

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) CULTIVADA EN LOS VALLES CENTRALES DE OAXACA¹

[GENETIC CHARACTERIZATION OF THE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) CULTIVATED IN THE CENTRAL VALLEYS OF OAXACA]

Rodolfo Benigno de los Santos-Romero¹, María Isabel Pérez-León^{1§}, Héctor Maximino Rodríguez-Magadan²,
Ivonne Caballero-Sánchez³, Jacobo Montes-Yedra¹, Rosa María Gómez-Ugalde¹

¹Tecnológico Nacional de México, campus Valle de Oaxaca. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, C.P. 71233. ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca de Juárez, Oaxaca, C.P. 68000. ³Estudiante. Tecnológico Nacional de México, campus Valle de Oaxaca. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, C.P. 71230. [§]Autor para correspondencia:(leonisa70@hotmail.com).

RESUMEN

Se presentan avances del monitoreo genético de tilapia *Oreochromis niloticus* cultivada en los Valles Centrales de Oaxaca, información fundamental para implementar programas de cría selectiva comercial. El objetivo es mejorar la producción de tilapia reconociendo el porte genético de variedades de crecimiento rápido, con altos índices de conversión alimenticia y resistente a enfermedades. Las técnicas utilizadas en el estudio fueron los marcadores RAPD que son los más empleados en acuicultura debido a su simplicidad, rapidez y costo relativamente bajo. De los resultados, los productores acuícolas de los Valles Centrales de Oaxaca trabajan principalmente con tres líneas o variedades de tilapia cultivadas: GIFT (Genetic Improvement of Farmed Tilapia), híbrida Spring y GTM (genetically male tilapia), cada una de las líneas presentan similitud entre la cantidad y calidad de ADN. La similitud del fenotipo de las tilapias, que es la respuesta del genotipo y de las adaptaciones que cada una de las líneas presente ante su medio ambiente, indican que las variaciones en las diferentes líneas de tilapia que se cultivan en Oaxaca son multifactoriales.

Palabras clave: Acuicultura, ADN, electroforesis.

ABSTRACT

Advances in the genetic monitoring of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in the Central Valleys of Oaxaca are presented, fundamental information for the implementation of commercial selective breeding programs, which aims at genetic improvement and the production of fast-growing fish, with better food conversion indexes and disease resistant. The techniques used in the study were the RAPD markers that are the most used in aquaculture due to its simplicity, speed and relatively low cost. From the results, the aquaculture producers of the Central Valleys of Oaxaca work mainly with three lines or varieties of cultivated tilapia: GIFT (Genetic Improvement of Farmed Tilapia), hybridized Spring and GTM (genetically male tilapia), each of the lines show similarity between the quantity and quality of DNA. The similarity of the tilapia phenotype, which is the response of the genotype and of the adaptations that each of the lines present to their

¹ Recibido: 1 de agosto de 2018.

Aceptado: 10 de diciembre de 2018.

environment, indicate that the variations in the different tilapia lines that are cultivated in Oaxaca are multifactorial.

Index words: Aquaculture, DNA, electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

Tilapia es el nombre común de aproximadamente 70 especies de peces clasificadas de la familia Cichlidae (Fitzsimmons, 2000). Las tilapias fueron introducidas en México con el propósito de incrementar la disponibilidad de alimentos básicos de bajo costo, de alta cantidad y calidad de proteína y bajos en grasa saturadas (Morales, 1991). Después de su aclimatación en los lugares de siembra, estas especies de tilapia se han extendido ampliamente a través de los embalses de agua naturales y artificiales en las regiones tropicales y templadas de México (Vega-Villasante *et al.*, 2010). Sin embargo, después de su expansión estas pesquerías y cultivos acuícolas de tilapia se enfrentó a una drástica disminución de la producción debido a la sobreexplotación (Jiménez-Badillo, 1999) y sobre todo a problemas genéticos como la endogamia lo que empezó a provocar problemas de tipo morfológico, bajos niveles de producción, problemas con las crías en la reproducción y sobre todo una disminución en la estética de mercado.

Uno de los principales motivos que sustentan los problemas genéticos con la tilapia dentro de las pesquerías o la acuicultura son los pocos registros que demuestren cuáles especies y variedades fueron introducidas en cada uno de los embalses o unidades de producción que se destinan a la acuicultura. Para mantener la variabilidad de las poblaciones de peces y para fomentar el desarrollo del ordenamiento pesquero y acuícola, es esencial monitorear la diversidad de los stocks genéticos (Bentzen & Thodesen, 2005; Haughton *et al.*, 2006).

El monitoreo genético de lotes de tilapia en la acuicultura representa información de gran importancia para conseguir mejoras en la producción y en la conservación de peces (Feng *et al.*, 2007). Es primordial, pues la variabilidad genética es fundamental para la implantación de programas de cría selectiva comercial, con peces de crecimiento rápido, mejores índices de conversión alimentaria y resistentes a enfermedades (Melo *et al.*, 2006).

Los estudios centrados en la genética de poblaciones permiten conocer la variación genética de la tilapia que se mantienen bajo un esquema de cultivo o en estado silvestre, con estos datos, se puede comprender mejor como se ha distribuido la especie desde su centro de origen y se pueden generar paquetes de manejo de acuerdo a las condiciones ambientales imperantes. Por lo anterior, para obtener una perspectiva de la variación existente entre dos o más líneas de tilapia cultivadas en unidades de producción acuícola en los Valles Centrales de Oaxaca, se necesita caracterizar la variación genética de varias unidades en donde se cultivan distintas líneas de tilapia con un origen incierto. Por lo que el objetivo del presente trabajo es caracterizar el porte genético mediante la calidad y cantidad de ADN de las líneas mejoradas, revertidas y no hormonadas de tilapias *Oreochromis niloticus* L. (Cichlidae), cultivadas por productores acuícolas de los Valles Centrales de Oaxaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el Laboratorio de Limnología y Acuicultura del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca se recibieron los ejemplares adultos vivos de tilapia del Nilo con un tamaño entre 20 y 22 cm organismos provenientes de las siguientes Unidades de Producción Acuícola (UPA): Granja Capitán Mojarra, municipio de San Francisco Lachigolo distrito de Tlacolula, Oax.; Granja Duu-

Va, municipio de San Juan Evangelista Analco distrito de Ixtlán; Granja La Chilana; municipio de San José del Progreso, distrito de Ocotlán y Granja el Danzante, municipio de Cuilapan de Guerrero, Distrito de Zaachila. Durante los primeros días de llevó a cabo el mantenimiento de las tilapias para su aclimatación en contenedores de 100 litros con aireación continua y control de temperatura. Tres días posteriores a su aclimatación en un área bajo condiciones asépticas y utilizando equipo de disección estéril se tomaron las muestras de musculo a la altura del pedúnculo caudal para los estudios genéticos de las seis variedades con cuatro repeticiones. La muestra fue colocada en un tubo estéril de polipropileno de 15 mL, etiquetados con datos de la especie, fecha, granja, línea genética y número de muestra. Posteriormente las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

En el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca para la extracción de DNA se utilizó el Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega. Se pesó una cantidad de 10 a 20 mg. por cada una de las 28 muestras de tejido de tilapia y se colocaron en tubos eppendorf estériles, a cada tubo se le agregó 500 μL de solución de lisis de núcleo, 120 μL de EDTA y 10 μL de Proteinasa K, las muestras se homogenizaron lo suficiente manualmente con homogeneizadores esteriles (uno por cada muestra) y los tubos se agitaron de 2 a 5 veces.

Para la ampliación por PCR las muestras se incubaron a 55°C por 3 horas. A cada tubo Eppendorf se añadió 3 μL de solución de RNAsa agitando seguidamente de 2 a 5 veces y se llevaron a incubar a 37°C por media hora. Se le adicionó 200 μL de solución de precipitación de proteína y las muestras fueron llevadas a refrigeración por 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 14000 g. por 5 minutos. El sobrenadante de cada tubo fue recuperado transfiriéndolo a un nuevo tubo Eppendorf al cual previamente se le agregaron 600 μL de isopropanol, posteriormente se llevó a centrifugar a 14000 g. por 5 minutos y se retiró totalmente todo el sobrenadante. En seguida se adiciono 600 μL de etanol al 70% a cada tubo, agitando varias veces y se centrifugó nuevamente a 14000 g por 5 minutos. El sobrenadante fue retirado totalmente y los tubos fueron secados de forma invertida sobre papel absorbente limpio dejándolo secar de 10 a 15 min y finalizando el secado con una incubación a 55°C por 3 minutos. Posterior a la incubación se adicionó a cada tubo 100 μL de solución de rehidratación pipeteando varias veces para tratar de despegar la pastilla de ADN del fondo del tubo y se incubo a 55°C por 1 hora con motivo de rehidratar lo suficiente al DNA. Finalmente, las muestras de DNA se etiquetaron y almacenaron a -4°C .

Al concluir la extracción y amplificación del ADN, se realizó una corrida de electroforesis para determinar la integridad de cada una de las muestras. Se preparó gel de agarosa al 1%. Se pesó 2 g. de agarosa y se disolvió en 200 mL. de buffer de corrida TAE 1% en un matraz de 250 mL. llevándose al horno de microondas por 2 minutos para su total disolución. Se dejó enfriar por tiempo suficiente, mientras, se preparó el molde para el gel, y se llenó la cámara de electroforesis con buffer TAE 1%. La agarosa necesaria fue colocada dentro del molde y se dejó solidificar por un tiempo. El gel fue puesto dentro de la cámara de electroforesis y cada pozo fue llenado con: 0.5 μL de colorante Orange 6x; 0.5 μL de SYBR Green; y 3 μL de muestra DNA. Las muestras fueron corridas a 100 voltios por 20 minutos y los resultados se visualizaron mediante una cámara de foto-revelado con luz UV.

La cuantificación de cada una de las muestras extraídas se realizó después de la verificación de presencia de ADN en la corrida de electroforesis. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro NANO DROP LITE de TERMO SCIENTIFIC. Para iniciar la cuantificación de las muestras, se colocó primera mente un 1µL de agua inyectable como muestra blanco sobre el pedestal inferior y se procedió a calibrar el equipo para dar lectura a las muestras. De la misma forma se tomó 1µL de ADN y se colocó sobre el pedestal inferior del equipo, este se cerró y se dio lectura de la concentración de ADN y de la pureza del mismo, para evitar errores se realizaron 3 lecturas por cada muestra (se limpió el pedestal inferior y superior con una toalla de papel por cada lectura). Los resultados de lectura se mostraron en la pantalla del equipo.

RESULTADOS

En ocho UPAs que cultivan la tilapia en los Valles Centrales de Oaxaca se identificaron las siguientes variedades de *Oreochromis niloticus*: variedad híbrida Spring revertida hormonalmente proveniente de la granja Tilpan, Tuxtepec, Oaxaca; variedad mejorada Nilotica GIFT (1) revertida hormonalmente proveniente de la empresa Tilasur, Veracruz; variedad mejorada Nilotica GTM revertida genéticamente, de la granja Dos pececitos, Puerto Escondido, Oax.; variedad híbrida Rocky Mountain revertida hormonalmente, variedad mejorada Nilotica GIFT (2) revertida hormonalmente y nilotica nativa no revertida, las tres variedades provenientes del Centro Reproductor Jalapa del Marqués (SEDAPA), Santa María Jalapa del Marqués, Oax.

En la Figura 1 se muestra el foto-revelado de los productos de electroforesis de la presencia e integridad de DNA para cada una de las variedades de tilapia, a través de bandas pigmentadas se observan pequeñas variaciones en la concentración de material genético.

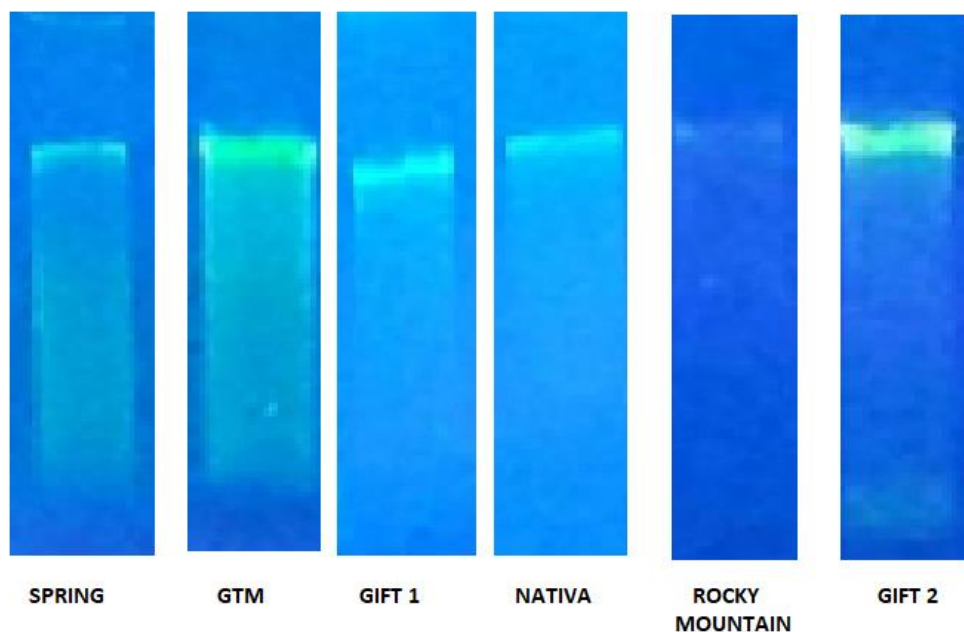


Figura 1. Bandas de electroforesis muestran la presencia e integridad de ADN en las seis variedades de tilapia

En el cuadro 1 se presenta el promedio de la cantidad y pureza del ADN para cada una de las seis variedades de Tilapia, presentando rangos de Pureza de ADN de 1.64 a 1.84, y cantidades de ADN entre 15.93 a 39.77.

Cuadro 1. Cantidad y pureza del ADN de cada una de las seis variedades de tilapia. Se presenta el valor medio y su desviación estándar ($\pm$ DE)

Línea genética de <i>O. niloticus</i>	Pureza Abs 260/A280 nm	Cuantificación [ng mL ⁻¹]
SPRING	1.84 $\pm$ 0.077	39.77 $\pm$ 13.38
GTM	1.81 $\pm$ 0.059	34.17 $\pm$ 15.74
GIFT 1	1.78 $\pm$ 0.076	29.19 $\pm$ 16.49
GIFT 2	1.70 $\pm$ 0.092	29.26 $\pm$ 16.45
ROCKY MOUNTAIN	1.67 $\pm$ 0.101	20.25 $\pm$ 1.82
NATIVA	1.64 $\pm$ 0.061	15.93 $\pm$ 8.20

DISCUSIÓN

El uso de marcadores moleculares como el RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) utilizados en el presente proyecto, permiten reconocer el potencial genético de la tilapia que se cultiva en los Valles Centrales de Oaxaca, así como en cualquier pez, de una comunidad o una población sea determinada con mayor precisión, antes de la expresión de su fenotipo (Liu y Cordes, 2004). De este modo se puede estimar la diversidad genética, necesaria para estudiar prácticas de manejo y conservación de peces, inclusive para aquellas especies en riesgo de extinción (Lopera-Barrero *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007).

Al comparar los valores resultantes de la cuantificación de DNA de cada muestra con los resultados obtenidos en la visualización de la intensidad de bandas presentes en el gel de agarosa mediante electroforesis (figura 1), estos coinciden, es decir, que mientras más intensas sea la banda más cantidad de ADN presenta.

Becton Dickinson (2008) y Durviz (2008) mencionan que la baja o nula cantidad de ADN o lisis celular incompleta obtenida de algún protocolo, en algunas ocasiones se debe al exceso de muestra utilizado, por lo que es recomendable utilizar menor cantidad o prolongar el tiempo de incubación en el paso correspondiente a la lisis, mientras que Del Valle *et al.* (2004) mencionan que la diferencia en la cantidad y calidad de ADN observada en algunas extracciones podría deberse, a la presencia de ARN.

Los datos obtenidos de la cuantificación muestran baja cantidad de DNA en las muestras, Baena *et al.* (2013) mencionan que una cantidad mayor a 100 ng/ μ l se considera la adecuada para la amplificación por PCR, pero no imposible si se tiene cantidades menores. El rango de pureza del ADN (Abs 260/A280) estuvo entre 1.40 y 2.06, obteniendo la mayor parte dentro del rango óptimo de pureza. La relación Abs 260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que el proceso de aislación del material genético fue aceptable. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280

> 1.6 . Un valor $A_{260}/A_{280} < 1.6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un ratio $A_{260}/A_{280} > 2.1$ podría deberse a la presencia de ARN en la muestra (Aguilar *et al.*, 2011). De acuerdo Wasko *et al.* (2003), los resultados de este estudio evidencian la necesidad de utilizar ARNasa durante la extracción de ADN. Esto permitirá obtener muestras con mayor calidad en su ADN para realizar posteriormente una correcta amplificación.

Los resultados del presente trabajo muestran que las líneas híbridas y nativas tienden a perder calidad y cantidad de ADN, en comparación con líneas que han tenido un mejoramiento genético. Moreira *et al.* (2007) indican que la pérdida de variabilidad genética en la piscicultura, siempre es esperada cuando existe un mal manejo reproductivo, debido al cruzamiento de individuos emparentados; o también a la producción de lotes sin suficiente variabilidad genética (Povh *et al.*, 2008). Lo anterior según Kang *et al.* (2006) y Frost *et al.* (2006) aumenta el coeficiente de endogamia y reducirá el número efectivo de reproductores. Esta situación es bastante común en piscifactorías, ya que el método para adquirir nuevos y mayores lotes para la producción conlleva a la selección de individuos con características favorables, lo que puede dar lugar a un efecto cuello de botella (bottleneck effect) donde la variabilidad genética es reducida (Lupchinski *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio muestran un perfil genético preliminar de las seis variedades de *Oreochromis niloticus* (tilapia del Nilo) que se cultivan en unidades de producción ubicadas en los Valles Centrales de Oaxaca. La cantidad y pureza del ADN presentó una relación directamente proporcional en las seis variedades de la especie, siendo Spring y GTM las variedades que alcanzaron los perfiles genéticos más destacados. La electroforesis muestra que las diferentes variedades presentan alta similitud en cuanto al peso molecular que la banda de cada variedad presenta. La caracterización genética de líneas de peces puede servir como herramienta para el establecimiento de bases de selección de cría o desarrollo de reproductores. Reconocer una línea genética de *O. niloticus* con resistencia y porte productivo, es fundamental para asegurar el futuro de la tilapicultura en Oaxaca.

LITERATURA CITADA

- Baena-Del Valle, J. A., Á. J. Ramos-Moreno, C. J. Gómez-Alegría & E. E. Gómez-Camargo. 2013. Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR. *Revista Colombiana Biotecnología* 15(1): 172-179.
- Bentzen, H. B. & J. Thodesen. 2005. Genetic interactions between farmed and wild fish, with examples from the Atlantic Salmon case in Norway. In: Gjerdem, T. (Editor). *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*. Springer, The Netherlands, pp. 319-359.
- Berton-Dickinson. 2008. Kit S QuickGene de extracción de ADN en Tejidos (DTS). Para aislamiento de ADN genómico de muestras en tejidos. Manual. Fuji Photo Film Co., Ltd. Life science products division. Nishiazabu 2-Chome, Minato-ku, Tokyo. Japan. 18 p.
- Del Valle, C., A. Rodríguez & M. Espinoza. 2004. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. *Complejo de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, Heredia, Costa Rica. Revista Biología Tropical* 52(3): 717-725.
- Durviz, S. L. 2008. Kit extracción DNA SSS. REA1. RBME01/ RBME02. 5 pp.

- Feng, Y., P. Zhang, K. Wang & J. Xiang. 2007. Genetic variation of natural and cultured stocks of *Paralichthys olivaceus* by allozyme and RAPD. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 25: 78-84.
- Fitzsimmons, K. 2000. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21 century. In: Fitzsimmons, K. and J. Carvalho filho (Eds.). *Proceedings from 5th International Symposium on Tilapia Aquaculture*. Rio de Janeiro. Brasil. pp. 3-8.
- Frost, L.A., B.S. Evans & D. R. Jerry. 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261: 1056-1064.
- Haughton, M., I. Carryl & N. Bissember. 2006. Fisheries policy and management in Canada and lessons for Caricom's common Fishery policy and regime. Report of Study Mission to Canada, CRFM. Belize, C.A. 29 p.
- Jiménez-Badillo, M. L. 1999. Análisis de la pesquería de tilapia *Oreochromis* sp. (Pisces: Cichlidae) en la presa Adolfo López Mateos, Michoacán-Guerrero. Tesis de Doctorado, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México. 217 p.
- Kang, J.H., J.K. Noh, J.H. Kim, J.H. Lee, H.C. Kim, K.K. Kim, B.S. Kim & W.J. Lee. 2006. Genetic relationship between broodstocks of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) using microsatellite markers. *Aquaculture Research* 37: 701-707
- Liu, Z.J. & J.F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Lopera-Barrero, N.M., R.P. Ribeiro, R.N. Sirol, J.A. Povh, P.C. Gomes, L. Vargas & D.P. Streit Jr. 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers. *Journal Animal Science* 84: 170.
- Lupchinski Jr., E. Vargas, L., N.M. Lopera-Barrero, R.P. Ribeiro, J.A. Povh, E. Gasparino, P.C. Gomes, y G.L. Braccini. 2011. Caracterización genética de tres líneas de tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*). *Archivos de Zootecnia* 60(232): 985-995.
- Melo, D.C., D.A.A. Oliveira, L.P. Ribeiro, C.S. Teixeira, A.B. Souza, E.G.A. Coelho, D.V. Crepaldi & E.A. Teixeira. 2006. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilapia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microsatélites. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58: 87-93.
- Morales, D. A. 1991. La tilapia en México. Biología, cultivo y pesquerías. AGT Editor S.A. México. 190 p.
- Moreira, A.A., A.W.S. Hilsdorf, J.V. Silva & V. R. Souza. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por medio de marcadores microsatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 521-526.
- Povh, J.A., N.M. Lopera-Barrero, R.P. Ribeiro, E. Lupchinski, P.C. Gomes & T.S. Lopes. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e Investigación Agraria* 35: 5-15.
- Vega-Villasante, F., M. C. Cortés-Lara, L. M. Zúñiga-Medina, B. Jaime-Ceballos, J. Galindo-López, M. E. Basto-Rosales & H. Nolasco-Soria. 2010. Cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) a pequeña escala ¿alternativa alimentaria para familias rurales y periurbanas de México? *Revista Electrónica de Veterinaria* 11(3): 1- 15.
- Wasko, A.P., C. Martins, C. Oliveira & F. Foresti. 2003. Nondestructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138: 161-165.