</sup> | 62.00 ± 26.00a | 1.57 ± 0.5 <sup>a</sup> |
| H2 | 0.01 ± 0.004 <sup>a</sup> | 1.20 ± 0.06 <sup>a</sup> | 9.40 ± 0.18 <sup>ab</sup> | 64.00 ± 9.66a  | 1.59 ± 0.6 <sup>a</sup> |
| H3 | 0.01 ± 0.002 <sup>a</sup> | 0.89 ± 0.40 <sup>b</sup> | 9.36 ± 0.2 <sup>b</sup>   | 82.67 ± 10.47a | 1.49 ± 0.1 <sup>a</sup> |

Gramos (g). Centímetros, Por ciento (%). Probabilidad de una ANOVA de una vía entre tratamientos. Valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticas. Letras diferentes representan diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

#### 6.4.2. Contenido bioquímico en el juvenil después de 45 días de cultivo de poblaciones de tilapia *O. niloticus*

En el contenido bioquímico de juvenil después de 45 días de cultivo en la figura 1 se observa el contenido de lípidos en el juvenil se correlacionan con el contenido de proteína en el juvenil presentándose una correlación potencialmente positiva.

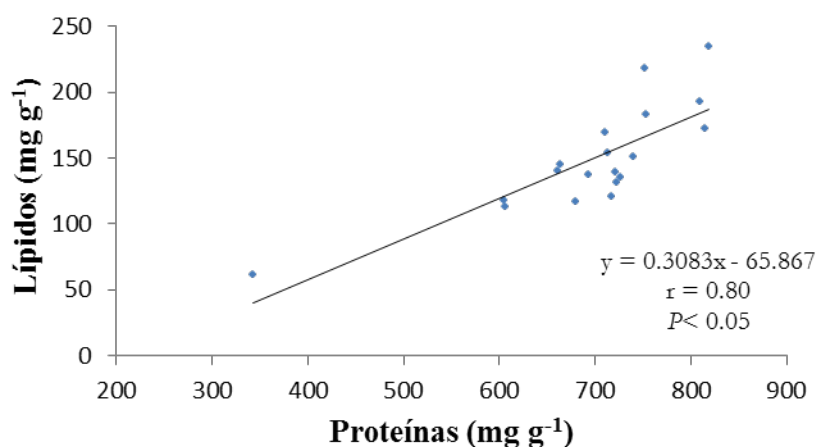


Figura 2. Correlación negativa entre las variables de contenido de lípidos en el juvenil y el contenido de carbohidratos en juveniles de poblaciones *O. niloticus* después de 45 días de cultivo.

Los contenidos de proteína, en los juveniles no presentaron diferencias estadísticas entre las poblaciones ( $p < 0.05$ ; tabla 14) siendo la población de H1 obtuvieron valores promedios más altos de concentración de proteína ( $304.67\text{mg/g}$ ;  $P < 0.05$ ). Mientras que en el contenido de lípidos ( $93.4 \pm 30.4 \text{ mg/g}$   $P < 0.05$ ) no se observaron diferencias estadísticas entre las poblaciones y en el contenido de carbohidratos.

Tabla 14.- Contenido bioquímico (proteína, lípidos y carbohidratos) de juveniles de tilapia *O. niloticus*.

| Poblaciones | Proteína totales<br>(mg/g) | Lípidos totales<br>(mg/g) | Carbohidratos totales<br>(mg/g) |
|-------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| H1          | $417.5 \pm 22.7^a$         | $240.1 \pm 10.6^a$        | $22.1 \pm 3.37^a$               |
| H2          | $341.1 \pm 61.4^a$         | $221.3 \pm 17.0^a$        | $54.1 \pm 9.65^b$               |
| H3          | $297.9 \pm 30.3^a$         | $235.8 \pm 14.6^a$        | $25.0 \pm 8.62^a$               |

Valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticas, valores con letras distintas presentan diferencias significativas.

#### 4.3.- Determinación de $LT_{50}$ para amonio total, salinidad e hipoxia en juveniles de tilapia *O niloticus*.

La tabla 15 y 16 muestra los valores de La pruebas realizada para obtener el tiempo y concentración letal del 50% ( $LT_{50}$ ) de amonio y salinidad para juveniles de tilapia *O. niloticus*.

En amonio las concentraciones de 30.78 a 51.6mg/L registraron una mortalidad del 50 % en menos de 4 h. Con relación a las pruebas de capacidad de respuesta a variaciones de salinidad, El  $LT_{50}$  a concentraciones de 15, 17, 18, 19 y 20 UPS, fue observado después de 24h. Concentraciones de 19 UPS de salinidad registraron un  $LT_{50}$  a las 8 h.

Tabla 15.- Toxicidad de diferentes concentraciones de amonio y salinidad para juveniles de tilapia *O. niloticus*.

| Amonio total |                  | Salinidad |                  |
|--------------|------------------|-----------|------------------|
| (mg/L)       | LT <sub>50</sub> | (UPS)     | LT <sub>50</sub> |
| 20.52        | > 24h            | 15        | >24h             |
| 25.65        | 12h              |           |                  |
| 30.78        | 4h               | 17        | 10h              |
| 35.91        | 2.5h             | 18        | 15h              |
| 51.6         | 2 h              | 19        | 12h              |
| 102.6        | 30min            | 20        | 8h               |

**6.4.4.- Datos obtenido de mortalidad obtenida de LC<sub>50</sub> calculada en las tres poblaciones de tilapia *O. niloticus*.**

Los valores calculados de LC<sub>50</sub> para 2, 4, 6 12 y 24 h para pruebas de amonio total, la LC<sub>50</sub> fue de 35.91 respectivamente. Para las pruebas a diferentes concentraciones de salinidad el valor LC<sub>50</sub> en tiempo de 24 h, es de 19.32 UPS. En las pruebas de estrés, El análisis de una vía reveló que existen diferencias estadísticas en la mortalidad (Salinidad) (tabla 14) teniendo que la población H3 que presentó una mortalidad en la pruebas de salinidad mayor del 57.77%, mientras que la población H1 fue la que presentó una mortalidad menor con el 24%, los cuales no fueron estadísticamente diferentes (P> 0.05). Mientras que en las pruebas de amonio realizadas no se presentaron diferencias significativas entre las poblaciones, pero si correlación positiva entre la mortalidad y el contenido de carbohidratos en el huevo (figura 7).

Tabla 16.- Mortalidades obtenidas de pruebas de estrés (amonio y salinidad) en juveniles de tilapia *O. niloticus*

| Poblaciones | Amonio | Salinidad |
|-------------|--------|-----------|
|             | (%)    | (%)       |
|             |        |           |

|    |                          |                          |
|----|--------------------------|--------------------------|
| H1 | 17.6 ± 4.3 <sup>a</sup>  | 24.2 ± 12.5 <sup>a</sup> |
| H2 | 22.8 ± 8.75 <sup>a</sup> | 40.6 ± 7.7 <sup>ab</sup> |
| H3 | 12.6 ± 1.58 <sup>a</sup> | 57.7 ± 12.5 <sup>b</sup> |

Probabilidad de una ANOVA de una vía entre tratamientos. Valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticas.

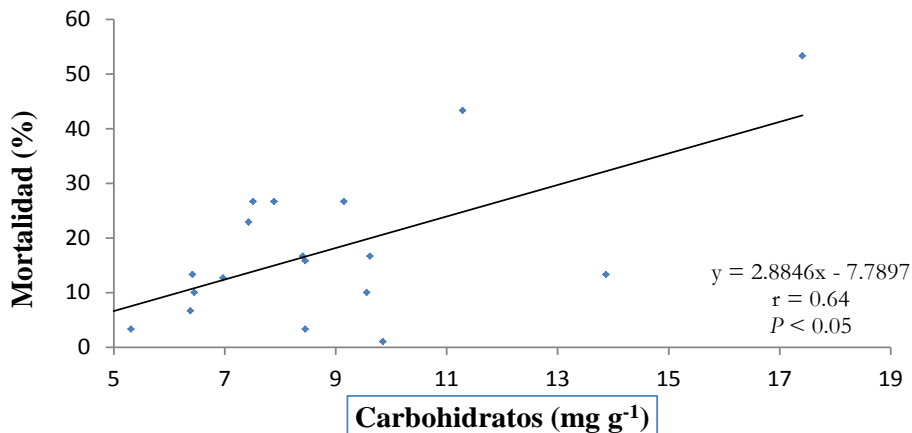


Figura 3. Correlación positiva entre las variables de estrés (Amonio) y el contenido de carbohidratos en el huevo.

### 6.5.- Búsqueda de variación genética de genes candidatos para crecimiento en poblaciones de tilapia *O. niloticus*.

Para el gen GH, se secuenciaron 1,097 pb en un promedio de 15 individuos de las tres poblaciones, es decir, se secuenciaron 16,455 pb. Mientras que para el gen de IGF-I se secuenciaron 1459 pb, en 15 individuos dando como resultado 21,885 pb analizadas, mientras que para el gen MyoG se secuenciaron 1,146pb en seis individuos teniendo un total 6,876 pb. El gen IGF-I fue el gen más variable entre los individuos con respecto a la secuencia de referencia, mientras que MyoG fue el menos variable entre los individuos con respecto a la secuencia de referencia.

### 6.5.1.- Identificación de los polimorfismos

#### 6.5.1.2.- Polimorfismos en el gen GH

En el gen GH se observaron variaciones de tipo SNPs dos transiciones en la región promotora una (A/G) localizada en la posición 271 la cual fue polimórfica en la población re-secuenciada y otra (G/T) localizada en la posición 284 del gen observada en solo un individuo, también se observó una ausencia de un tetra nucleótido en el microsatélite el cual se encuentra en la posición 336 de la región no codificante del fragmento, este evento se pudo observar en 14 individuos de 15 (Tabla 17) analizados.

Tabla 17.- Polimorfismos observados en los genes GH en la población de descubrimiento seleccionada.

| GEN | Polimorfismo | Localización | Región   |
|-----|--------------|--------------|----------|
| GH  | A/G          | 271          | Promotor |
| GH  | C/T          | 284          | Promotor |

#### 6.5.1.3.- Polimorfismos SNP's en el gen IGF -I

Para el gen IGF- I se observaron en total 8 cambios nucleotídicos ubicados en los intrones y región promotora (Tabla 18).

Tabla 18.- Polimorfismos observados en el gen IGF-I en la población de descubrimiento.

| GEN   | Polimorfismo     | Localización | Región |
|-------|------------------|--------------|--------|
| IGF-I | Transversión T/A | 1,251        | Intrón |
|       | Transición G/A   | 1,373        | Intrón |
|       | Transversión C/G | 1,431        | Intrón |
|       | Transversión T/G | 1,428        | Intrón |

|                     |                  |     |          |
|---------------------|------------------|-----|----------|
| IGF-I <sub>P1</sub> | Transversión G/C | 308 | Promotor |
|                     | Transversión T/A | 348 | Promotor |
|                     | Transversión C/G | 363 | Promotor |
|                     | Transición C/T   | 319 | Promotor |

#### 6.5.1.4.- Polimorfismos SNP's en el gen MyoG

Para el gen MyoG se observó 1 cambio nucleotídico (T/ C) en 4 individuos ubicado en la región del intrón en la posición 1,262 del gen (Tabla 19)

Tabla 19.- Polimorfismos observados en el gen IGF-I en la población de descubrimiento

| GEN  | Polimorfismo | Localización     | Región |
|------|--------------|------------------|--------|
| MyoG | C/T          | Transición 1,262 | Intrón |

#### 6.6.- Validación de polimorfismos GHpA1 G/A, GHpB1 T/C y MyoG C/T de población de descubrimiento en genes observados en genes candidatos para crecimiento en poblaciones de tilapia *O. niloticus*

##### 6.6.1.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los marcadores (GHpA1 G/A y GHpB1 T/C y MyoG C/T)

Los análisis de discriminación alélica fueron realizados en la totalidad de las muestras. El genotipo GHpA1AA se encontró en una frecuencia 1.58%, siendo el genotipo heterocigoto (GHpA1AG) el que presentó la frecuencia más baja (0.49%) a diferencia del 98.42 % de individuos homocigotos encontrados para genotipo GHpA1GG. Un punto importante a resaltar es que el genotipo GHpB1CC no fue encontrado en las muestras analizadas, únicamente se presentó el genotipo GHpB1TT en el 2.03 % de la población de los individuos estudiados por lo que el 97.97 % de los genotipos fueron heterocigotos (Tabla 20). En la tabla 21 y 22 se muestran los resultados de las frecuencias alélicas para



cada marcador. El GHpA1G presentó una mayor frecuencia en las tres poblaciones, con respecto al alelo GHpA1A. Mientras que el alelo GHpB1T presentó una frecuencia mayor en la población de H1, siendo H2 y H3 las que presentaron una frecuencia mayor del alelo GHpB1C entre los individuos tipificados.

Tabla 20 .- Frecuencias genotípicas de los marcadores GHpA1 G/A y GHp B1 T/C respecto a las tres poblaciones de tilapia *O. niloticus*.

| Población | GHpA1A/G |      |     | GHpB1T/C |      |    |
|-----------|----------|------|-----|----------|------|----|
|           | AA       | GA   | GG  | TT       | TC   | CC |
| H1 (n=31) | 0.07     | 0.12 | 0.8 | 0.1      | 0.9  | -- |
| H2 (n=27) | 0.1      | 0.2  | 0.7 | 0.03     | 0.97 | -- |
| H3 (n=28) | 0.03     | 0.17 | 0.8 | 0.1      | 0.9  | -- |

Tabla 21.- Frecuencias alélicas de los marcadores GHpA1 G/A y GHp B1 T/C respecto a las tres poblaciones de tilapia *O. niloticus*.

| Población | GHpA1A/G |     | GHpB1C/T |     |
|-----------|----------|-----|----------|-----|
|           | A        | G   | C        | T   |
| H1 (n=31) | 0.1      | 0.9 | 0.4      | 0.6 |
| H2 (n=27) | 0.2      | 0.8 | 0.6      | 0.4 |
| H3 (n=28) | 0.2      | 0.8 | 0.6      | 0.4 |

Tabla 22.- Frecuencias alélicas y genotípicas de los marcador MyoG C/T respecto a las tres poblaciones de tilapia *O.niloticus*.

| <b>Población</b> | <b>MyoG<br/>C/T</b> | CC | CT  | TT  | C   | T   |
|------------------|---------------------|----|-----|-----|-----|-----|
| <i>H1</i>        |                     | -- | 0.2 | 0.8 | 0.1 | 0.9 |
| <i>H2</i>        |                     | -- | --  | --  | --  | 1   |
| <i>H3</i>        |                     | -- | 0.4 | 0.6 | 0.2 | 0.8 |

## 7.- Discusiones

### 7.1.- Calidad de huevo

Las comparaciones entre las diferentes poblaciones de la tilapia *O. niloticus* pueden ser difícil de explicar, ya que podría verse afectada por diferentes variables como: el número de juveniles, agotamiento reproductivo, selección asociados a la domesticación, entre otros (Osure y Phelps, 2006). En consecuencia, la calidad del huevo y larvas depende de la fuente de reproductores. Duponchelle y Legendre (2001) estudiaron el tamaño de los huevos de *O. niloticus* de nueve lagos africanos durante dos años, obteniendo que el tamaño es similar para todas las poblaciones. Asimismo, Gunasekera *et al.* (1996) no observaron diferencias en el tamaño del huevo, cuando se alimentó a los reproductores de *O. niloticus* con tres niveles distintos de proteína. En este estudio no se observó evidencia de que la variación en la población de reproductores presentara una influencia en los parámetros reproductivos de las hembras (porcentaje de incubación y numero de huevos por desove) y la calidad del huevo (peso, tamaño y contenido bioquímico). Es conocido que la composición bioquímica de los huevos depende de varios factores como la dieta, la edad de los reproductores, las diferencias genéticas intraespecíficas y la temporada de desove (Faulk y Holt 2008). La mayoría de los estudios se centran en el efecto de la dieta sobre el contenido del huevo. Por ejemplo, Gunasekera *et al.* (1996) Observaron una correlación directa entre el nivel de proteína en la dieta de reproductores de *O. niloticus*, y el contenido

de proteínas en el huevo, con valores de 57.7 a 60.3% de proteína, valores similares fueron reportados (62.59%) por El-Sayed y Kawanna (2008), los cuales coinciden con los valores obtenidos en el presente trabajo (63%) para la misma especie. Valbuena-Villarreal *et al.* (2013) mencionan que las dietas comerciales para reproductores contienen una composición adecuada para mantener la calidad de los huevos. Lupatsch *et al.* (2010), observó que las hembras de tilapia presentan la capacidad para obtener nutrientes de diferentes fuentes de alimentos que garanticen la calidad del huevo. En el presente trabajo, los reproductores de tilapia fueron alimentados con una dieta comercial adecuadamente formulada para una reproducción óptima. La composición bioquímica de huevos se ve afectada principalmente por acción de la dieta, esto explicaría la similitud general entre las tres poblaciones, a pesar del origen. La relación directa entre el contenido de proteínas y lípidos en los huevos observados en el presente estudio sugiere que la acumulación de los nutrientes en los huevos se correlaciona a la formación de la vitelogenina, una molécula glicolipoproteína necesario para la producción de reservas de huevo y nutrientes para el desarrollo del embrión (Sarasquete *et al.*, 1993; Brooks *et al.*, 1997).

## **7.2.- Calidad de juvenil de juveniles de tilapia *O. niloticus***

Actualmente la producción de juveniles en cantidades suficientes y calidad aceptable representa uno de los principales “Cuellos de botella” en la producción de organismos acuáticos bajo condiciones controladas (García- Ulloa, 2000). De ahí surge la necesidad de identificar los juveniles de buena condición fisiológica, que se considera presentan mejor supervivencia en condiciones sub óptimas, asegurando el éxito de la progenie durante su fase de engorda (Racotta *et al.*, 2003). Se define como calidad del juvenil dependiendo de la respuesta de los organismos a diferentes criterios como: composición bioquímica, supervivencia, talla y pruebas de estrés, entre otros muchos criterios, los cuales pueden ser muy subjetivos. Bray - Lawrence (1991), evalúan la calidad de los juveniles por medio de su desempeño en la engorda, tomando en cuenta supervivencia y tamaño final. En el presente trabajo se determinó la calidad del juvenil mediante los criterios comúnmente usados (talla, composición química, y respuesta a pruebas de estrés). Para camarones, Bray y Lawrence (1992) recomienda el uso de postlarvas de peso como un parámetro fiable para evaluar la calidad, debido a las

diferencias fisiológicas entre las poblaciones se pueden distinguir incluso para primeras etapas de vida. Nuestros resultados confirman esto, teniendo en cuenta que el peso y la SGR de la tilapia varían significativamente dependiendo de la fuente de reproductores, justo después de la eclosión, así como al final del experimento. Se sabe que la composición bioquímica de los juveniles puede estar influenciado por factores tales como la edad, el sexo, el medio ambiente y la periodo reproductivo (Penney *et al.*, 2006). En este estudio, se encontraron diferencias en el contenido de carbohidratos en los juveniles de tilapia de las tres poblaciones estudiadas. Menores contenido bioquímico se ha utilizado como criterio de calidad para cobia, *Rachycentron canadum* (Faulk y Holt, 2008), *Gadus morhua* L. y (Lanes *et al.*, 2012). En el presente trabajo, un mejor rendimiento del crecimiento se obtuvo con los juveniles que contenían el mayor contenido de carbohidratos (grupo H2). Las diferencias en el metabolismo de los carbohidratos en los huevos obtenidos a partir de diferentes poblaciones se observaron en el besugo (*Sparus aurata*), que fue a las vías metabólicas de carbohidratos (Lahnsteiner y Patarnello 2004). Coincidiendo con Hargreaves (1998) y en base a los valores de LC<sub>50</sub> obtenidos en el presente trabajo (35.9 mg L<sup>-1</sup>), los resultados de las pruebas de amonio obtenidos en el presente trabajo sugieren que *O. niloticus* es un pez tolerante en comparación con otras especies más sensibles tales como, *Catla catla* con una LC<sub>50</sub> de 45 mg L<sup>-1</sup> (Tilak *et al.*, 2002), y *C. mrigala* H. con 26.4 mg L<sup>-1</sup> (Das *et al.*, 2004) para el mismo período de exposición (24h). La prueba de estrés de amonio fue previamente utilizado para evaluar la calidad de las larvas o juveniles de *Cyprinus carpio* (Israelí-Weinstein y Kimmel 1998) y *Oncorhynchus mykiss* juvenil (Mechas y Randall, 2002). Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias en la prueba de estrés de amonio entre los tres grupos, a pesar de las diferencias en el crecimiento, lo que posiblemente indica que tal criterio de calidad no es adecuada para los peces como la tilapia o no es lo suficientemente sensible. Se detectó una relación directa entre el contenido de carbohidratos en el huevo y la mortalidad de juvenil para la prueba de amonio. Las relaciones complejas entre el metabolismo de los carbohidratos durante el desarrollo embrionario y los procesos de glucólisis, gluconeogénesis, la vía pentosa-fosfato y viabilidad de los huevos, se han establecido (Lahnsteiner y Patarnello, 2004; Lahnsteiner, 2005). Estos resultados indicaron la importancia de la síntesis de oligosacáridos, polisacáridos y glicoproteínas como componentes esenciales de células de

embrión en desarrollo, aunque en varios casos la relación era cuadrática, la cual indica que a partir de cierto nivel de carbohidratos se presenta un efecto en la viabilidad del huevo, debido a un desequilibrio en el desarrollo metabólico. Del mismo modo, se observó que un alto contenido total de carbohidratos en los huevos se correlacionó con una mayor mortalidad a prueba de estrés de amonio en juvenil, posiblemente porque las larvas nacidas de un grupo huevos con un contenido de carbohidratos anormalmente altos presentan un cambio utilización de nutrientes adecuados para el desarrollo, o a su vez puede existir un vínculo entre el metabolismo de los carbohidratos y la capacidad fisiológica para hacer frente a la alta concentración de amonio. Debido a los resultados actuales donde sólo se midió la concentración total de carbohidratos, no es posible proporcionar una explicación, y los estudios específicos relacionados con los mecanismos del metabolismo y la desintoxicación de amonio / trastornos metabólicos carbohidratos causadas por el amonio son necesarios para encontrar una mejor respuesta. Por otra parte, el grupo que presentó (H1) rendimiento el más alto en términos de crecimiento y la supervivencia al estrés de salinidad, presentó el contenido de carbohidratos más baja en juveniles, insinuando que un contenido excesivo de carbohidratos, podría estar asociada con la baja calidad. La exposición a baja salinidad se utiliza comúnmente como una prueba de esfuerzo en los camarones peneidos, lo que resulta en un índice sensible de la calidad de las larvas o postlarvas (Palacios y Racotta, 2007). La tolerancia a una prueba de esfuerzo alta salinidad también se aplica para los peces marinos en estadios larvales tempranos y se correlaciona con anterior calidad de los huevos, así como a un mayor desarrollo (Kjørsvik *et al.*, 2003). En el caso de *O. niloticus*, se supone que la salinidad es a menudo correlacionada negativamente con la capacidad de crecimiento (Lemarié *et al.*, 2004), sin embargo, no existen estudios, donde se mencione, su utilidad como criterio de calidad de las larvas. Por otro lado, la tolerancia a la salinidad se ha analizado ampliamente para *O. mossambicus* y otros híbridos de tilapia durante el cultivo (Suresh y Lin, 1992; García-Ulloa *et al.*, 2001). Los valores de LC<sub>50</sub> obtenidos para la prueba de la salinidad son difícilmente comparables con los reportados por otros autores, sobre todo porque la mayoría de los estudios evaluaron el efecto a largo plazo de la alta salinidad utilizando protocolos de aclimatación gradual (Suresh y Lin, 1992 Lemarié *et al.*, 2004). LC<sub>50</sub> obtenidas en 24 hrs en el presente trabajo (19.5 ppt) es similar a la tolerancia de 18 ppt observada para la misma especie que

se presenten directamente a diferentes salinidades (Suresh y Lin, 1992). En nuestro estudio, la tilapia del grupo H3 mostró la mayor tasa de mortalidad para la prueba de la salinidad. Este grupo son reproductores manipulados genéticamente produciendo 98-100% varones descendencia resultante de "supermachos" cruce YY XX con hembras normales (Mair *et al.*, 1997), y por lo tanto, la capacidad osmoregulatoria podría ser alterado, ya sea por las hormonas ligadas al sexo o por otras características vinculadas a la manipulación genética implicada en la obtención de "supermachos" YY modificados. Alguna evidencia existe de que las hormonas esteroides disminuyen la capacidad hiposmorreguladora de trucha de mar (*Salmo trutta*; Madsen y Korsgan, 1991), a pesar de una evidencia más directa de una posible capacidad osmoregulatoria menor de los machos en comparación con las hembras debe ser establecido. Otra posibilidad debe estar relacionada con una característica ligada al sexo como el crecimiento, porque la tolerancia a la salinidad es a menudo una correlación negativa con la capacidad de crecimiento, aunque esto no fue el caso en el presente trabajo, ya que el grupo H3 presentó la menor tasa de crecimiento. El mayor crecimiento correspondió a la H2 grupo que también presentó la mayor tolerancia a salinidad.

### **7.3.- Búsqueda de variación genética de genes candidatos para crecimiento en poblaciones de tilapia *Oreochromis niloticus*.**

En el presente trabajo se utilizó la estrategia de genes candidatos para encontrar y validar variación genética que se asocie a rasgos de crecimiento en la tilapia. Algunos estudios han indicado que este enfoque dirigido es una herramienta eficaz para el descubrimiento de SNPs en genes que regulan rasgos específicos (Primmer *et al.*, 2002; De-Santis y Jerry, 2007; Hemmer-Hansen *et al.*, 2011). Se re-secuenciaron 1,563 pb del gen GH (30 % región promotora, 40 % fueron exones y 30 % de intrones) de las tres poblaciones de tilapia seleccionadas, identificando dos transiciones en la región promotora una localizada en la posición -284 (A/G), la cual fue polimórfica en la población re-secuenciada y otra localizada en la posición -271 (G/T), observado en un individuo. Para IGF-I se re-secuenciaron 2944 pb (10% región promotora, 45% exones y 45% intrones). En la población de descubrimiento estudiada se identificaron un total 8 cambios nucleotídicos (6 transversiones y 2 transiciones), 4 ubicados en los intrones (T/A, G/A, C/G y T/G) y 4 en la región promotora (G/C, T/A, C/G y C/T). El número medio de polimorfismos en regiones

intrónicas fue mayor en comparación con las regiones de los exones y promotoras similar a lo reportado por Diopere *et al.*, (2013). Para el gen Miogenina (MyoG), se re-secuenciaron 1,146 pb, 66% de la región codificante del gen en seis individuos donde se identificó una transición en la región no codificante (C/T), en 4 de 6 individuos re-secuenciados. En total se identificaron 11 variaciones nucleotídicas en la población de descubrimiento, el gen IGF-I fue el que presentó mayor variabilidad genética, seguido por el gen GH y MyoG. Dentro de los genes existen variaciones funcionales que pueden producir alguna deficiencia en el crecimiento debido a que existe una fuerte evidencia de que la presencia de SNPs en regiones promotoras influyendo en la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción) (Zou y Liu, 2015), lo cual coincide con los resultados observados en este estudio, ya que se identificaron dos variaciones de tipo SNPs en la región promotora del GH. Aunque en los individuos estudiados no se logró observar algún patrón de asociación de los cambios observados con el origen o productividad, en otras especies este tipo de variaciones como el descrito por Li *et al.*, (2012) identificaron polimorfismos en el promotor del gen miostatina (MSTN) en lenguado manchado (*Verasper variegatus*) los cuales fueron asociados a características de crecimiento demostrando que uno de los genotipos era significativamente más altos en el sexo femenino de lenguado manchado, sugiriendo que podría ser seleccionado como un gen candidato para el mejoramiento molecular del crecimiento individual en esta especie. En *Solea solea L.* se realizó la búsqueda de nuevos polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en genes candidatos para crecimiento incluyendo Miogenina observando el mayor número de nuevos polimorfismos en las regiones intrónicas de los genes en estudio (Diopere *et al.*, 2013), estas variaciones en las regiones no codificantes pueden afectar la estabilidad de la proteína, en sitios de “splicing” (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas (Checa- Caratachea 2007) existen algunos reportes de asociaciones entre variables de peso y polimorfismos en regiones no codificantes en genes relacionados al crecimiento en especies peces como *Paralichthys olivaceus* (Kang *et al.*, 2002), *Salmo salar* (Gross y Nilsson, 1999) y *Salvelinus alpinus* (Tao y Boulding, 2003). En el presente estudio en el gen MyoG se pudo observar una variación en la región del intrón, este gen codifica un factor de regulación miogénica altamente conservada que está involucrada en el músculo de terminales de diferenciación, donde se ha demostrado que en

mamíferos la metilación de citosinas dentro del promotor MyoG juega un importante papel en la regulación de su transcripción (Du *et al.*, 2003). Blanck *et al.* (2009), observó una asociación entre el polimorfismo (GH1- PstI), en el intrón 1 del gen de la hormona de crecimiento con las características corporales de diferentes variedades de la tilapia del Nilo (Chitralada y GIFT), ya que el polimorfismo descrito para el intrón 1 del gen GH1 de tilapia del Nilo tuvo una correlación significativa con la longitud total, altura y ancho del cuerpo, así como, una asociación con un mejor rendimiento mediante la regulación del gen de la GH (GH1-PstI). Para los genes de GH y MyoG se logró validar las variaciones observadas en la población de descubrimiento, observando que el genotipo GHpA1AA se encontró en una frecuencia 1.58%, siendo el genotipo heterocigoto (GHpA1AG) el que presentó la frecuencia más baja (0.49%) a diferencia del 98.42 % de individuos homocigotos encontrados para genotipo GHpA1GG. Mientras que para el genotipo GHpB1CC no fue encontrado en las muestras analizadas, únicamente se presentó el genotipo GHpB1TT en 2.03 % de la poblaciones estudiadas por lo que el 97.97 % de los genotipos fueron heterocigotos. Los resultados de las frecuencias alélicas para cada marcador GHpA1G presentaron una mayor frecuencia en las tres poblaciones, con respecto al alelo GHpA1A. Mientras que el alelo GHpB1T presentó una frecuencia mayor en la población de H1, siendo H2 Y H3 las que presentaron una frecuencia mayor del alelo GHpB1C entre los individuos tipificados. En lo que respecta al gen MyoG El genotipo MyoGCC no se observó en el total de las muestras analizadas, mientras que el genotipo heterocigoto (MyoGCT) presentó la frecuencia más baja del 19.95 % a diferencia del 80.05 % de los individuos homocigoto encontrados para el genotipo MyoGTT. Las frecuencias alélicas para el marcador MyoGC solo se pudo observar en las poblaciones de H2 Y H3. Mientras que el alelo MyoGT se presentó una frecuencia mayor del alelo, pudiéndose observar en las tres poblaciones de estudio. Observando una alta proporción de loci con frecuencias mayores al 1%, indicando que las poblaciones en estudio fueron polimórficas para los tres marcadores en las tres poblaciones. En peces como *Gadus morhua* (Hemmer – Hansen *et al.*, 2011) y lenguado (*Solea solea L.*) (Diopere *et al.*, 2013) se pudieron observar frecuencias alélicas mayores al 1% en poblaciones donde se realizó búsqueda y validación de nuevos polimorfismos de nucleótido simple en genes candidatos para crecimiento, maduración y reproducción, los marcadores validados les permitió un mejor conocimiento



de la heredabilidad y base molecular los datos obtenidos fueron claves para controlar y mejorar el éxito de reproducción y maduración en las especies estudiadas. Las frecuencias encontradas para las tres variaciones estudiadas, permitieron validarlas como SNP's en las poblaciones de tilapia estudiadas y son marcadores candidatos para el diseño de estrategias que identifiquen su beneficio puntual sobre características de importancia productiva.

## 8.- Conclusiones

- No se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en las variables relacionadas con el desempeño reproductivo y calidad del huevo entre las 3 poblaciones de tilapia *Oreochromis niloticus*.
- Para la calidad de juvenil se presentan variaciones ( $P < 0.05$ ) en el peso de las larvas después de la eclosión y crecimiento después de 45 días de cultivo, entre las poblaciones estudiadas
- Las pruebas de estrés a salinidad presenta variación entre las poblaciones ( $P < 0.05$ ).
- Se presenta una correlación positiva en el contenido de carbohidratos de huevo y la mortalidad de amonio en pruebas de estrés.
- Se obtuvieron en el gen IGF-I, 8 nuevos polimorfismos en la búsqueda de genes candidatos en la población de descubrimiento de poblaciones de tilapia *Oreochromis niloticus*.
- El gen GH presenta variaciones de tipo SNPs en la región promotora, así como también se observó variación en la longitud de un microsatélite localizado en la posición 311 de la región no codificante, este evento se pudo observar en 14 individuos de 15 analizados.
- El gen MyoG fue el menos variable entre los individuos con respecto a la secuencia de referencia se observó 1 cambio nucleotídicos (T/C) en 4 individuos.
- Parámetros de calidad de huevo (contenido de carbohidratos) y juveniles (peso de la larva después de la eclosión, crecimiento y pruebas de estrés a salinidad), pudiera ser una herramienta útil para determinar calidad de la progenie. Las variaciones en genes candidatos, permitirá generar las bases para realizar una asociación con características de

crecimiento en tilapia con el fin de determinar su uso potencial como marcadores de selección asistida, ya que puede ser una estrategia de solución para cumplir con las altas demandas de las especies de cultivo como lo es la tilapia.

## 9.- Referencias bibliográficas

- Álvarez, A. L. I.S. Racotta, O. Arjona & E. Palácios. 2004. Salinity stress test as a predictor of survival during growout in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 237, 237-249.
- Arce-Moreno, B. L. 1989. Growth promoting effect of nicotinic acid and nicotinamide in hybrids of tilapia. *Veterinaria México* 20(4): 415-418.
- Aristizabal, E. J. Suárez, A. Vega, & E. Bargas. 2009. Egg and larval quality assessment in the Argentinean red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 287: 329-334.
- Armstrong D.A., D. Chippendale, A.W. Knight & J.E.Colt. 1978. Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull.* 154, p.15-31.
- Arredondo, F.J.L. & G.S. Lozano. 1996. El cultivo de la tilapia en México. In: Primer Curso Internacional de Producción de Tilapia. MM Escamilla G and AP Raña G (eds.). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, SEMARNAP, México. Pp: 7-18.
- Bailey, D.S. J.E. Rackocy, J.M.Martin & R.C. Schultz. 2000. Intensive production of tilapia fingerlings in a recirculating system. In: K Fitzsimmons and JC Filho (eds.). Proceedings of the Fifth International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Río de Janeiro, Brazil, Río de Janeiro: Panorama da Aquicultura pp. 328-333.
- Black, D.V., E. Gasparino, R.P. Ribeiro & D.S. Marques. 2009. Polymorphism in the GH1-PstI gene associated to corporal characteristics in Nile tilapia strains. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, (44), 599–604.
- Barnes, H. & J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphovanillin method for 'total' lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 12(1): 103-118.

- Bolton, J. P., Collie, N. L., Kawauchi, H. & Hirano, T. 1987. Osmoregulatory actions of growth hormone in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Endocrinology*, 112(1), 63-68.
- Bhujel, R.C. A. Yakupitiyage, W.A. Turner & D.C. Little. 2001. Selection of a commercial feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in a hapa-in-pond system. *Aquaculture* 181: 37-59.
- Björnsson, B.Th., 1997. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology Biochemistry*.17, 9–24.
- Bonnet, E., A. Fostier & J. Bobe. 2007. Characterization of rainbow trout egg quality: a case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. *Theriogenology* 67: 786–794
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Bray, W.A. & A.L. Lawrence. (1992) Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices* (Fast, A.W. & Lester, J.L. eds), pp 93-170. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Bromage, N.J. C. Jones, M. Randall, B. Thrush-Davies, J. Springate & G. Barker. 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100 (1): 141-166.
- Bromage, N.R. 1995. Broodstock management and seed quality. General considerations. In: NR Bromage, RJ Roberts (eds.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Oxford, UK. Pp. 1-24.
- Brooks, S. C.R. & J.P. Sumpter. 1997. Egg quality in fish: what makes a good eggs? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 387-416.
- Bulut, M. I. S. Celik & S. Bilen, 2005. Biochemical composition of fertilized striped bream *Pagellus erythrinus* (Linnaeus, 1758) eggs. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8(10):1342-1345.
- Castillo-Campo, LF. 2012. Tilapia roja. Una evolución de 29 años, de la incertidumbre al éxito.

- Caratachea, M.A.C. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev inst nal enf resp mex*, 20(3), 213-221.
- Cavalli, R.O. G. Menschaert & P. VLavens-Sorgeloos, 2000. Maturation performance, offspring quality and lipid composition of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females feed increased levels of dietary fosfolipids. *Aquaculture International* 8: 41-58.
- Charmantier, G. M. Charmantier-Daures, N. Bouaricha, P. Thuet, D.E. Aiken & J.P. Triller. 1998. Ontogeny of osmorregulation and salinity tolerance in two decapod Crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*: *Biol. Bull.*, 175, p.102-110.
- Chen, Y.N. & C.M. Kuo. 1998. Purification and characterization from the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Zool. Stud.* 37, 126-136.condition. *Aquaculture* 227, 107-130.
- Coward, K. & N.R. Bromage.2000. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10:1-25.
- Das, P.C. S. Ayyappan, J.K. Jena, & B.K. Das. 2004. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected hematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture Research* 35(2): 134-143.
- DeCaluwe, J. 1995. Egg quality of *Macrobrachium rosenbergii*. *Notas técnicas. Curso de Reproducción. Universidad de Gante, Bélgica*De-Negreiros Sousa, S.M., Freccia, A., dos Santos, L.D., Meurer, F., . Tessaroand, L. Bombardelli, R.A. 2013. Growth of Nile tilapia post-larvae from brood stock fed diet with different levels of digestible protein and digestible energy. *Revista Brasileira de Zootecnia* 42(8): 535-540.
- DeOliveira, M.M., Ribeiro, T., Orlando, T.M., de Oliveira, D.G., Drumond, M.M., de Freitas, R.T., Rosa, P.V. 2014. Effects of crude protein levels on female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reproductive performance parameters. *Animal reproduction science* 150(1-2): 62-69.

- DeSantis, C. & D. R. Jerry. 2007. Candidate growth genes in finfish - where should we be looking? *Aquaculture* 272: 22-38.
- Diopere, E., B. F. A. Hellemans-Volckaert, & G. E. Maes. 2013. Identification and validation of single nucleotide polymorphisms in growth-and maturation-related candidate genes in sole (*Solea solea* L.) *Marine genomics* 9: 33-38.
- Duponchelle, F., Legendre, M. 2001. Rapid phenotypic changes of reproductive traits in response to experimental modifications of spatial structure in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Living Resources* 14(2): 145-152.
- El-Sayed, A.F.M. & M. Kawanna. 2008. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. *Aquaculture Research* 39: 670-672.
- El-Sayed, A.F.M., C.R. Mansour, A.A. Ezzat. 2005. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) brood stock reared at different water salinities. *Aquaculture* 248:187-96.
- FAO, 2012. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. 2012
- FAO. 2014. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. 2014
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. 2001. Introducción a la Genética Cuantitativa 1ª Ed., Ed. Acribia. Barcelona, España. 470 p.
- Faulk, C.K. & G.J. Holt. 2008. Biochemical composition and quality of captive spawned cobia *Rachycentron canadum* eggs. *Aquaculture* 279:70–76
- Fernández-Palacios, H., Montero, D. Socorro, J. Izquierdo & M.S. Vergara. 1994. First studies on spawning, embryonic and larval development of *Dentex gibbosus* (Rafinesque, 1810) (*Osteichthyes, Sparidae*) under cooled conditions, *Aquaculture* 122:63-73 p.
- Fitzsimmons, K. 2000. Tilapia aquaculture in Mexico. pp. 171–183 in B.A. Costa-Pierce & J.E. Rakocy (Eds.) *Tilapia Aquaculture in the Americas*, Vol. 2. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Fitzsimmons, K., Cerozi, B., Tran, L. 2014. Global tilapia production and market situation in 2014. *World*

aquaculture Society Meetings, World Aquaculture Adelaide 2014. Create/Nuture/Grow. 7-11 June, South Australia.

- García-Ulloa, M., H. Rodríguez & T.Ogura. 2004. Calidad del huevecillo de dos especies de langostino (*Palaemonidae*) del género *Macrobrachium* (*M. rosenbergii*, De Man 1879, y *M. tenellum*, Smith, 1871) variando la dieta de los reproductores: índices morfométricos. *Avances en Investigación Agropecuaria* 8 (2):1-8.
- García-Ulloa, G., S.R. Villa & C.T.M. Martínez. 2001. Growth and feed utilization of the tilapia hybrid *Oreochromis mossambicus* X *O. niloticus* cultured at different salinities under controlled laboratory conditions. *Journal of the world Aquaculture Society* 32 (1): 117-121.
- García-Ulloa, M .2000. Fundamentos de nutrición acuícola. Editorial Folia Universitaria. Universidad Autónoma de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. 221 pp.
- Giménez, G., A., Estévez, F. Lahnsteiner, B. Zecevic, J.G. Bell, R.J. Henderson, J.A. & Piñera, J.A.Sánchez-Prado. 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture* 260: 232-243
- Gunasekera, R.M., K.F. Shim & T.J. Lam. 1997. Influence of dietary protein content on the distribution of amino acids in oocytes, serum and muscle of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) *Aquaculture* 152: 205-221.
- Gunasekera, R.M., K.F. Shim & T.J. Lam. 1996. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 146(1): 121-134.
- Hargreaves, J.A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166: 181-212.
- Israeli-Weinstein, D., Kimmel, E. 1998. Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio*) to ammonia stress. *Aquaculture*,165(1): 81-93.
- Hemmer-Hansen, J.A., K.O.B. Nielsen, E.E. Meldrup, C. Mittelholzer. 2011. Identification of single nucleotide polymorphisms in candidate genes for growth and reproduction in a nonmodel organism; the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Molecular Ecology Resources* 11:s1, 71-80.

- Hernández, H. R. 2001. Indicadores bioquímicos - fisiológicos de calidad de larva y postlarva de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Biológica del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S.
- Ibarra, A.M., E. Palacios, C.I. Pérez-Rostro, J.L. Ramírez, I.S. Racotta & R. Hernández-Herrera, 1998. Family variance for resistance to low oxygen and low salinity of pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, postlarvae. Abstract Book of Aquaculture 98.
- Jayasankar, P. & M.S. Muthu, 1983. Toxicity of ammonia to the larvae of *Penaeus indicus*. H. Milne Edwards. Indian J. Fish, 30:1-12.
- Kamler, E. 1992. Early life history of fish. An energetic approach. 1<sup>st</sup>. de Capman & Hall, London, UK. p. 20
- Kjørsvik, E., K. Hoehne-Reitan & K.I. Reitan. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus L.*). Aquaculture 227(1): 9-20.
- Lahnsteiner, F. 2005. Carbohydrate metabolism of eggs of the whitefish, *Coregonus spp.* during embryogenesis and its relationship with egg quality. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 142: 46 – 55.
- Lahnsteiner, F. & P. Patarnello. 2004. Egg quality determination in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters. Aquaculture 237: 443-459.
- Lahnsteiner, F., T.R.A. Weismann & R.A. Patzner, 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. Fish Physiology and Biochemistry 20(4): 375-388.
- Lall, S.P., 1995. Nutrient balance: an important criteria for fish feed quality. Abstract, 63-64. In Quality in Aquaculture, Short communications and abstracts of attributions presented at the International Conference Aquaculture Europe'95 and the satellite meeting Nutrition and Feeding in cold Water Species. N. Svennevig and A. Kroghal (eds). August 9-12, 1995. European Aquaculture Society, Special Publication No.23, Gent Belgium.
- Lanes, C. F. C., T.T., Bizuayehu, S. Bolla, C. Martins J.M. de Oliveira Fernandes, A. Bianchini & I. Babiak. 2012. Biochemical composition and performance of Atlantic

- cod (*Gadus morhua* L.) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks. *Aquaculture* 324: 267-275.
- Lemarié, G.J.F., F., Baroiller, J. Clota J. Lazard & A. Dosdat. 2004. A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron*. *Aquaculture* 240: 575-578.
- Linhart, O., S.M.H. Alavi, M. Rodina, M.D. Gela & J. Cosson. 2008. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology* 24(4): 386-392.
- Lu, J., & T. Takeuchi, 2004. Spawning and egg quality of the tilapia *Oreochromis niloticus* fed solely on raw *Spirulina* throughout three generations. *Aquaculture* 234: 625-640.
- Lupatsch, I., R., Deshev & I. Magen. 2010. Energy and protein demands for optimal egg production including maintenance requirements of female tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research* 41(5): 763-769.
- Lupchinski Jr., E., Vargas. E. Lopera-Barrero, L. Ribeiro, N.M. Povh, R.P. Gasparino & J.A. Braccini. 2011. Genetic characterization of three Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains. *Archivos de Zootecnia*, 60: 232, 985-995.
- Madsen, S.S. & Korsgan, B.1991. Opposite effects of 17 beta-estradiol and combined growth hormone-cortisol treatment on hypo-osmoregulatory performance in sea trout psmolts, *Salmo trutta*. *General and comparative endocrinology* 83(2): 276-282.
- Mancera, J. M. & McCormick, S. D. 1998. Osmoregulatory actions of the GH/IGF axis in non-salmonid teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 121(1), 43-48.
- McCormick, S. D. 2000. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on salinity tolerance and gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Interaction with cortisol. *General and comparative endocrinology*. (101), 3–11.
- Mazorra, C., M. Bruce, J. G. Bell, A. Davie, E. Alorend, N. Jordan, J. Rees, N. Papanikos, M. Porter & N. Bromage. 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*. 227: 21-33.



- Mair, G.C., J.S. Abucay, J.S. Abella, T.A. Beardmore, J.A. D.O.F. Skibinski. 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia *Oreochromis niloticus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54(2): 396-404.
- Mc Andrew, B.J., Roubal, F.R. Roberts, .R.J., A.M. Bullock, J.M. McEwen. 1986. The genetic and histology of red, blond associated colour variants in *Oreochromis niloticus*. *Genetics* 76: 127-137.
- Mylonas, C.C., M. Papadaki, M. P avlidis & P. Divanach. 2004. Evaluation of egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pagrus pagrus*) during two consecutive spawning seasons. *Aquaculture* 232: 637-649.
- Na-Nakorn, U. & T. Moeikum, 2009. Genetic diversity of domesticated stocks of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878), in Thailand: Relevance to broodstock management regimes. *Aquaculture* 297: 1, 70-77.
- Nickerson, D. A., O. L. T. Vincent & L. T. Scott 1997. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Research* 25: 14, 2745-2751.
- Osure, G.O. & R.P. Phelps. 2006. Evaluation of reproductive performance and early growth of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) with different histories of domestication. *Aquaculture* 253: 485-494.
- Palacios, E., & I.S., Racotta. 2007. Salinity stress test in shrimp postlarvae: Relation to further performance and physiological basis. *Aquaculture* 268: 123-135.
- Penney, R.W., P.L. Lush, J. Wade, J.A. Brown, C.C. Parrish & J.A. Burton. 2006. Comparative utility of egg blastomere morphology and lipid biochemistry for prediction of hatching success in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture Research* 37: 272–283.
- Primmer, C.R., T. Borge, J. Lindell & G.P., Saetre. 2002. Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Molecular Ecology* 11: 603-612.
- Pullin, R.S.V., M.L. Palomares, C.V. Casal, M.M. Dey & D. Pauly. 1997. Environmental impacts of tilapias. In: Fitzsimmons K (ed.). *Tilapia Aquaculture. Proceedings from*

- the Fourth International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 9-12 November, Orlando, Florida, USA. Pp. 554-570.
- Racotta I.S., E. Palacios & A.M. Ibarra. 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock reference to the timing of stripping and methods of fertilization in the Atlantic halibut (*Hippoplossus hippoplossus*). Abstract pps. Rideout, R. M., E.A.Trippel & M.K. Litvak. 2004. Predicting haddock embryo viability based on early cleavage patterns. *Aquaculture*. 230: 215-228.
- Ronnestad, I & H. J. Fyhn. 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Reviews in Fisheries Science*. 1(3): 239-259.
- Ronnestad, I., W. M. Koven, A. Tandler, M. Harel & H. J. Fyhn. 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Marine Biology*. 120: 187-196.
- Sarasquete, M. C., A. Polo, E. Pascual & M. Yúfera. 1993. Histochemistry of proteins, lipids and carbohydrates in the yolk of oocytes, eggs and larvae of seabream (*Sparus aurata*). In: B. T. Walther & H. J. Fyhn (ed). *Physiological abiochemical aspects of fish development*. Norway. University of Bergen. 309-314.
- Sokal R.R. & F. J. Rohlf. (1981) *Biometry*. W. H. Freeman, New York, 859 pp.
- Suresh A.V., Lin, C.K.1992. Tilapia culture in saline waters: a review. *Aquaculture* 106(3): 201-226.
- Tao, W. J. & E.G. Boulding. 2003. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) *Heredity* 91: 60-69.
- Thodesen, J. M., Y.X. Rye, H.B. Wang & T. Gjedrem. 2011. Genetic improvement of tilapias in China: genetic parameters and selection responses in growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after six gene rations of multigrain selection for growth and fillet yield. *Aquaculture* 322-323: 51-64.
- Tilak K.S., S. Lakshmi, & T.A. Susan. 2002. The toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the *Catla catla* (Hamilton). *Journal of environmental biology/Academy of Environmental Biology, India* 23: 147-149.
- Thomson M.J, A.M. Ismail, S.R. McCouch & M.J. Mackill.2010. Marker assisted breeding. In: Pareek A, Sopory SK, Bohnert HJ, Govindjee, editors. *Abiotic stress adaptation in*

plantsphysiological, molecular and genomic foundation. New York: Springer, p. 451–69.

- Ulloa, P. E., Peña, A. A., Lizama, C. D., Araneda, C., Iturra, P., Neira, R. & J.F.Medrano, 2013. Growth response and expression of muscle growth–related candidate genes in adult zebrafish fed plant and fishmeal protein–based diets. *Zebrafish*, *10*(1), 99-109.
- Valbuena-Villarreal, R.D., B.E. Zapata-Berruecos & R. Rosado-Puccini. 2013. Caracterización de la composición en proteína, lípidos, energía y perfiles de ácidos grasos en huevos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) *Revista Medica Veterinaria* 25: 39-47.
- Van der Merwe, C.M. (1970) *Física general*. 1st. Edition. McGraw-Hill Co. USA, 276 p.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical biochemistry* 11:256-265.
- Walther, T., & H.J. Fyhn. (ed). *Physiological and biochemical aspects of fish development*. Norway. University of Bergen. 309-314.
- Watanabe, T., T. Koizumi, H. Suzuki, S. Satoh, T. Takeuchi, N. Yoshida T. Kitada & Y. Tsukashima,.1985. Improvement of quality of red sea bream eggs by feeding brood stock on a diet containing cuttlefish meal on raw krill shortly before spawning. *Bulletin of Japanese society of scientific fisheries* 51: 1511–1521.
- Wicks, B. J. & D. J. Randall, 2002. The effect of feeding and fasting on ammonia toxicity in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic toxicology*, *59*(1): 71-82.
- Wood, A. W. C. Duan & H. A. Bern. 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology* 243: 215-285.
- Wu, Q. Yao, H. D. Zhang, Z. W. Zhang, B. Meng, F. Y. Xu, S. W. & Wang, X. L. 2012. Possible correlation between selenoprotein W and myogenic regulatory factors in chicken embryonic myoblasts. *Biological trace element research* 150: 1-3, 166-172.
- Zar, J.H. 2010. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hill, Englewood Cliff, NJ.