



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: NARANJO MENESES GUSTAVO ADOLFO

TEMA: OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN
DEL GENOTIPO SEXUAL MEDIANTE MICROSATELITES EN
TILAPIA DEL NILO (*Oreochromis niloticus*), EN LAS
PISCINAS DE REPRODUCCIÓN DE AQUATILGEN CÍA. LTDA.
- LAGO AGRIO

DIRECTOR: Dr. RUEDA, DARWIN

CODIRECTORA: Dra. CHÁVEZ, MARÍA AUGUSTA

SANGOLQUÍ, AGOSTO 2014

CERTIFICACIÓN

Dr. Darwin Rueda

M.Sc. María Augusta Chávez

Certifican:

Que el trabajo titulado “**Optimización de un método de identificación del genotipo sexual mediante microsatélites en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), en las piscinas de reproducción de Aquatilgen Cía. Ltda. - Lago agrío**”, realizado por el Sr. Gustavo Adolfo Naranjo Meneses, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple las normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, en el Reglamento de Estudiantes.

Sangolquí, Agosto 2014

Dr. Darwin Rueda

DIRECTOR

M.Sc. María Augusta Chávez

CODIRECTORA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, GUSTAVO ADOLFO NARANJO MENESES

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “**Optimización de un método de identificación del genotipo sexual mediante microsatélites en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), en las piscinas de reproducción de Aquatilgen Cía. Ltda. - Lago agrio**”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Agosto 2014

Gustavo Adolfo Naranjo Meneses

AUTORIZACIÓN

Yo, GUSTAVO ADOLFO NARANJO MENESES

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, la publicación en la Biblioteca Virtual de la Institución, del tesis de grado denominada **“Optimización de un método de identificación del genotipo sexual mediante microsatélites en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), en las piscinas de reproducción de Aquatilgen Cía. Ltda. - Lago agrío”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Agosto 2014

Gustavo Adolfo Naranjo Meneses

DEDICATORIA

A mi hijo, Martín Naranjo, por ser mi motivación y la razón para luchar cada día y ser un mejor ser humano.

A mis padres, Adolfo Naranjo y María Meneses, por el apoyo incondicional brindado durante cada momento de vida.

Gustavo Adolfo Naranjo Meneses

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Jehová Dios, por darme la vida y todas las bendiciones provistas.

A mis padres, Adolfo Naranjo y María Meneses, así como a mis hermanos Pablo, Elizabeth y María Augusta, por el apoyo incondicional durante todo el transcurso de mi vida y en la realización de este trabajo.

A Lizeth Villamar por ser la mujer que ha estado junto a mi apoyándome y con la cual compartimos una gran bendición, nuestro hijo Martin Naranjo; así como a su familia por el gran apoyo, al brindarle todo el cariño, atención y cuidados a mi hijo.

A los socios de Aquatilgen Cía. Ltda.: Ing. Jorge Gonzales, Ing. Mauricio Castillo e Ing. Daniel Gonzales, por darme la oportunidad, la confianza y los recursos necesarios para la realización de este trabajo.

Al Grupo de Investigaciones Acuícolas del Instituto Superior Andino I (IASA I): Dr. Juan Ortiz, Dr. Juan Giacometti e Ing. Daysi Muñoz, por la apertura tan generosa en la utilización de las instalaciones del laboratorio de Recursos Bioacuáticos.

A mi Director y Codirector de tesis, Dr. Darwin Rueda y Dra. María Augusta Chávez, por brindarme una guía y apoyo durante toda la realización del presente trabajo.

Al personal de Aquatilgen Cía. Ltda, en especial a Antonio Vélez y Verónica Achig, por su colaboración durante mi estancia en la empresa.

A todas las demás personas, tantos amigos, familiares, conocidos, proveedores, entre otros; que de alguna manera han aportado con su granito de arena a la realización de este trabajo.

Gustavo Adolfo Naranjo Meneses

INDICE DE CONTENIDOS

<i>CERTIFICACIÓN</i>	<i>i</i>
<i>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD</i>	<i>ii</i>
<i>AUTORIZACIÓN</i>	<i>iii</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>iv</i>
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>v</i>
<i>INDICE DE CONTENIDOS</i>	<i>vi</i>
<i>LISTADO DE TABLAS</i>	<i>ix</i>
<i>LISTADO DE FIGURAS</i>	<i>x</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>xii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xiii</i>
<i>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
1.1. Formulación del Problema	<i>1</i>
1.2. Justificación del Problema	<i>3</i>
1.3. Objetivos	<i>5</i>
1.3.1. General	<i>5</i>
1.3.2. Específicos.....	<i>5</i>
1.4. Marco teórico	<i>6</i>
1.4.1. Características generales de la especie	<i>6</i>
1.4.1.1. Taxonomía y distribución geográfica	<i>6</i>
1.4.1.2. Morfología externa	<i>8</i>
1.4.1.3. Morfología Interna.....	<i>9</i>
1.4.1.4. Dieta y forma de alimentación.....	<i>10</i>
1.4.1.5. Hábitat y crecimiento.....	<i>11</i>
1.4.1.6. Reproducción.....	<i>11</i>
1.4.2. Cultivo de tilapia.....	<i>13</i>
1.4.2.1. Antecedentes históricos y tendencias.....	<i>13</i>
1.4.2.2. Sistemas de Cultivo	<i>15</i>

1.4.2.3. Importancia del cultivo mono sexual de machos.....	16
1.4.2.4. Cultivo de tilapia en el Ecuador.....	17
1.4.3. Determinación sexual	18
1.4.3.1. Determinación del sexo en peces	21
1.4.3.2. Determinación del sexo en tilapias	22
1.4.4. Metodologías de obtención de lotes mono sexo	23
1.4.5. Marcadores moleculares y su aplicación en el estudio de la determinación sexual en tilapia.....	29
1.4.5.1. Marcadores moleculares de DNA	29
1.4.5.2. Marcadores usados en estudios de la determinación del sexo en peces	30
1.4.5.3. Mapeo genético de tilapia y la ligación con el sexo.	32
1.5. Hipótesis de la Investigación.....	35
<i>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</i>	36
2.1. Ubicación geográfica del lugar de investigación.....	36
2.2. Especímenes de estudio	37
2.3. Procedimientos	37
2.3.1. Recolección de muestra biológica	37
2.3.2. Transporte y almacenamiento de la muestra biológica.....	38
2.3.3. Extracción de DNA genómico	38
2.3.4. Evaluación del DNA obtenido.	38
2.3.5. Genotipaje.....	39
2.3.5.1. Selección de microsatélites.....	39
2.3.5.2. Ensayo de PCR	40
2.3.5.3. Validación de la PCR	43
2.3.5.4. Análisis de los productos de PCR.....	43
2.3.5.5. Análisis de geles, determinación del tamaño de los alelos e identificación de los genotipos.	44

2.4. Análisis de datos	44
2.4.1.1. Evaluación de la Extracción de DNA.....	44
2.4.1.2. Frecuencias alélicas y genotípicas	45
2.4.1.3. Dependencia entre el genotipo sexual y el genotipo de los marcadores.....	45
2.5. Evaluación de la utilidad del microsatélite seleccionado en el diagnóstico del genotipo sexual.	47
<i>CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....</i>	49
3.1. Extracción y evaluación del DNA	49
3.2. Validación de los primers utilizados y del ensayo de PCR	51
3.3. Genotipaje y dependencia con el genotipo sexual	52
3.3.1. Genotipaje en geles de poliacrilamida	52
3.3.2. Frecuencia alélica y genotípica.....	53
3.3.2.1. Microsatélite UNH104	53
3.3.2.2. Microsatélite UNH898	56
3.3.2.3. Microsatélite UNH 995	59
3.3.3. Análisis de dependencia	62
3.4. Evaluación de la utilidad del microsatélite UNH898 en el diagnóstico del genotipo sexual.	63
<i>CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.....</i>	66
4.1. Extracción de DNA.....	66
4.2. Validación de microsatélites.....	67
4.3. Genotipaje y dependencia con el genotipo sexual	68
4.4. Evaluación de la utilidad del microsatélite UNH898 en el diagnóstico del genotipo sexual.	69
<i>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....</i>	72
<i>CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES</i>	73
<i>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....</i>	74

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de obtención de cultivos monosexual de machos en tilapia, ventajas y desventajas.....	24
Tabla 2. Descripción de los marcadores tipo microsatélite utilizados para la identificación del genotipo sexual de la tilapia del Nilo.....	40
Tabla 3. Detalles de los marcadores tipo microsatélite empleados para la identificación del genotipo sexual de la tilapia del Nilo.....	40
Tabla 4. Concentración y volúmenes usados para la PCR de los microsatélites seleccionados.	42
Tabla 5. Condiciones para la amplificación por PCR de los microsatélites seleccionados.....	42
Tabla 6. Tabla de contingencia para la evaluación de la dependencia entre dos variables. Donde F_0 es la frecuencia obtenida y F_e es la frecuencia esperada.	46
Tabla 7. Tabla de comparación para la evaluación de una prueba de diagnóstico.....	48
Tabla 8. Resultados estadísticos de la evaluación del DNA obtenido.	50
Tabla 9. Análisis de dependencia entre cada marcador y el genotipo sexual en la población de estudio.....	63
Tabla 10. Alelos encontrados en la población y su cromosoma asocia.....	64
Tabla 11. Resultados de la evaluación de microsatélite UNH898 para diferenciar los machos de las hembras.....	65
Tabla 12. Resultados de la evaluación de microsatélite UNH898 para diferenciar los individuos YY de los individuos XY.....	65

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Origen y distribución de la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) en su ambiente natural (FAO, 2014b)..... 8
- Figura 2.** Fotografías de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) en las cuales se aprecia su coloración. A) espécimen con la coloración característica de la especie, B) híbrido rojo (Fishgen, 2005)..... 8
- Figura 3.** Morfología externa de tilapia del Nilo (*O. niloticus*) (Lorenzo, 2011). 9
- Figura 4.** Morfología externa de tilapia del Nilo (*O. niloticus*) (Lorenzo, 2011). 10
- Figura 5.** Aparato reproductor externo de *O. niloticus* (Popma & Masser, 1999; Lorenzo, 2011). 12
- Figura 6.** Procedimiento general para el desarrollo de machos YY y machos GMT® (Beardmore *et al.*, 2001). 28
- Figura 7.** Muestras de DNA extraídas y corridas en un gel de agarosa. La descripción de los carriles es el siguiente: 1) Axygen® 1 Kb ladder DNA; 2) control de contaminación; 3-12) DNA extraído..... 50
- Figura 8.** Electroforesis en agarosa de los productos de PCR para cada marcador. 1: Invitrogen Low DNA Mass Ladder (100bp, 200bp, 400bp, 800bp, 1000bp, 2000bp); 2, 9, 15: controles de reactivos; 3 – 8: amplificaciones UNH995; 10 – 14: amplificaciones UNH898; 16 – 20: amplificaciones UNH104. 51
- Figura 9.** Frecuencias alélicas en hembras y machos en la población de estudio para el microsatélite UNH104. 53
- Figura 10.** Diferencias entre los genotipos del marcador UNH104 presentados en individuos con distinto genotipo sexual..... 54

- Figura 11.** Frecuencia de las combinaciones alélicas encontradas para el marcador UNH104, en los diferentes genotipos sexuales. Los genotipos resaltados se presentan mayoritariamente en los individuos YY. 55
- Figura 12.** Frecuencias alélicas en hembras y machos en la población de estudio del microsatélite UNH898. 56
- Figura 13.** Diferencias entre los genotipos del marcador UNH898 presentados en individuos con distinto genotipo sexual. 57
- Figura 14.** Frecuencia de las combinaciones alélicas encontradas para el marcador UNH898, en los diferentes genotipos sexuales. Los genotipos marcados se muestran mayoritariamente en individuos YY. 58
- Figura 15.** Frecuencias alélicas en hembras y machos en la población de estudio del microsatélite 995. 59
- Figura 16.** Diferencias entre los genotipos del marcador UNH995 presentados en individuos con distinto genotipo sexual. 60
- Figura 17.** Frecuencia de las combinaciones alélicas encontradas para el marcador UNH898, en los diferentes genotipos sexuales. 61

RESUMEN

El cultivo de Tilapia es una de las actividades acuícolas de mayor importancia en el Ecuador y el mundo, siendo la especie *Oreochromis niloticus* la más empleada debido a sus ventajas durante su cultivo. Para alcanzar mayor rentabilidad es trascendental obtener solo machos en el cultivo, la utilización de machos YY como reproductores, puede producir una descendencia completa de machos genéticos, sin embargo obtenerlos es demoroso y costoso debido a la ausencia de métodos de detección del genotipo sexual, utilizando solamente pruebas de progenie. Por lo cual en el presente estudio se buscó optimizar un método para detectar el genotipo sexual usando marcadores moleculares tipo microsatélites. Se seleccionaron machos normales, hembras y supermachos verificados por pruebas de progenie, y se tomaron muestras de aleta pélvica, de las cuales se extrajo el DNA, seguido de una PCR con los microsatélites UNH104, UNH898 y UNH995, y un genotipaje por geles de poliacrilamida. Se seleccionó al microsatélite más relacionado con el genotipo sexual con un test de independencia chi-cuadrado, y al final se evaluó la capacidad de este marcador para detectar el genotipo sexual. Siendo el marcador UNH898 el que prestó la más alta dependencia de entre los tres marcadores, con el menor valor $-p$, de $2,92 \times 10^{-28}$. Mostrando dos alelos (con un tamaño de 262 y 296 bp) presentes mayoritariamente en machos, formando un genotipo para machos YY (262/296) y machos XY (262/296/alelo X). Este marcador mostró una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para diferenciar los machos de las hembras del 96,97 %, 82,35 %, 91,43 % y 93,33 % respectivamente, mientras que para diferenciar los machos YY de los machos XY un valor del 100,00 %, 85,29 %, 85,71 % y 100,00% respectivamente.

Palabras clave: *Oreochromis niloticus*

MICROSATÉLITE

GENOTIPO SEXUAL

ALELO

SUPERMACHO

ABSTRACT

Tilapia farming is one of the most important aquaculture activities in Ecuador and the world, being the species *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) the most widely used because of its advantages for its cultivation. To achieve greater profitability is transcendental get only males in farming, the use of YY males or supermales as breeding animal, it can produce a complete genetic offspring of males. However the development of these breeding is slow and expensive due to the absence of methods sexual genotype detection using only progeny testing. Therefore in the present research was sought to optimize a method for detecting the sexual genotype using microsatellite molecular markers type. Normal males, females and supermale verified by progeny testing were selected and samples of pelvic fin were obtained of this, of which the DNA was extracted with the PureLink® Genomic DNA Kit, followed by a PCR with UNH898, UNH104 and UNH995 microsatellite, and genotyping by polyacrylamide gels. Subsequently, the microsatellite more related to sexual genotype was selected with a test of independence chi-square, and ultimately the ability to detect sexual genotype of this marker was evaluated. Being UNH898 marker which provided the highest dependency between the three markers, with the lowest value-*p*, of 2.92×10^{-28} . Which revealed two alleles (with a size of 262 and 296 bp) present mainly in males, forming a male genotype YY (262/296) and a male XY genotype (262/296/allele X). This marker had a sensitivity, specificity, PPV and NPV to differentiate males from females of 96.97%, 82.35%, 91.43% and 93.33% respectively, while differentiating males YY from males XY a value of 100.00%, 85.29%, 85.71% and 100.00% respectively.

Key words: *Oreochromis niloticus*

MICROSATELLITE

SEXUAL GENOTYPE

ALLELE

SUPERMALE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del Problema

El cultivo de tilapia es una de las actividades acuícolas más importantes alrededor del mundo, es la segunda especie de peces más producida, después la carpa, con una producción mundial estimada en el 2012 de 4,5 millones de toneladas, de las cuales un 3,8 millones de toneladas (~ 75%) corresponde a *Oreochromis niloticus*, conocida comúnmente como tilapia del Nilo o tilapia gris (FAO, 2014a). Su éxito radica en su facilidad de cultivo, así como sus buenas propiedades organolépticas, que han llevado una gran aceptación en mercados locales como internacionales (Khan, 2011).

Esta especie originaria de los ríos y lagos cálidos del noreste africano (Baroiller & Toguyeni, 2004), es muy atractiva para el cultivo, debido a que puede adaptarse a diferentes condiciones ambientales, sistemas y densidades de cultivo (FAO, 2014b). Pueden vivir fácilmente tanto en agua dulce como en agua salobre, e incluso pueden llegar a adaptarse a agua de mar. No necesitan agua de alta calidad para sobrevivir y pueden adaptarse a bajas concentraciones de oxígeno. Al ser animales básicamente omnívoros se los puede alimentar casi con cualquier producto, e incluso pueden llegar a alimentarse del zooplancton presente en el agua (Lim & Webster, 2006).

Todas estas ventajas han llevado a una gran expansión del cultivo de esta especie en varios países alrededor del mundo, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde ha sido una alternativa para mejorar los ingresos y la calidad de nutrición en zonas rurales con altos índices de pobreza (FAO, 2014b).

Sin embargo el cultivo presenta un gran problema, la reproducción precoz en cautiverio y la diferencia en tamaño de la hembra. Lo que produce una reproducción descontrolada en individuos que aún no han llegado al tamaño comercial, ocasionando una producción poco uniforme y mucho más lenta debido a la competencia de alimento, esto disminuye la rentabilidad del cultivo sobre todo en cultivos intensivos (Pullin & McConnell, 1982).

Es por esto que el cultivo de lotes monosexo de machos, es la mejor forma de mantener un cultivo en buen estado y que sea rentable para el productor. Para alcanzar este objetivo se han desarrollado varias tecnologías alrededor del tiempo: sexado manual, hibridación interespecífica, transgénesis, androgénesis, tecnología YY e inversión sexual utilizando hormonas (Beardmore *et al.*, 2001; Khan, 2011).

Según Beardmore *et al.* (2001), la reversión sexual es la forma más efectiva para obtener solo machos, al aplicar hormonas sexuales se alcanza un éxito superior al 98% y su aplicación es relativamente fácil. Sin embargo la aplicación de tecnologías amigables con el ambiente es una de las metas importantes en los sistemas productivos, incluyendo el cultivo de tilapia, tratando de evitar el uso excesivo de hormonas. Por lo cual el desarrollo y mejoramiento de la tecnología de producción de tilapia genéticamente macho (GMT®), mediante la utilización de machos YY es de suma importancia (Varadaraj & Pandian, 1989; Khan, 2011).

La tecnología de machos YY presenta ventajas sobre los otros métodos, como no ser contaminante ni peligrosa, se producen machos verdaderos, mejor crecimiento, etc. Sin embargo, esta tecnología depende de la obtención de estos reproductores, lo cual llega a ser muy complicado y costoso debido a la ausencia de pruebas de detección del genotipo sexual, utilizando solamente pruebas de progenie (Beardmore *et al.*, 2001; Fishgen, 2005).

Otras metodologías de detección del genotipo sexual como cariotipo o identificación de genes reguladores, no han podido ser aplicables en esta especie debido a la ausencia de dimorfismo cromosómico sexual y el desconocimiento de estos genes, respectivamente. (Crosetti *et al.*, 1988). Por lo cual el uso de marcadores moleculares puede ser de gran utilidad para solucionar estos inconvenientes.

1.2. Justificación del Problema

Las tilapias son especies de fácil cultivo y de gran resistencia a factores ambientales, por lo que se ha convertido en una de las principales especies cultivables alrededor del mundo (El-Sayed, 2006). Sin embargo su precocidad reproductiva y el crecimiento lento en las hembras, da como resultado una producción poco uniforme, lo cual disminuye la rentabilidad como negocio (Beardmore *et al.*, 2001). Por lo cual una producción monosexual de especímenes masculinos, los cuales tienen un rápido crecimiento y un mejor peso comercial, es la principal opción para una producción masiva de esta especie (Khan, 2011).

Para el Ecuador el cultivo de tilapia es una de las principales actividades económicas y un rubro considerable de ingreso para el país como exportación (León, 2009). El Ecuador es el décimo productor de tilapia, con 40 mil toneladas en el 2012 (FAO, 2014a), y uno de los grandes exportadores de tilapia hacia los Estados Unidos con un volumen de 8 mil toneladas y un ingreso de 52 millones de dólares en el año 2013 (CNA, 2014). Por lo cual la investigación para mejorar los sistemas de producción es de suma importancia para el país.

Se han desarrollado varias técnicas para obtener una producción monosexual de machos en tilapias. Entre ellas: separación manual de hembras y machos, reversión sexual, androgénesis, hibridación interespecífica y la tecnología de machos YY (Beardmore *et al.*, 2001).

De estas técnicas, la más efectiva la reversión sexual con un porcentaje final de machos superior al 98%. Sin embargo, estos procedimientos causan grandes repercusiones ambientales, por la presencia de hormonas esteroideas en el agua, que puede afectar a otras especies silvestres; además que se requiere un buen manejo y personal de experiencia para su desarrollo (Khalil *et al.* 2011). Esta técnica es la más utilizada alrededor del mundo, y en el Ecuador, es prácticamente la única forma de alcanzar este objetivo, lo que puede provocar una gran contaminación en los cuerpos de agua (León, 2009).

La alternativa más eficiente es la utilización de machos YY o supermachos, en la especie como *O. niloticus*. Por medio de esta tecnología se obtienen machos con una carga cromosomal YY, y estos al ser cruzados con una hembra normal (XX), pueden producir una descendencia de solo machos (Hartley, 2014). Sin embargo este mecanismo se ve afectado por muchos factores genéticos y ambientales, por lo cual su eficiencia en campo varía de un 67% a 100% (Beardmore *et al.*, 2001).

Para producir machos YY se realiza una serie de cruces con especímenes reversados hasta obtener una línea pura de machos YY. Durante cada cruce se utiliza un análisis de progenie para validar los resultados obtenidos, volviendo así el procedimiento muy largo y costoso (Beardmore *et al.*, 2001). Además estos supuestos machos YY, no pueden ser verificados, sino hasta que empiecen su reproducción, lo que ha llevado a problemas en el ámbito productivo (Scott *et al.*, 1989).

Es por esto que se busca verificar la carga cromosomal de los especímenes de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) principal especie de producción, sobre todo en machos con supuesta carga cromosomal YY, para acortar los tiempos de producción de este tipo de reproductores, en la compañía Aquatilgen Cía. Ltda., y así convertirse en pionera en el Ecuador en el desarrollo esta nueva tecnología.

El análisis del cariotipo es una de las mejores maneras en que se puede identificar el genotipo sexual, identificando los cromosomas sexuales de un individuo, sin embargo en las especies del género *Oreochromis* no existe dimorfismo sexual entre estos cromosomas, lo que vuelve imposible su detección mediante esta metodología (Crosetti *et al.*, 1988).

Aunque se ha podido identificar diferencias entre los posibles cromosomas sexuales mediante un análisis del complejo sinaptonémico por microscopía electrónica, donde se ha observado una ausencia de apareamiento en una región de los cromosomas, en los individuos XY, mientras existía un apareamiento normal en los individuos XX y YY (Carrasco *et al.*, 1999). La

utilización de esta metodología es costosa, se necesita equipos sofisticados y por lo general sacrificar a los individuos, lo conllevaría a la eliminación de posibles individuos YY, de alto valor comercial.

La utilización de marcadores moleculares actualmente es útil en diversas aplicaciones en el campo de la biología como es el caso de la detección del genotipo sexual de un individuo (Okumuş & Çiftci, 2003).

En la mayoría de peces, como la tilapia no se han encontrado marcadores de genes específicos que actúen como reguladores maestros del sexo (Khan, 2011). Sin embargo en marcadores tipo microsatélites, se han realizado múltiples estudios en el género *Oreochromis*, logrando identificar algunos con una fuerte ligación al sexo, que pueden predecir la carga cromosómica sexual con aproximadamente un 95% de efectividad, por lo cual es la opción más viable para identificar el genotipo sexual de un individuo (Lee *et al.*, 2003; Eshel *et al.*, 2011, 2012).

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Optimizar una técnica de detección del genotipo sexual mediante microsatélites en la población de tilapia del Nilo presente en las piscinas de reproducción de Aquatilgen Cía. Ltda.

1.3.2. Específicos

- Optimizar la extracción de DNA de muestras de aletas de tilapia con el kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen, USA).
- Optimizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional) para los microsatélites UNH898, UNH995 y UNH104.
- Identificar los alelos y los genotipos presentes en la población para cada microsatélite, así como su relación con el genotipo sexual.

- Identificar y seleccionar el microsatélite que presente mejor dependencia con el genotipo sexual, para ser usado en su diagnóstico.
- Evaluar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del microsatélite seleccionado para diferenciar los genotipos sexuales.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Características generales de la especie

1.4.1.1. Taxonomía y distribución geográfica

La familia Cichlidae según Nagl *et al.* (2001), posee aproximadamente 2000 especies ampliamente distribuidas en África, Medio Oriente, Centro América y Sudamérica. Dentro de esta familia se han contabilizado más de cien géneros por lo cual el grupo de especies conocidas como “tilapias” se encuentran en una escala taxonómica alternativa, la tribu tilapiine. La tribu se utiliza para agrupar especies con similitudes en una escala entre la familia y el género, cuando existen muchos géneros en una sola familia, como en este caso (ICZN, 1999).

La tribu tilapiine contiene más de 70 especies, las cuales tienen importancia en las actividades acuícolas en mayor o menor medida (Baroiller & Toguyeni, 2004).

Según Lim & Webster (2006), las especies de esta familia se caracterizan por poseer un cuerpo moderadamente anchos y comprimidos lateralmente, aunque la forma del cuerpo puede variar en algunos géneros. El tamaño también suele ser variable desde unos 25mm hasta unos 80 cm de longitud, sin embargo la mayoría de especies se encuentran en un rango de 10 a 20 cm. La presencia de una línea lateral ininterrumpida es una de las características notables de esta familia, presente en todas las especies, sin embargo la característica más notable de esta familia es el cuidado que tienen los progenitores hacia su descendencia.

Según la Integrated Taxonomic Information System (2014), la clasificación taxonómica para la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es la siguiente:

Dominio: Eukarya

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Clase: Actinopterygii

Orden: Perciformes

Suborden: Labroidei

Familia: Cichlidae

Tribu: Tilapiine

Género: *Oreochromis*

Especie: *Oreochromis niloticus*

La especie *O. niloticus* es originaria de las aguas dulces y estuarios del centro y norte de África. Se cree que posiblemente de los lagos del sur de Egipto, sin embargo se encuentra distribuida en los ríos y lagos de Etiopia, Eritrea, Kenia, Uganda, Zaire (figura 1). En la actualidad debido a la intensificación del cultivo, se encuentra distribuida artificialmente en 135 países, en todos los continentes (FAO, 2014b).

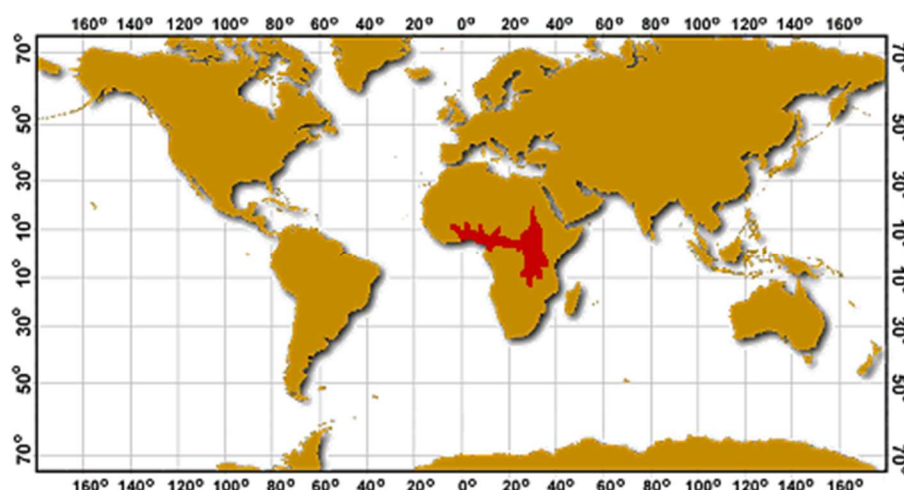


Figura 1. Origen y distribución de la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) en su ambiente natural (FAO, 2014b).

1.4.1.2. Morfología externa

La familia Cichlidae se caracteriza por presentar peces de coloraciones oscuras con brillo metálico y bandas verticales más oscuras, aunque algunas especies presentan colores más vivos (El-Sayed, 2006). La tilapia de Nilo (*O. niloticus*) presenta una coloración gris plateada con bandas verticales de color negro, oliva o gris oscuro (figura 2 A), y durante la temporada de desove, las aletas pectorales, dorsal y caudal cambian a un color rojizo y la aleta caudal presenta numerosas barras negras, además la tilapia posee cromatóforos en su piel lo que le permite realizar pequeñas variaciones de color. Sin embargo existen mutaciones y/o híbridos de esta especie con una coloración que va desde el rojo pálido hasta el blanco (figura 2 B) (FAO, 2014b).

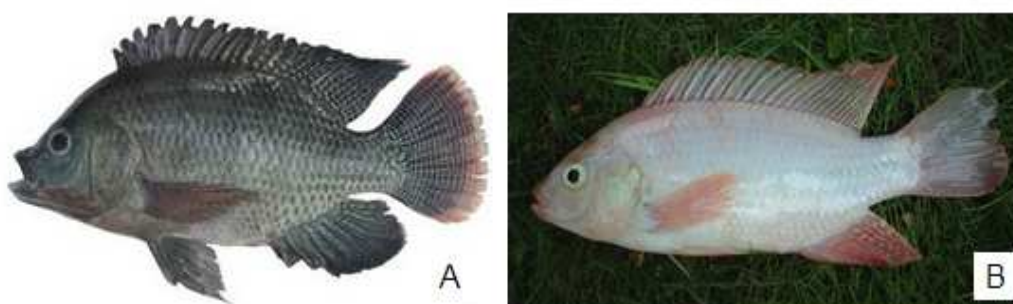


Figura 2. Fotografías de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) en las cuales se aprecia su coloración. A) espécimen con la coloración característica de la especie, B) híbrido rojo (Fishgen, 2005).

Esta especie puede llegar a medir 62 cm de longitud y pesar 3,5 kg, reportado en peces de 9 años de edad, sin embargo en promedio miden unos 20 cm y su tiempo de vida en cultivo suele 6 a 9 meses (Bwanika et al., 2004).

La especie presenta un cuerpo lateralmente comprimido y ancho, completamente cubierto de escamas largas y cicloides, que no desencajan fácilmente. La aleta dorsal presenta 16 a 17 espinas y 11 a 15 radios blandos, lo que les funciona como sistema de defensa. La aleta anal presenta 3 espinas y de 10 a 11 rayos. También presenta una aleta caudal truncada. (FAO, 2014b). Las aletas pélvica y pectoral son largas y más anteriores, lo que les provee un gran control sobre el nado y la maniobrabilidad. Las aletas también son usadas para la locomoción debido a que presentan músculos rojos diseñados para darle al individuo una continua movilidad cuando nada a baja velocidad (El-Sayed, 2006). En la figura 3 se observa la morfología externa básica de la tilapia.

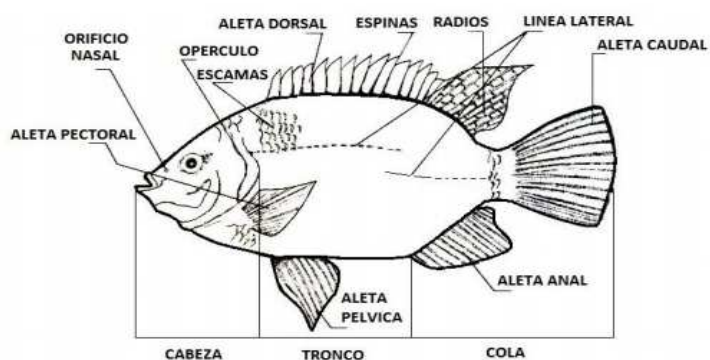


Figura 3. Morfología externa de tilapia del Nilo (*O. niloticus*) (Lorenzo, 2011).

1.4.1.3. Morfología Interna

Según Lim & Webster (2006) y Lorenzo (2011), la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) presenta las siguientes características particulares.

La boca presenta en su interior dientes mandibulares unicúspides. El intestino mide 7 veces más que la longitud total del cuerpo, con forma de tubo hueco y redondo que se adelgaza después del píloro. Asociado al aparato digestivo, esta hígado, el cual es de gran tamaño y de forma alargada.

El riñón, tiene una forma ovoide que presenta un solo glomérulo, la sangre fluye a través de éste mediante unos tubos hacia los uréteres, que secretan la orina a la vejiga y posteriormente al exterior. El sistema circulatorio, posee un corazón, de forma redonda y bilobular, localizado casi en la base de la garganta. En la figura 4 se muestra la morfología interna básica de las tilapias.

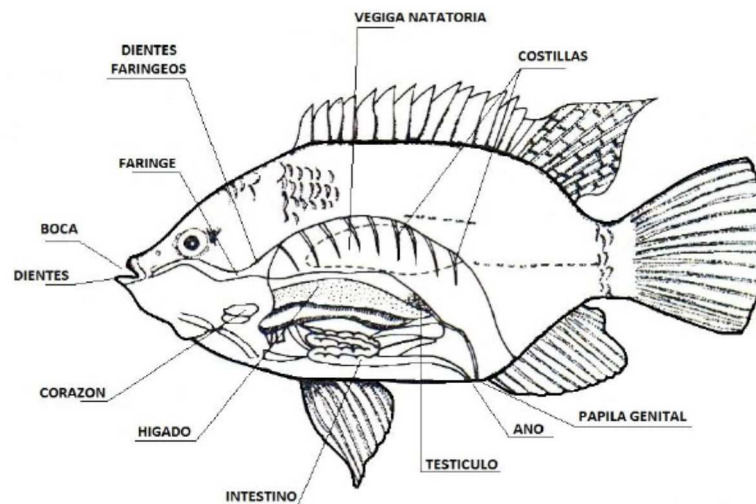


Figura 4. Morfología externa de tilapia del Nilo (*O. niloticus*) (Lorenzo, 2011).

1.4.1.4. Dieta y forma de alimentación

La tilapia del Nilo es conocida por alimentarse de varias fuentes, entre ellas plancton, perifiton, algas, plantas acuáticas, fauna bentónica, invertebrados, detritos, capas bacterianas, e inclusive otros peces o huevos de peces (ISSG, 2014). El alimento natural representa entre un 30 a un 50% de su crecimiento, a diferencia de muchas especies donde el alimento suplementario es de lo único que se alimentan (Popma & Masser, 1999).

Dependiendo de la fuente de alimento la tilapia puede alimentarse filtrando alimentos en suspensión, al roer los sedimentos y por ingestión directa (FAO, 2014b). La forma más común de alimentarse es al engullir el plancton atrapado por el mucus excretado por sus agallas, lo que forma un bolo rico en plancton que luego es ingerido, esta es una forma de filtración adaptativa en esta especie. Sin embargo esta especie presenta una alta plasticidad para conseguir su alimento de acuerdo a su ambiente y la competencia con otras especies (Fryer & Iles, 1972).

1.4.1.5. Hábitat y crecimiento

Esta especie puede vivir naturalmente un promedio de diez años y pueden habitar fácilmente cualquier cuerpo de agua dulce, e incluso salobre (ISSG, 2014).

Tiene una gran tolerancia a la salinidad, aunque su crecimiento se ve limitado cuando esta supera las 15 partes por mil. Inclusive existen líneas seleccionadas mucho más resistentes a alta concentración de sales (Popma & Masser, 1999). La temperatura ideal para un correcto crecimiento está entre 28 a 36 °C, y decrece mientras es menor la temperatura (FAO, 2005).

Además esta especie es capaz de adaptarse a muchas condiciones ambientales adversas, como alta concentración de amonio y nitrito, o a bajas concentraciones de oxígeno disuelto. Además su plasticidad alimentaria le permite habitar casi cualquier hábitat acuático continental donde la temperatura no sea demasiado baja (Khan, 2011).

1.4.1.6. Reproducción

Las características sexuales secundarias entre el macho y la hembra (dimorfismo sexual) no son notorias en esta familia. Sin embargo la hembra suele tener menor tamaño que el macho, y tarda más tiempo en crecer (Lim & Webster, 2006).

Los aparatos reproductores externos son fácilmente identificables, una vez ya desarrollados. Ambos sexos poseen una papila genital antes del ano y la aleta anal. El macho posee un conducto urogenital poco perceptible a simple vista. Mientras la hembra posee dos conductos, el poro urinario y el oviducto o poro genital, este último es una hendidura perpendicular al eje del cuerpo (figura 5) (Popma & Masser, 1999; Lorenzo, 2011).

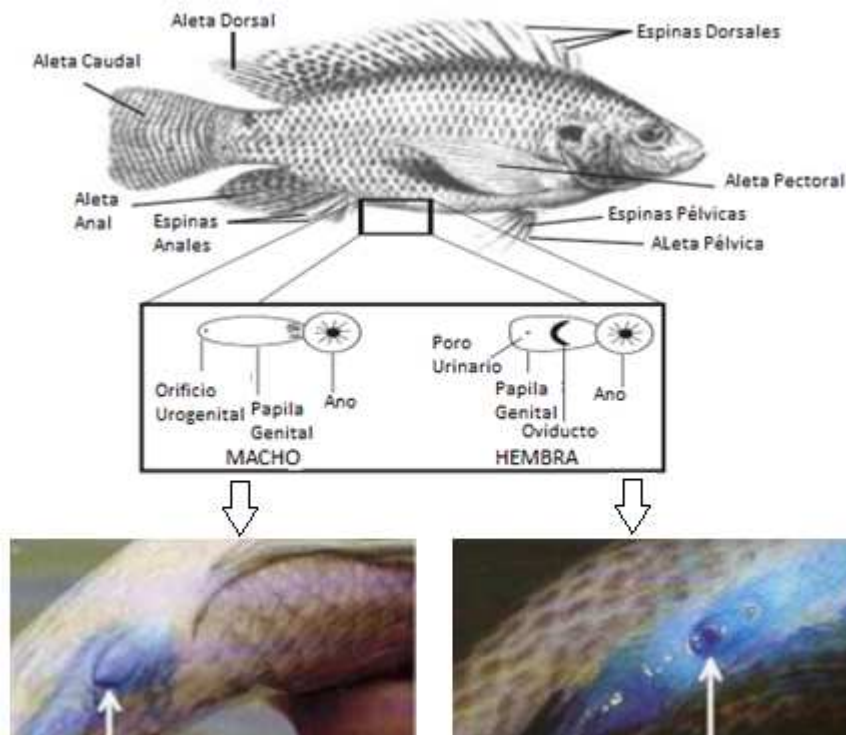


Figura 5. Aparato reproductor externo de *O. niloticus* (Popma & Masser, 1999; Lorenzo, 2011).

Las especies de la familia de Cichlidae poseen una reproducción externa, en donde la hembra pone los huevos y el macho los fecunda, pero lo más característico es el cuidado que tienen de sus huevos. En la mayoría de especies los padres, sea uno de los dos o ambos dependiendo la especie, cuidan de los huevos fecundados y de los alevines en sus bocas hasta que estos pierdan el saco vitelino (El-Sayed, 2006).

En el género *Oreochromis* es donde más ha sido estudiada la reproducción debido a su importancia comercial. La madurez sexual en este género es variable y se afecta por el tamaño, edad y condiciones ambientales; el confinamiento suele acelerar los procesos de maduración sexual (Popma & Masser, 1999).

Según Beardmore *et al.* (2001), la tilapia del Nilo en su estado natural alcanza la madurez sexual en 10 a 12 meses, con un peso de 350 a 500 gramos, mientras que en cautiverio alcanzan su madurez a los 5 a 6 meses con un peso de 150 a 200 gramos. Una vez que alcanzan su madurez sexual,

tienen desoves constantes, aproximadamente cada dos meses en su ambiente natural, mientras que en cautiverio suelen ser cada 2 a 4 semanas.

Durante el apareamiento el macho cava una zanja en el fondo de los estanques, generalmente en aguas poco profundas. La hembra deposita los huevos en la zanja después de un corto ritual de apareamiento, de 2 a 4 huevos por cada gramo de peso. Una vez depositados los huevos el macho los fertiliza, la hembra recoge estos huevos y los mantiene en la boca hasta que los alevines pierdan su saco vitelino (Popma & Masser, 1999).

1.4.2. Cultivo de tilapia

1.4.2.1. Antecedentes históricos y tendencias

La tilapia ha sido una fuente de alimento importante desde la antigüedad. En Egipto se han encontrado dibujos acerca del cultivo de tilapia en tumbas que datan de hace unos 2500 años a.C., en los cuales se muestran peces cultivados en estanques ornamentales (El-Sayed, 2006).

Según el informe sobre esta especie, publicado por la FAO (2005), indica que la expansión del cultivo de tilapia empezó con la especie *Oreochromis mossambicus*, durante los años 1940 y 1950. Mientras que para la tilapia del Nilo ocurrió durante la década de 1960 hasta la década de 1980.

La tilapia del Nilo procedente de criaderos en Japón fue introducida a Tailandia en 1965, y desde Tailandia a Filipinas. De Costa de Marfil se la llevó a Brasil en 1971, y de aquí enviada a los Estados Unidos en 1974. En 1978, la tilapia del Nilo fue introducida a China, líder mundial en la producción de tilapia. Siendo su producción más de la mitad de la producción mundial todos los años desde 1992 hasta 2003.

La cría incontrolada de tilapia en estanques, llevó a la contratación excesiva de personal, retraso del crecimiento y una disminución en el tamaño comercial, empañando el empujón inicial de la tilapia como alimento. El desarrollo de técnicas de reversión sexual mediante hormonas en la década de 1970 representó un gran avance que permitió obtener cultivos de machos,

con tallas comerciales uniformes. Además la mejora tecnológica en nutrición y sistemas de cultivo, junto con el crecimiento del mercado, dio lugar a una rápida expansión de la industria desde mediados de 1980.

De todas las especies de tilapias, solo pocas las que han llegado a tener gran impacto en la acuicultura, siendo la tilapia del Nilo o Gris (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) la más producida. Sin embargo otras especies como la: tilapia azul o del Jordán (*Oreochromis aureus* Steindachner), tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), tilapia roja (*Oreochromis spp.*, híbrido entre *O. mossambicus* o. *honorum* x *O. niloticus* o. *aureus*) y tilapia blanca o perla (*Oreochromis spp.*, híbrido entre *O. niloticus* x *O. aureus*); también son muy cultivadas alrededor del mundo (Khan, 2011).

Debido a la facilidad del cultivo de tilapia y buena calidad de la carne, desde inicios del siglo XX, la introducción de la tilapia para propósitos comerciales se extendió principalmente en Asia, Europa y Estados Unidos (FAO, 2014c). Actualmente el cultivo de tilapia se encuentra en expansión para satisfacer los mercados locales e internacionales, y hasta el 2012 el cultivo de tilapia se ha extendido a 135 países según la FAO (2014), con una predominancia (~75%) en el cultivo de la tilapia del Nilo (*O. niloticus*), y siendo China el mayor productor mundial.

Existe un gran número de ventajas en el cultivo de tilapia del Nilo. Esta especie puede ser cultivada en agua dulce, agua salobre e incluso en agua de mar; también puede tolerar una pobre calidad del agua y fluctuaciones medioambientales (Popma & Masser, 1999). Además pueden crecer en altas densidades poblacionales, alimentarse de zooplancton y pueden crecer usando muchos productos para su alimentación (ICZN, 1999).

La buena calidad y el buen sabor de la carne han sido atractivos para los consumidores, y existe en diferentes presentaciones para su comercialización (entero o filete, fresco o congelado, marinado o ahumado) (Clement & Lovell, 1994). El contenido de proteína es alto, la carne es baja en grasa y colesterol, además presenta valores nutricionales excelentes (Khan, 2011).

Todas estas cualidades han llevado al aumento exponencial del cultivo de tilapia. Su flexibilidad y versatilidad culinaria, precio razonable y su sabor neutro han estabilizado el mercado de la carne de tilapia en la mayoría de países del mundo (Khan, 2011). La tilapia es ahora el segundo grupo de peces más cultivado en el mundo, después del cultivo de carpa, con una producción global de 3,8 millones de toneladas métricas en el 2012 (FAO, 2014a).

1.4.2.2. Sistemas de Cultivo

El cultivo de tilapia puede ser extensivo, semi-intensivo o intensivo (Khan, 2011). En los últimos años existe un cambio gradual de los tradicionales cultivos semi-intensivos hacia sistemas intensivos no tradicionales. La diversificación de los sistemas de cultivo como programas de comercio ha contribuido al aumento de la demanda en mercados locales e internacionales. Tradicionalmente la tilapia es cultivada en estanques de tierra sin alimento suplementario. Mientras que los cultivos intensivos se realizan en estanques de concreto o en jaulas en aguas abiertas (El-Sayed, 2006).

Los sistemas de cultivo extensivo se realizan en estanques o en reservorios de riego. Estos son muy practicados en países en desarrollo y los rangos de producción van de 300 a 700 kg/ha/cultivo. Los cultivos semi-intensivos se dan en estanques y típicamente está integrado con actividades agropecuarias debido a que los desechos de estas actividades pueden ser utilizados como fertilizantes orgánicos aumentando la productividad de los cultivos. Por ejemplo en Brasil, donde predominan este tipo de cultivos, el rango de producción va de 3000 a 4000 kg/ha en monocultivos o policultivos con carpas junto con la crianza de cerdos (Pullin & McConnell, 1982; Khan, 2011).

El cultivo intensivo se lo realiza en estanques, canales, jaulas y tanques. Se utilizan aguas públicas o comunales, incluyendo reservorios, lagos, bahías, sistemas de riego o estanques de aldeas (Lim & Webster, 2006). La mayoría, se dan en cortos espacios de terreno, por lo general en menos de 1 hectárea, con la utilización de tanques con grandes cantidades de agua en circulación.

Este tipo de cultivos son muy utilizados en los países de América Central y Sudamérica, donde las compañías de crianza ofertan sus productos como de alta calidad para mercados internacionales (Pullin & McConnell, 1982).

El uso de tecnologías de punta como el uso de aireadores, la alimentación suplementaria, cultivos monosexuales, etc., hace posible el cultivo de altas densidades de peces, pudiendo alcanzar una producción de 45,000 kg/ha/cultivo (Khan, 2011). El costo de inversión inicial es alto, pero se vuelve rentable a largo plazo, el costo de producción dependiendo del tamaño del cultivo varía de 1.25 a 1.55 \$/kg mientras que el precio comercial de la tilapia supera los 2.65 \$/kg (Watanabe, 2002).

Sin embargo la tilapia presenta un gran problema que disminuye significativamente el rendimiento de la producción. Cuando se mantiene un cultivo de sexo mixto las densidades de cultivos suelen mantenerse altas, pero la mayoría de peces pesan menos de 100 gramos, los cuales no están en el tamaño para comercializarlos. Por lo cual la tendencia en los últimos años ha sido utilizar cultivos monosexuales de machos para evitar reproducción descontrolada (Khan, 2011).

1.4.2.3. Importancia del cultivo mono sexual de machos

Las tilapias tienen una maduración rápida y pueden ser fácilmente criadas en cautividad durante todo el año. Su madurez sexual se produce de 4 a 6 meses después de la eclosión del huevo, sin embargo esta suele darse antes de que se encuentren en el tamaño comercial. Además la hembra produce desoves periódicos, con una frecuencia de dos a cuatro semanas, lo que provoca que las áreas de cultivo se saturen de nuevos individuos de menor tamaño, que lleva a un menor crecimiento en los demás individuos (Pechsiri & Yakupitiyage, 2005). También hay que recalcar que las hembras tienen un menor crecimiento en comparación del macho y suelen demorarse más tiempo en llegar al tamaño comercial.

También las hembras invierten gran cantidad de energía en la formación de gametos y en las interacciones para el apareamiento. Todos estos factores

mencionados derivan en un crecimiento poco uniforme de los peces, lo que vuelve poco rentable la producción en cultivos intensivos (Mair *et al.*, 1995). Por lo cual es de suma importancia tener cultivos monosexuales con individuos machos para obtener un rápido crecimiento y una mayor rentabilidad en la producción.

1.4.2.4. Cultivo de tilapia en el Ecuador

Según lo reportado por Marcillo & Landívar (2008), en Octubre de 1965 fue introducida al Ecuador desde Colombia la tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), y trasladada a Santo Domingo de los Colorados. Posteriormente fueron transferidas al lago Yaguarcocha situado en la provincia de Imbabura.

En el año 1974 se insertó desde Brasil la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), y a principios de los años 80 se introdujo al país la tilapia roja (*Oreochromis sp.*), la cual es actualmente la especie predominante para el consumo interno.

En los siguientes años el cultivo de tilapia fue tradicionalmente muy lento y mal encaminado, pero para el año 1995 Ecuador ya tenía una pequeña y orientada exportación industrial del cultivo de tilapia (Alceste & Illingworth, 2001).

En 1998, el país se convirtió en el primer productor de camarón en América, sin embargo en el año 1999, el síndrome de la mancha blanca golpeó y devastó la producción. Después de este acontecimiento se amplió la producción de tilapia, como alternativa de la producción de camarón. Además, los acuicultores encontraron que el camarón producido en un cultivo mixto con tilapia tuvo gran éxito, lo que dio lugar a una rápida expansión del cultivo de tilapia en granjas camaroneras; convirtiéndose en uno de los mayor exportadores de filetes frescos hacia los Estados Unidos (Velasco & Freire, 2008).

Las exportaciones de filetes de tilapia en Ecuador casi se triplicó en 1999, y la producción siguió creciendo. Para el año 2000, Ecuador fue el máximo exportador de filete fresco de tilapia en la región superando a Costa Rica y Honduras, manteniendo este primer puesto hasta 2007 (Marcillo & Landívar, 2008).

La tilapia ecuatoriana representa aproximadamente el 48% del volumen total de filetes frescos de tilapia que importa los EE.UU. Localmente no se consume mucha tilapia, la mayor parte de la producción es destinada a las exportaciones, se ofrece algunas variedades de este producto: tilapia fresca, entero congelado, y filetes frescos y congelados (Alceste & Illingworth, 2001).

Hoy en día el Ecuador ocupa el décimo lugar en producción de tilapia en el mundo (cuando China y Taiwán son considerados una sola región), con un estimado de 40 mil toneladas en el 2012. Exportando cerca de 10 mil toneladas, con un ingreso cercano a 60 millones de dólares (FAO, 2014a).

Actualmente el principal mercado para la tilapia, es los Estados Unidos. En el 2012 se exportó un volumen de 8 mil toneladas, lo que represento un ingreso para el país de 52 millones de dólares en el año. Siendo la presentación más apetecida, el filete fresco, el cual representa cerca del 90% de estas exportaciones (CNA, 2014).

1.4.3. Determinación sexual

La mayoría de especies superiores se reproducen sexualmente, por la unión de dos gametos diferenciados que producirán un individuo viable. Por lo tanto en este tipo de reproducción existen dos individuos que produzcan un tipo de gametos cada uno, es decir dos sexos, por lo general macho y hembra. Para cumplir este propósito los sexos poseen órganos especializados en la producción de uno de los dos gametos (Solomon *et al.*, 2014).

Aunque hay especies que tienen un solo sexo y se reproducen por partenogénesis, es decir sin fertilización previa. También hay especies

hermafroditas, que pueden poseer ambos sexos o pueden cambiar entre macho y hembra cuando es necesario (Brooker, 2013).

Para que se realice esta diferenciación entre dos sexos, es necesario un mecanismo que dirija el desarrollo hacia uno de ellos. A menudo son sistemas complejos regulados por factores genéticos y/o ambientales, conocidos como mecanismos de determinación sexual (DS) (Hake & O'Connor, 2008).

Según Oliván (2010), los mecanismos de determinación sexual son sistemas biológicos que define el desarrollo de las características sexuales en un organismo. Generalmente, la determinación del sexo es genética, machos y hembras presentan diferentes alelos o diferentes genes, que especifican su morfología sexual, muchas veces agrupados en cromosomas sexuales.

Sin embargo en otros casos el sexo puede estar determinado por variables ambientales, como la temperatura, el pH, humedad, composición o incluso variables sociales. Y en muchos de los casos estas variables ambientales junto con los mecanismos genéticos, interactúan en la determinación sexual.

La determinación genética está asociada a la presencia de un grupo de alelos de uno o varios genes diferentes para cada sexo, que actúan como reguladores del proceso de diferenciación sexual. Este tipo de determinación sexual puede ser de dos tipos: mediada por factores mayores o cromosómicos y mediada por factores menores o génicos (Oliván, 2010).

Los factores genéticos mayores o cromosómicos actúan cuando los genes reguladores responsables se encuentran agrupados en cromosomas sexuales, conocidos como heterocromosomas (no necesariamente son diferentes morfológicamente), donde uno gen actúa como regulador dominante o su nivel de expresión frente a otros, dirige el desarrollo sexual (Gamble & Zarkower, 2012).

Según Oliván (2010), Los principales tipos de determinación cromosómica son:

- El sistema XX/XY, donde el cromosoma Y es el determinante de masculinidad, por lo tanto el macho es heterogamético (XY) y la hembra homogamética (XX).
- El sistema ZZ/ZW, donde las hembras son los individuos heterogaméticos, (ZW), y los machos son los homogaméticos (ZZ).
- El sistema de un solo cromosoma sexual X0, donde existe un solo cromosoma sexual, el individuo XX es habitualmente hembra, y el X0 macho (0 señala ausencia de Y), aunque también puede darse en un mecanismo ZZ, con la hembras ZO.
- El sistema de un cromosoma sexual tipo XA, donde el número de cromosomas sexuales (X) en relación al número de juegos autosómicos (A) es la determinante del sexo (índice sexual).
- Y la haplodiploidía que aunque no depende de la presencia de cromosomas sexuales, la cantidad cromosómica total (ploidía) es el determinante sexual, comúnmente las hembras son diploides, generadas por fecundación; y los machos haploides, generados por partenogénesis.

Por otro lado, se les conoce como factores genéticos menores o génicos, cuando la DS viene dada por genes determinantes del sexo, uno o varios, de los cuales múltiples existen copias y polimorfismos sexuales están distribuidos por todo el genoma, aunque algunos pueden agruparse en cromosomas y actuar como supuestos factores mayores de determinación génica (Hake & O'Connor, 2008).

Al estar los genes dispersos en los cromosomas autosómicos, el sexo viene dado por una serie alélica específica en donde el masculino (m) es dominante al hermafroditismo (h) y este dominante a la serie femenina (f). Este tipo de determinación sexual al ser más primitivo está presente en plantas y en algunos peces. Y por lo general algunos de estas series alélicas

están asociadas a factores genéticos mayores que modifican las proporciones del sexo, comúnmente en peces (Oliván, 2010).

1.4.3.1. Determinación del sexo en peces

Los mecanismos de reproducción en los peces son altamente variables. La mayoría de peces se reproducen sexualmente, sin embargo hay algunos peces que se reproducen asexualmente, mediante ginogénesis. También existen peces con hermafroditismo protándrico y protógino (Devlin & Nagahama, 2002).

La mayoría de peces son gonocoristas, es decir que tienen bien diferenciados los sexos. En ellos tanto los mecanismos ambientales como genéticos actúan para la determinación del sexo. Los mecanismos genéticos pueden estar regulados por factores genéticos mayores (cromosomales) y/o por factores genéticos menores (génico) (Khan, 2011).

Los mecanismos cromosómicos en peces son muy variados, pueden ser sistemas XX/XY (macho heterogamético, por ejemplo en *Oncorhynchus mykiss* o trucha arcoíris), sistemas WZ/ZZ (hembra heterogamética, por ejemplo *Aulopus japonicus*), sistemas con múltiples cromosomas y sistemas multifactoriales (por ejemplo en *Xiphophorus maculatus*, el macho es XY o YY y la hembra es XX, WX o WY). Además que estos factores mayores de determinación pueden estar afectados por genes sexuales adicionales (Devlin & Nagahama, 2002; Khan, 2011).

Los estudios citogenéticos en peces han detectado diferencias morfológicas en los cromosomas sexuales en pocas especies. La mayoría son cromosomas sin una notable diferenciación utilizando las técnicas actuales de identificación, debido a que se encuentran en etapas primitivas de diferenciación morfológica (Khan, 2011).

Otras técnicas han sido utilizadas para determinar los mecanismos de determinación sexual en la ausencia del dimorfismo cromosómico, entre ellas las manipulaciones cromosómicas como ginogénesis, androgénesis y

poliploidía; los análisis de progenies de los cruces entre individuos revertidos y de hibridaciones y actualmente análisis de segregación con marcadores moleculares asociados al sexo (Zhang *et al.*, 2009).

También se han demostrado mecanismos ambientales de determinación sexual en algunas especies. El factor ambiental determinante en la mayoría de especies es la temperatura (TSD, temperature sex determination), donde los individuos en su etapa larval son termosensibles, es decir que temperaturas altas o bajas pueden llevar al desarrollo de hembras o machos (Baroiller & D'Cotta, 2001).

1.4.3.2. Determinación del sexo en tilapias

La tilapia debido a su importancia comercial ha sido objetos de múltiples estudios acerca de su determinación sexual. La necesidad de manipular la descendencia para obtener cultivos solo machos, depende de la comprensión de estos mecanismos, sobre todo para el desarrollo de machos GMT® (Mair *et al.*, 1997).

Los sistemas de determinación sexual ha sido analizado usando una variedad de procedimientos en varias especies de este grupo donde no existe diferencias morfológicas en los cromosomas sexuales y no existen marcadores moleculares apropiados (Khan, 2011). El análisis de la proporción del sexo fenotípico en las progenies producidas por hibridación, manipulaciones cromosómicas e individuos reversados, conocido como análisis de pro genie, han revelado dos sistemas genéticos básicos, XX/XY y WW/ZZ. Sin embargo hay una gran complejidad en los mecanismos de DS en estas especies, y en particular en la tilapia del Nilo (Baroiller *et al.*, 2009).

Según Baroiller *et al.* (2009) mencionan una determinación sexual genética mayor XX/XY en *O. niloticus*, *O. mossambicus*, *T. zillii*; y ZZ/ZW en *O. aureus*, *O. hornorum*, especies de importancia económica. Sin embargo las desviaciones en los radios sexuales de estudios que envuelven manipulaciones cromosómicas y reversiones sexuales, sugieren la presencia de locus autosómicos epistáticos y/o efectos ambientales.

Los efectos del ambiente en la DS de la tilapia también han sido evidenciados. La temperatura es el factor predominante, se ha demostrado de progenies de supuestas todas hembras pueden ser revertidas cuando se las mantiene a una temperatura sobre los 36° y lo mismo sucede cuando los machos son expuestos a altas temperatura. Sin embargo ni la baja temperatura ni la salinidad han confirmado ser factores significantes en la determinación sexual (Baroiller *et al.*, 2009).

Los estudios citogenéticos no han mostrado la presencia de cromosomas sexuales diferenciados en las tilapias (Crosetti *et al.*, 1988). Sin embargo Foresti *et al.* (1993) y Carrasco *et al.* (1999) reportaron diferencias entre cromosomas que apoyan la teoría del sistema XX/XY en *O. niloticus*, mediante un análisis del complejo sinaptotémico durante la meiosis por microscopía electrónica.

En estos estudios se rebeló la falta de apareamiento en una de los cromosomas entre individuos XY, mientras que en individuos XX y YY el apareamiento fue normal, lo que sugiere que en esta zona hay un acumulamiento de heterocromatina que puede ser la región que contenga los reguladores de la determinación sexual

El uso de marcadores moleculares tipo SSRs también reveló una zona ligada al sexo en *O. niloticus* (Baroiller *et al.*, 2009). Se ha podido encontrar una región en el Grupo de Ligación 1 y 23 del Mapa Genético de *O. niloticus*, en la mayoría de familias estudiadas lo que apoya la teoría del sistema XX/XY, sin embargo en otras no se segregaban de igual manera, lo que sugiere la presencia de genes autosómicos influyentes (Lee *et al.*, 2003; Eshel *et al.*, 2011).

1.4.4. Metodologías de obtención de lotes mono sexo

Existen varios métodos para producir cultivos de individuos solo machos, yendo del más simple como la separación manual de los sexos, hasta métodos de última tecnología como la transgénesis, siendo el más utilizado,

la reversión sexual por hormonas con un 98% de eficiencia (Khan, 2011). En la tabla 1, se muestran los métodos existentes con sus ventajas y desventajas.

Tabla 1. Métodos de obtención de cultivos monosexual de machos en tilapia, ventajas y desventajas.

Método	Aplicación Comercial	Ventajas	Desventajas
Clasificación Manual	Raramente	fácilmente Aplicable	<ul style="list-style-type: none"> • No Rentable en cultivos Intensivos • Laborioso • Personal con Experiencia
Reversión sexual con hormonas	Si	Alto porcentaje de Machos	<ul style="list-style-type: none"> • Relativamente Caro • Residuos Hormonales • Contaminación del agua por Hormonas • Alto Nivel de Control • Altos niveles de seguridad • Percepción del Público
Hibridación interespecífica	Si	Fácilmente aplicable	<ul style="list-style-type: none"> • Posibles Impactos Ambientales • Poco Reproducible • Variaciones en los porcentajes de machos
Androgénesis	No	Conveniente para especies con ♂ homogaméticos	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para ser aplicado a gran escala • Resultados Inconsistentes
YY/GMT	Si	<ul style="list-style-type: none"> • Conveniente en especies con ♂ heterogaméticos • Rentable y consistente • Amigable con el ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> • Se necesita gran control en el manejo de los reproductores • Dificultad para obtener los reproductores YY
Triploidía	No	Conveniente en especies con ♂ homogaméticos	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para aplicarlo a gran escala • Costoso
Transgénesis	No	Se puede obtener una alta consistencia en los resultados	<ul style="list-style-type: none"> • Percepción Pobre en los consumidores • Costoso

Fuente: (Beardmore et al., 2001).

➤ **Sexado manual**

Este es un método donde se separan machos y hembras, una vez que han alcanzado su diferenciación sexual y su papila genital es suficientemente grande para ser diferenciada visualmente, cuando el pez se encuentra entre 20 a 30 gramos (Mair, 2001).

Es un método económico y fácil de implementar en cultivos con pocos especímenes. Sin embargo cuando se tiene un cultivo intensivo es casi

imposible tener un buen resultado con este método, ya que se pierde prácticamente la mitad de la producción. Además entre más pequeño es el animal la distinción de los sexos suele tornarse más difícil y suele haber muchos errores en el sexado. Esta metodología es extremadamente laboriosa y se necesita personal con experiencia para realizarlo de una manera eficiente (Beardmore *et al.*, 2001).

➤ **Reversión sexual**

Esta metodología se basa en que los peces en las etapas tempranas de desarrollo no tienen diferenciado su sexo. Los individuos no tienen formados sus órganos reproductores, por lo cual son susceptibles a tratamientos hormonales que determinen su sexo. Ejerciendo su efecto a nivel fenotípico, posiblemente actuando sobre las células sexuales indiferenciadas, por lo cual no actúan sobre su genética (Pandian & Sheela, 1995).

En tilapia es común usar la 17- α -metiltestosterona, debido a su eficiencia y su precio (Khan, 2011). Por lo general se la administra en suplementación con la dieta, la hormona es disuelta en alcohol absoluto y mezclada junto al alimento (Fuentes *et al.*, 2013). A pesar de que su implementación es relativamente fácil, presenta algunas dificultades. La hormona puede degradarse durante su almacenamiento o en el tracto digestivo del animal. Además la distribución de la hormona no es uniforme, debido a las jerarquías de alimentación en los peces (Beardmore *et al.*, 2001).

La eficiencia de la reversión suele ser muy alta, por lo general superior al 98%. Sin embargo el uso excesivo de hormonas conlleva a serios problemas fisiológicos en los animales, como: esterilidad, deformidades, deficiencias inmunológicas y paradójicamente puede existir una aromatización de los andrógenos para producir feminización (Khalil *et al.*, 2011).

Además existe un grave riesgo de contaminación de los ambientes acuáticos por la eliminación de grandes cantidades de hormonas, que suele suceder en grandes cultivos, donde pueden llegar a utilizarse kilogramos de hormona (Khan, 2011). Y a pesar de que está comprobado que el animal llega

a metabolizar la hormona, no hay reportes de la degradación de sus subproductos, algunos formando análogos activos, lo que conlleva un riesgo para la salud tanto para el personal que trabaja con los animales como para los consumidores (Beardmore *et al.*, 2001).

➤ **Hibridación interespecífica**

Esta metodología se basa en la capacidad que tienen las tilapias de producir descendencia entre algunas especies, que son muy cercanas; y en los diferentes sistemas de determinación sexual que existen entre estas especies, pudiendo producir descendencia masculina (Bartley *et al.*, 2000).

La convergencia de los sistemas XX/XY como el caso de *O. niloticus*, y WW/WZ en *O. aureus* y *O. variabilis*, pueden llegar a producir una descendencia completamente de machos cuando se cruza la hembra de *O. niloticus* y el macho de cualquiera de las dos especies. Su cruce produce híbridos XW, que fenotípicamente se expresan con machos (Beardmore *et al.*, 2001).

El híbrido de la especie nilótica con la azul, es el más apetecido comercialmente, y en ciertos lugares se ha llegado a obtener un porcentaje muy alto de machos. Sin embargo, en su mayoría presentan resultados inconsistentes, que van desde un 59% a un 85% de machos, haciendo muy difícil su utilización en grandes cultivos (Pruginin *et al.*, 1975).

Aunque el híbrido entre la *O. niloticus* y *O. variabilis*, es mucho más efectivo para obtener machos en un porcentaje cercano al 100%, este híbrido es poco apetecido comercialmente, por lo cual no se ha llegado a expandir (Wohlfarth, 1994).

Además muchos productores prefieren a la especie nilótica pura, ya que presenta cualidades importantes para el cultivo, que disminuyen con la mezcla de especies (Beardmore *et al.*, 2001).

➤ **Producción de tilapias genéticamente machos o GMT®**

Esta es una de las tecnologías más aplicadas para obtener cultivos de solo machos, desarrollada para disminuir el impacto ambiental por la utilización de hormonas (Fishgen, 2005). Esta tecnología se basa en la suposición en que una especie tiene un sistema de determinación sexual XX/XY (macho heterogamético), esto permite el desarrollo de machos con carga YY que pueden producir en teoría una descendencia de solo machos (Mair *et al.*, 1995).

Para el desarrollo de líneas de machos YY se debe realizar una serie de cruzas con individuos revertidos, y junto con el análisis de progenie hasta lograr una línea pura de machos YY. La manera básica para el desarrollo de estos machos se presenta en la figura 6.

El desarrollo de esta tecnología tomó 8 años y fue realizada en el Departamento de Reino Unido para el Programa de Desarrollo Internacional en Investigaciones Genéticas de Peces, mostrando ser una tecnología reproducible (Beardmore *et al.*, 2001).

Esta tecnología ha demostrado ser comercialmente aplicable para la obtención de cultivos monosexuales. Sin embargo los supuestos supermachos suelen producir progenies entre 67 al 100% de machos, dependiendo de las condiciones ambientales, además que se necesita un producción constante de reproductores YY y un alto control, lo que resulta muy complicado a gran escala (Mair *et al.*, 1997).

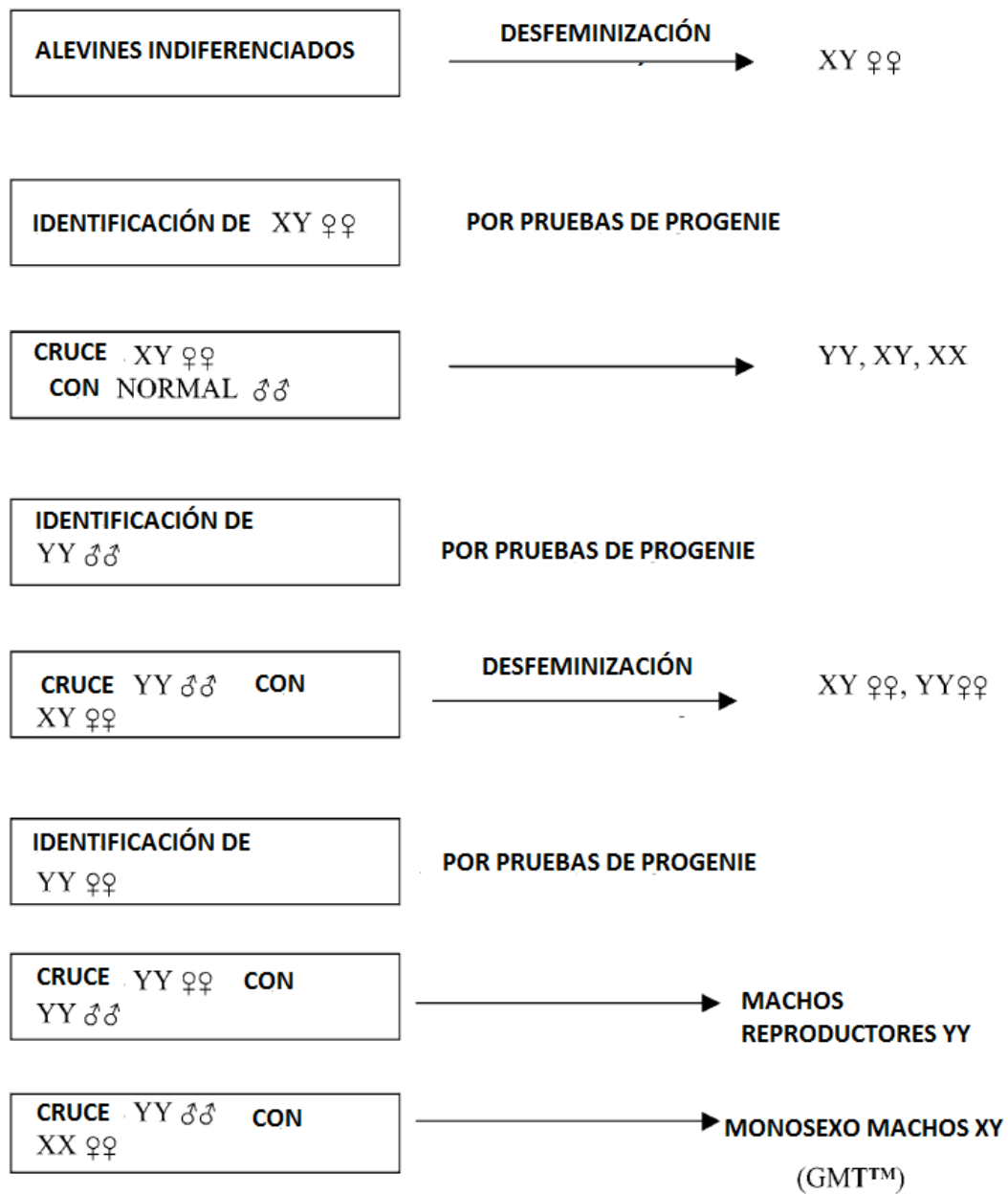


Figura 6. Procedimiento general para el desarrollo de machos YY y machos GMT® (Beardmore *et al.*, 2001).

1.4.5. Marcadores moleculares y su aplicación en el estudio de la determinación sexual en tilapia

1.4.5.1. Marcadores moleculares de DNA

Los marcadores moleculares, en específico los basados en DNA, pueden ser regiones codificantes del DNA (genes), aunque en su mayoría son segmentos de DNA no codificantes con patrones de herencia que pueden ser determinados, con un alto número de polimorfismos y que pueden ser asociados a características de interés. Estos marcadores están basados en técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y/o análisis de DNA como hibridaciones, electroforesis, digestiones con enzimas de restricción, entre otras (Solís & Andrade, 2005).

Estos tipos de marcadores son muy utilizados en el estudio de la genética de poblaciones, debido a que pueden presentar una alta variedad de polimorfismos. Aunque hay aplicaciones de detección y cuantificación de características específica que utilizan marcadores de DNA sin interés en su polimorfismo (Malacinski, 2005).

De acuerdo a Okumuş & Çiftci (2003) los tipos de marcadores más utilizados son:

- Marcadores de Genes Específicos, por ejemplo SRY.
- Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs, Restriction Fragment Length Polymorphism)
- Polimorfismos de Amplificaciones al Azar del DNA (RAPDs, Randomly Amplified Polymorphic DNA)
- Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs, Amplified Fragment Length Polymorphism)
- Polimorfismos de un Nucleótido (SNPs, Single Nucleotide Polymorphism)

- Marcadores de Variación en el número de secuencias repetitivas (Variable number tandem repeats o VNTRs)

Los VNTRs son marcadores que se basan en que a lo largo de todo el genoma hay repeticiones periódicas de secuencias de 2 a 65 pares de bases distribuidas al azar. Las cuales en su mayoría se encuentran en sitios no codificantes del genoma y debido a su naturaleza repetitiva conlleva a errores en la duplicación del DNA, por lo general inserciones de más repeticiones, que generan una amplia gama de polimorfismos.

Estos polimorfismos pueden ser detectados por PCR con primers que flanqueen la sección repetitiva y su longitud puede ser analizada por técnicas de electroforesis de alta resolución. Estos tipos de marcadores son codominantes, es decir se puede distinguir entre homocigotos y heterocigotos, y su herencia es del tipo mendeliana muy fácil de darles seguimiento. Sin embargo el principal problema radica en la necesidad del conocimiento del genoma, para la detección de este tipo de marcadores (Solís & Andrade, 2005).

Hay dos tipos de estos marcadores: los minisatélites y los microsatélites. Los minisatélites son repeticiones de entre 9 a 65 bp, sin embargo su uso no es amplio debido a la poca reproductibilidad de los resultados. Por el contrario los microsatélites, SSR (Single Sequence Repeats) o STR (Short Tandem Repeats); son repeticiones de entre 2 a 8 bp, por lo general son repeticiones de 2 bp en una secuencia GC periódica. Este tipo de marcadores se encuentran distribuidos en todo el genoma y han mostrado ser muy útiles en los estudios genéticos, por lo cual en la actualidad son los marcadores más utilizados (Malacinski, 2005).

1.4.5.2. Marcadores usados en estudios de la determinación del sexo en peces

Para las especies acuícolas, tres tipos de marcadores polimórficos son los más utilizados: AFLPs, SSRs o microsatélites y SNPs. El valor de cada tipo de marcador depende del objetivo del estudio, el costo de la genotipificación

y el nivel de información, es decir, la cantidad de diferentes alelos que estén presentes en la población, en el locus marcador y la frecuencia de estos alelos (Okumuş & Çiftci, 2003).

Los marcadores moleculares pueden desempeñar un papel vital para localizar genes que actúen como interruptores maestros en la determinación sexual. A diferencia de los seres humanos y otros mamíferos, donde el inductor maestro del sexo en el macho lo determina del gen SRY, ninguno ha sido identificado en peces u otros vertebrados no mamíferos (Khan, 2011).

Matsuda *et al.* (2002) describió un gen candidato como regulador maestro determinante del sexo en el pez medaka (*Oryzias latipes*). La determinación del sexo en esta especie implica machos heterogaméticos. A diferencia de los cromosomas sexuales humanos, en medaka no hay diferencia citogenética visible entre el cromosoma X y el cromosoma Y, y el emparejamiento X-Y se produce a lo largo de casi toda la longitud del cromosoma.

Esto sugiere que la región determina del sexo masculino en el cromosoma Y debe ser relativamente pequeña. Encontrándose en esta el gen DMY, que se expresa exclusivamente en los embriones XY, presente en el cromosoma Y, pero no en el cromosoma X. El gen DMY también se ha encontrado en *O. curvinotus* (especies estrechamente relacionadas a medaka) (Kondo *et al.*, 2003).

Se ha obtenido evidencia del papel clave en la diferenciación sexual en el macho del gen DMY, en base a estudios sobre la pérdida y ganancia de esta función. Por lo tanto, la desactivación del DMY resulta en la iniciación del desarrollo femenino en los machos genéticos del pez medaka (Paul-Prasanth *et al.*, 2006), mientras que la activación del DMY indujo el desarrollo masculino en hembras genéticas (Matsuda *et al.*, 2007).

Sin embargo, la presencia de algunos machos XX espontáneos, sugieren la presencia de modificadores autosómicos en la determinación sexual (Nanda *et al.*, 2003), por lo cual el gen DMY no siempre es esencial para el desarrollo masculino, pudiendo estar en el proceso de sustitución por otro gen

maestro derivado los modificadores autosómicos (Takehana *et al.*, 2007). Tales modificadores son normalmente raros, ubicados locis autosómicos y cuales pueden influir o anular la actividad del gen maestro del sexo en los cromosomas sexuales (Penman & Piferrer, 2008).

Actualmente en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) también se ha identificado un gen presente exclusivamente en machos, el gen *sdY*. La inactivación de este gen en machos induce la diferenciación ovárica, mientras que la sobre expresión de este usando transgénesis aditiva en hembras induce la diferenciación testicular (Yano *et al.*, 2012).

En los peces cebra o en el pez globo, ningún gen principal o marcadores ligados al sexo han sido identificados, a pesar de ser especies muy estudiadas (Charlesworth & Mank, 2010).

Los marcadores específicos de sexo o marcadores ligados al sexo son útiles para reducir el tiempo y esfuerzo involucrados en las pruebas de progenie. Por ejemplo, la identificación de neomachos XX por la ausencia de un marcador de ADN específico para Y (Devlin, McNeil, Solar, & Donaldson, 1994). Sin embargo, es probable que en la mayoría de casos, sólo una proporción muy pequeña del genoma será específica de un sexo o fuertemente ligada al sexo, lo que hace muy difícil su identificación (Khan, 2011).

1.4.5.3. Mapeo genético de tilapia y la ligación con el sexo.

Como la mayoría de las características de rendimiento y producción son controlados por múltiples genes y por lo tanto, estas características pueden ser asociadas a marcadores moleculares (QTLs), convirtiéndose en una parte muy importante de la genética y la genómica en la acuicultura (Liu & Cordes, 2004)

Los QTL son locus que pueden estar ligados a características de interés de cualquier actividad. Por ejemplo para los acuicultores buscan locus

asociados a la tasa de crecimiento o resistencia a enfermedades (Miles & Wayne, 2008).

Para iniciar la búsqueda de QTLs de interés es necesaria la construcción de un mapa genético. Los mapas genéticos son construidos mediante el posicionamiento de marcadores de ADN polimórficos (microsatélites, SNP, o AFLP) de acuerdo a la forma en que estos se segregan. Esto requiere dos elementos: marcadores de ADN polimórficos y familias de individuos en que estos marcadores se puedan segregan (Khan, 2011).

Una vez que un mapa de ligamiento ha sido construido para una especie determinada, puede ser utilizado en combinación con estudios de crianza y evaluación de rasgos cuantitativos para identificar marcadores que estén estrechamente relacionados a QTLs de interés. Esta información puede a continuación, usarse para la selección individuos con ciertas características dentro de una población o algún otro rasgo deseable a través de la selección asistida por marcadores (MAS) (Khan, 2011).

Sin embargo uno de los problemas que presenta la aplicación de la acuicultura es que de los recursos necesarios para localizar QTL con precisión, como mapas ligación densos, aún no están disponibles para muchas especies (Martínez, 2007).

Mapas genéticos están disponibles para algunas especies de cultivo, por ejemplo, tilapia, pez gato, camarón, langostino, curuma, platija japonesa, trucha arco iris, carpa, lubina, besugo y salmón del Atlántico. A pesar de esto, la densidad de estos mapas genéticos es muy baja y la busca de QTLs de interés solo se ha desarrollado en tiempos recientes (Khan, 2011). En tilapia, los mapas de ligamiento también se han desarrollados, utilizando diferentes enfoques de mapeo. A continuación se tratará sobre los mapas de ligación, existentes y sus marcadores relacionados con el sexo (Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005).

➤ **Mapas de primera generación en tilapia**

El primer intento exhaustivo para mapear el genoma de tilapia fue desarrollado por Kocher *et al.* (1998), realizando una segregación de 62 microsatélites y 112 marcadores AFLP en 41 haploides embriones procedentes de una sola hembra de *O. niloticus*. El mapa consistió en 30 grupos de ligamiento abarcando 704 cM y una longitud total de mapa estimada de aproximadamente 1.200 cM. De igual manera McConnell *et al.* (2000), construyó un mapa genético parcial utilizando 49 crías de un retro cruzamiento (macho *O. niloticus* × *O. aureus*, cruzado con una hembra *O. niloticus*). El mapa de ligamiento del macho *O. aureus* comprendía 28 marcadores y 10 grupos de ligamiento, cubriendo 213 cM, y un mapa más pequeño de la hembra *O. niloticus* que comprende 9 marcadores y cuatro grupos de ligamiento, cubriendo 41 cM.

➤ **Mapa de segunda generación en tilapia**

Una segunda generación de mapas de ligación para tilapia, de la progenie (F₂) de un cruzamiento interespecífico entre *O. aureus* y *O. niloticus* fue construido junto con el desarrollo de microsatélites. Este mapa contiene 525 microsatélites y basado en 21 marcadores de genes. Con una extensión de 1,311 cM, y un promedio de espaciamiento entre marcadores de 2,4 cM. Los marcadores están vinculados en 24 grupos de ligamiento (LGs), 22 grandes y dos pequeños (ahora 23 LGs) (Lee *et al.*, 2005; Shirak *et al.*, 2006). Los vínculos y la orden de los marcadores en este mapa son en gran parte congruente con los mapas de ligamiento anteriormente desarrollados en tilapia (Khan, 2011).

Este mapa de ligación del genoma de tilapia es uno de los más extensos en especies acuícolas. Este mapa se basa en gran medida en microsatélites supuestamente con alto polimorfismo y por lo tanto informativo en la mayoría cruces. La distribución de la recombinación a lo largo de los grupos de ligamiento puede ser muy diferente entre machos y hembras, lo que sugiere que la tilapia tiene un patrón específico de recombinación del sexo.

Aunque los niveles totales de recombinación son prácticamente idénticos, la ligación interna es a menudo mayor en las hembras, mientras que en las zonas terminales es a menudo mayor en los machos. Este mapa proporciona la infraestructura para la detección de QTLs, como ya se ha demostrado en varios estudios (Lee et al, 2003, 2004, 2005.; Cnaani *et al.*, 2004, 2008).

Marcadores ligados al sexo se han identificado sobre este mapa de ligamiento. Lee *et al.* (2003) identificó una zona en LG1, de 10 cM comprendida entre los marcadores GM201 y UNH104, donde marcadores como UNH995 y UNH104 estaban estrechamente ligados al sexo en 95% de los individuos de dos de cada tres familias de *O. niloticus*, sin embargo en la tercera familia, los marcadores no se segregaron para el mismo haplotipo Y, planteándose la idea de que se influyen otros locus autosómicos.

Además en esta zona de ligamiento se ha encontrado un gen relacionado con la determinación sexual en mamíferos, que es un posible candidato como regulador maestro del sexo. Lee & Kocher (2007) identificó al gen WT1b a 32.4 cM en el LG1, en cual está flanqueado por los marcadores GM201 y UNH995. Este gen cumple un rol importante en la diferenciación gonadal en mamíferos y es un supuesto regulador del sexo en otros vertebrados, sin embargo no se encontró una evidencia contundente para ser un regulador maestro.

Recientemente en los trabajos realizados por Eshel *et al.*, (2011, 2012) se encontró una fuerte ligación con el sexo en LG23 en *O. niloticus*. En donde se ha identificado alelos para el microsatélite UNH898 que están altamente relacionados con los machos en poblaciones mixtas de esta especie. Este alelo fue encontrado en el 98,6% de los machos, pudiendo predecir la carga cromosomal por MAS. Además se identificó al gen amh (hormona anti-mülleriana) a 1cM de distancia de UNH898 (D'Cotta *et al.*, 2007).

1.5. Hipótesis de la Investigación

El genotipo sexual está altamente ligado a uno de los microsatélites estudiados y puede predecirlo con una alta confianza.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto fue financiado por la empresa de producción de alevines con tecnología de supermachos, Aquatilgen Cía Ltda., en cooperación con la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, específicamente el Laboratorio de Recursos Bioacuáticos. Con el objetivo de acelerar la identificación de individuos YY como reproductores, mediante una tecnología más rápida, como lo es los microsátélites, para de esta manera evitar el desperdicio de recursos y tiempo en pruebas de progenies.

2.1. Ubicación geográfica del lugar de investigación

El presente proyecto se realizó en dos ubicaciones diferentes, las cuales se mencionan a continuación.

- El muestreo se realizó en la población de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) presente en las piscinas de la empresa Aquatilgen Cía. Ltda.; ubicada en la provincia de Sucumbíos, cantón Lago Agrio, parroquia Nueva Loja, vía a Colombia Km. 3. Coordenadas geográficas: 0° 6' 34" latitud norte y 76° 52' 36.5" longitud oeste; a 305 m.s.n.m.

En esta zona se realizó la selección de los especímenes, las pruebas de progenie de los individuos seleccionados y la toma de muestra. Además en este lugar se mantendrá vivos a los especímenes.

- Los análisis de laboratorio correspondientes a la tecnología de microsátélites, como son: extracción de DNA, cuantificación de DNA, PCR convencional, electroforesis, entre otras. Se realizó en el Laboratorio de Recursos Bioacuáticos, perteneciente a la carrera de Ingeniería Agropecuaria, de la Universidad de las Fuerzas Armadas; ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia Sangolquí, barrio San Fernando, hacienda el Prado (IASA I). Coordenadas geográficas 0° 23' 4" latitud sur y 78° 24' 51" longitud oeste; a 2726 m.s.n.m.

2.2. Especímenes de estudio

En este proyecto se utilizó 100 especímenes de Tilapia del Nilo (*O. niloticus*) (30 hembras, 30 supermachos y 40 machos normales). El genotipo sexual de cada uno (XX, YY y XY respectivamente) fue confirmado por pruebas de progenie con anterioridad por la empresa mencionada.

Los especímenes pertenecen de la línea genética GIFT (por sus siglas en inglés, Genetical Improved Farmed Tilapia), y fueron marcados con un arete metálico colocado en el opérculo branquial con el número de identificación de dos dígitos y agrupado con animales del mismo genotipo sexual para evitar confusiones.

2.3. Procedimientos

2.3.1. Recolección de muestra biológica

Debido al valor económico que representan los reproductores YY, fue de suma importancia realizar la toma de muestras biológicas de la manera menos invasiva, con el objetivo de causar el menor daño posible y evitar cualquier problema de salud posterior, que le conlleve a una posible muerte del espécimen. Por lo cual se utilizó un corte de aproximadamente 1 centímetro de largo de aleta pélvica.

Para extraer la muestra se anestesió a los peces por inmersión en una solución con 0,1 mL de eugenol por cada litro de agua durante dos minutos o hasta observar que los animales pierdan el equilibrio (Vidal *et al.*, 2008). Una vez anestesiados se los sacó de la solución, se procedió a secar la zona de la aleta pectoral con toallas de papel y desinfectar la aleta con povidona yodada (Khan, 2011). Finalmente con una pinza y tijeras de disección se realizó el corte en la punta de la aleta, la cual fue colocada en microtubos de 2 mL con alcohol absoluto y rotulado con el número de arete de identificación así como su genotipo sexual (Lopera *et al.*, 2008).

2.3.2. Transporte y almacenamiento de la muestra biológica

Las muestras fueron conservadas en alcohol absoluto y fueron almacenadas a -20 °C después de su recolección hasta su transporte, el cual se lo realizó en una hilera con geles refrigerantes, mantenidos así durante 24 horas hasta su llegada al laboratorio. Una vez aquí se las almacenó a -20 °C hasta su utilización (Lopera *et al.*, 2008).

2.3.3. Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico a partir de las muestras de aleta se utilizó el PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA, Cat.No. K1820-02); siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, adaptando la lisis de muestras de tejido animal, al usar 25 mg de aleta finamente cortada y seca, con una digestión durante 4 horas. Finalmente se eluyó el DNA de la columna de sílica con 150 uL de buffer de elución (TE 1X) y se conservó a -20 °C. En el anexo A se muestra el procedimiento sugerido por el fabricante.

2.3.4. Evaluación del DNA obtenido.

Para evaluar la calidad de la extracción se realizó una cuantificación del DNA obtenido, así como un análisis de la pureza del DNA.

La cuantificación de DNA fue realizada con el Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, USA, Cat. No. Q32850), el cual contiene un fluorocromo específico para DNA de doble cadena, cuya fluorescencia fue detectada por el fluorómetro Qubit® 1.0 (Invitrogen, USA). Se utilizó 10 uL de muestra de DNA para el procedimiento de cuantificación seguido por el manual provisto por el kit.

Para notar la presencia de contaminantes en la muestra (en especial RNA), así como verificar la integridad del DNA, se realizó una electroforesis horizontal en agarosa al 0,8% (Sharma, 2008), con bromuro de etidio al 0,05 ug/mL añadido durante la preparación. Las muestras fueron cargadas con 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen, USA) a una concentración final de 2X; y corridas a 120 V durante 45 minutos en TBE 1X (0,1 M Tris, 0,09 M ácido

bórico y 0,001 M EDTA). Además se cargó un marcador de peso molecular Axygen® 1 Kb ladder DNA (Corning, USA) y un control negativo que contiene solo el buffer de elución.

El gel fue revelado con el transiluminador UVP® 3UV™ a una longitud de onda de 302 nm y la imagen fue obtenida por el sistema de documentación MicroDOC Basic (Clever Scientific Ltda., USA). Esta imagen fue modificada por el software ImageJ 1.4 R para mejorar la calidad de la misma.

Para obtener un índice de la contaminación proteica se realizó un análisis de relación entre las absorbancias a 260/280 nm, en el espectrómetro μ Quant™ (BioTek Instruments Inc., USA) en microplacas Corning® ClearPro™ 96 well (Corning, USA). Se realizó una dilución de la muestra 1:10, en cada pocillo, con TE 1X (10 mM de Tris pH 8.0 y 1 mM de EDTA) y la lectura se la realizó mediante el programa automatizado Purity DNA del software acoplado al equipo KCjunior™.

2.3.5. Genotipaje

La técnica de genotipaje usada en esta investigación fue para “secuencias de repeticiones simples” (SSRs, por sus siglas en inglés), también llamados microsatélites. Esta técnica comprende la selección de microsatélites y primers, amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), análisis de los fragmentos amplificados y obtención e identificación de los genotipos.

2.3.5.1. Selección de microsatélites

Según estudios realizados acerca de marcadores relacionados al sexo en tilapia, se destacan tres microsatélites los cuales presentaron una alta correlación con la segregación del sexo, y en los mismos se han descrito algunos alelos asociados a los machos (Eshel *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2003). La tabla 2 muestra el nombre del marcador, el grupo de ligación al que se encuentra asociado según el mapa de ligación propuesto por Lee *et al.*,

(2005), así como el número de acceso para el NCBI y los trabajos en los que se encontró su ligación con el sexo.

Tabla 2. Descripción de los marcadores tipo microsatélite utilizados para la identificación del genotipo sexual de la tilapia del Nilo.

Nombre	Grupo de Ligación	Núm. Acceso en NCBI	Referencias Bibliográficas
UNH995	LG1	G68274	Lee <i>et al.</i> , 2003 Khan, 2011
UNH104	LG1	G12257	Lee <i>et al.</i> , 2003 Khan, 2011
UNH898	LG23	G68215	Eshel <i>et al.</i> , 2011, 2012

Las secuencias de primers para cada marcador fueron obtenidos de los trabajos referenciados anteriormente y de la base de datos de NCBI. Los detalles, de los mismos, tal como su secuencia, tamaño, temperatura de fusión (melting temperature, Tm) se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Detalles de los marcadores tipo microsatélite empleados para la identificación del genotipo sexual de la tilapia del Nilo.

Marcador	Extremo	Secuencia	bp	Tm*
UNH995	Primer Izquierdo	CCAGCCCTCTGCATAAAGAC	20	60
	Primer Derecho	GCAGCACAACCACAGTGCTA	20	61
UNH104	Primer Izquierdo	GCAGTTATTTGTGGTCACTA	20	51
	Primer Derecho	GGTATATGTCTAACTGAAATCC	22	50
UNH898	Primer Izquierdo	GATGTCCCCACAAGGTATGAA	21	60
	Primer Derecho	TAATCCA CT CACCCCGTTTC	20	60

* Temperatura especificada por el proveedor de los oligonucleótidos (Invitrogen) a 50mM Na⁺

Los primers fueron sintetizados por la empresa biotecnológica Invitrogen, USA; enviados liofilizados y reconstruidos con agua ultra pura libre de nucleasas, a una concentración final de 10 µM.

2.3.5.2. Ensayo de PCR

Materiales y Equipos:

- Puntas de 10, 20, 200 y 1000 µL con filtro.
- Microtubos de 0,2 µL para PCR
- Gradillas

- Pipetas de 10, 20, 200 y 1000 μL
- Guantes
- Cámara de flujo laminar
- Termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Alemania)

Reactivos:

- Platinum®Taq Polimerasa (Invitrogen USA)
- Buffer 10X para PCR sin MgCl_2 (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl)
- Cloruro de Magnesio (MgCl_2) 50 mM.
- Mix de dNTPs 10 mM (Invitrogen, USA)
- Agua ultra pura o grado PCR, libre de nucleasas
- Primers.

Procedimiento:

El protocolo usado fue sugerido por Khan (2011), donde se tomó como referencia las concentraciones de los reactivos para la reacción de PCR. El volumen utilizado para cada reacción fue calculado para un volumen final de 20 μL . La cantidad de DNA utilizado fue sugerido por Surzycki (2000), para DNA de células animales, y el volumen utilizado de este DNA se calculó a partir de los resultados de la cuantificación. Las concentraciones y volúmenes de cada componente utilizado se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Concentración y volúmenes usados para la PCR de los microsatélites seleccionados.

Soluciones Stock	Concentración por Reacción	Volumen para 20 µL
<i>Taq DNA Polymerase</i>	1X	2 µL
<i>PCR buffer 10X</i>		
50 mM MgCl ₂	1,5 mM	0,6 µL
10 mM dNTPs	0,2 mM	0,4 µL
10 µM Primer L	0,3 µM	0,6 µL
10 µM Primer R	0,3 µM	0,6 µL
5 U/µL Platinum®Taq Polimerasa	0,05 U/µL	0,2 µL
Agua Grado PCR	-	14,6 µL
DNA	~50 ng	1 µL

Las reacciones se prepararon en una solución madre con todos los reactivos excepto el DNA, con sus volúmenes calculados para el número de reacciones a realizarse y un control de reactivos, con el fin de evitar errores en el pipeteo. Una vez repartida la solución madre para cada reacción se procede a colocar el DNA de cada muestra y para el control de reactivos se le añadió agua ultra pura en la misma cantidad de DNA (Sharma, 2008).

Las condiciones de la reacción fueron adaptadas a partir de los ensayos realizados por Khan (2011), junto con los datos provistos por el proveedor de los primers. Estas condiciones se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones para la amplificación por PCR de los microsatélites seleccionados.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94 °C	14 min	1
Denaturación	94 °C	1 min	
	UNH104 → 47 °C		
Hibridación	UNH898 → 59 °C	1 min	35
	UNH995 → 59 °C		
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	20 min	1

2.3.5.3. Validación de la PCR

El producto de la PCR fue validado por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio al 0,05 ug/mL añadido durante la preparación (Sharma, 2008). Las muestras fueron cargadas con 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen, USA) a una concentración final de 2X; y corridas a 100 V durante 1 hora, junto el marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, USA).

Los geles fueron revelados y fotografiados, para observar si existió amplificación y la ausencia de contaminación. Las imágenes de los geles fueron modificadas por el Software Bioinformático ImageJ 1.4 R (National Institute of Health, USA), exportado en formato Tiff y finalmente analizado en el Software Bioinformático Quantity One™ (BioRad, USA), para determinar el tamaño de banda en el que se encuentran.

2.3.5.4. Análisis de los productos de PCR

Para detectar alelos y la variación de tamaño de estos, se adaptó los protocolos propuestos por Ausubel (2002) para el análisis de pequeños fragmentos de DNA en geles de poliacrilamida con alta resolución y así detectar pequeñas variaciones en el tamaño de los alelos. Por lo cual se realizó para cada marcador una electroforesis vertical en geles no denaturantes de poliacrilamida al 6 % (6 % de Acrilamida:Bisacrilamida 29:1, TBE 1X).

Se cargaron muestras con BlueJuice™ a una concentración de 1X, y en los pasillos cercanos a los extremos del gel se cargó el marcador de peso molecular de 25 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA) a cada lado del gel, aunque se evitó cargar las muestras como el marcador en los pasillos de los extremos, evitando retrasos en la migración en estos carriles.

Una vez cargadas las muestras se corrió el gel a 100V por 10 horas en TBE 1X, en el equipos de geles duales de C.B.S. Scientifics, USA; evitando la exposición del gel a la luz durante la corrida.

Finalmente se tiñó el gel por inmersión de 5 a 10 en una solución de 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio en agua destilada, seguida de un lavado con agua destilada por 10 a 30 min (Ausubel, 2002). Luego se revelaron los geles en el transiluminador y se obtuvo las fotografías de cada uno.

2.3.5.5. Análisis de geles, determinación del tamaño de los alelos e identificación de los genotipos.

Las fotografías de los geles fueron convertidas a una resolución de 8 bits en blanco y negro, con inversión coloración, y ajuste en el contraste y brillo para dar una mejor definición en las bandas; realizado en el software bioinformático ImageJ 1.4 R (National Institute of Health, USA), y exportado en formato Tiff.

Luego se procedió a analizar las imágenes en el Software Bioinformático Quantity One™ (BioRad, USA), en donde se realizó una detección de las bandas y la determinación del tamaño de los alelos, y una obtención de genotipos de cada una de las muestras. Todos estos datos fueron tabulados para el análisis de datos.

2.4. Análisis de datos

2.4.1.1. Evaluación de la Extracción de DNA

Como se mencionó la evaluación del DNA posee dos factores cuantificables: la concentración de DNA y el radio de pureza de DNA (260/280 nm). Esta evaluación se realizó en 50 extracciones de DNA del total de las muestras, tomadas al azar.

También se tabuló el peso inicial de cada muestra, para que junto con la concentración del DNA y el volumen de elución, obtengamos la tasa de recuperación de DNA, que muestra la cantidad de DNA obtenido por la cantidad de tejido usada en la extracción. La fórmula para calcular la tasa de recuperación del DNA es:

$$\text{Recuperación de DNA} = \frac{\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \text{ de DNA obtenido}}{\text{mg de muestra}} \times \mu\text{L del buffer de elución}$$

Todos estos valores obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva, obteniéndose la media, la desviación estándar, los valores máximos y mínimos, y la moda. Todo este análisis fue realizado en el software InfoStat.

2.4.1.2. Frecuencias alélicas y genotípicas

Los alelos obtenidos así como el genotipo derivado de estos, fueron analizados mediante tablas de frecuencias y gráficos de frecuencia en la población total. Además este análisis también se lo categorizó de acuerdo a su presencia en machos y hembras en la población, para así observar alelos asociados a los cromosomas.

2.4.1.3. Dependencia entre el genotipo sexual y el genotipo de los marcadores

Para medir el grado de relación entre el genotipo obtenido por los marcadores moleculares y el genotipo sexual, se realizó una prueba de independencia entre variables con datos categóricos, la cual está basada en el estadístico de prueba Chi Cuadrado, en donde se evalúa si la categorización de una variable depende de la categoría de otra variable.

Los valores obtenidos para este análisis se distribuyen en una tabla de contingencia con “r” renglones y “c” columnas, por lo cual se denomina una tabla $r \times c$. Los totales de cada columna y cada fila se los denomina frecuencias marginales y sirven para calcular las frecuencias esperadas. Los valores se agrupan de acuerdo a la categoría de c y r a la que pertenece, formando una tabla con frecuencias, como se presenta a continuación:

Tabla 6. Tabla de contingencia para la evaluación de la dependencia entre dos variables. Donde F_0 es la frecuencia obtenida y F_e es la frecuencia esperada.

Variable 1	Variable 2					Frecuencias Marginales r
	Cat. 1	Cat.2	Cat. 3	...	Cat. c	
Cat. 1	$F_{011} (F_{e11})$	$F_{012} (F_{e12})$	$F_{013} (F_{e13})$...	$F_{01c} (F_{e1c})$	Total r_1
Cat. 2	$F_{021} (F_{e21})$	$F_{022} (F_{e22})$	$F_{023} (F_{e23})$...	$F_{02c} (F_{e2c})$	Total r_2
Cat. 3	$F_{031} (F_{e31})$	$F_{032} (F_{e32})$	$F_{033} (F_{e33})$...	$F_{03c} (F_{e3c})$	Total r_3
.
.
.
Cat. r	$F_{0r1} (F_{er1})$	$F_{0r2} (F_{er2})$	$F_{0r3} (F_{er3})$...	$F_{0rc} (F_{erc})$	Total r_r
Frecuencias Marginales c	Total c_1	Total c_2	Total c_3	...	Total c_c	Gran Total

De esta categorización se derivan dos hipótesis generales:

- Hipótesis nula, H_0 , donde las variables son independientes entre sí.
- Hipótesis alternativa, H_A , donde las variables dependientes entre sí.

La decisión de aceptar o rechazar la hipótesis nula, se basa en que tan buen ajuste se tenga entre las frecuencias esperadas para cada celda. Para encontrar estas frecuencias esperadas se aplica la siguiente fórmula:

$$F_{e_{ij}} = \frac{(\text{Total de la columna } i) \times (\text{Total del reglón } j)}{\text{Gran Total}}$$

$$\text{Donde } i=1,2,3,\dots,c \quad \text{y} \quad j=1,2,3,\dots,r$$

Los valores obtenidos de las frecuencias esperadas por convención, se los colocará entre paréntesis junto a las frecuencias observadas.

Para analizar el ajuste entre estas dos frecuencias se aplicó la fórmula de la prueba Chi Cuadrado:

$$\chi^2 = \sum_{ij}^{cr} \frac{(F_{0_{ij}} - F_{e_{ij}})^2}{F_{e_{ij}}}, \quad \text{donde } i=1,2,3,\dots,c \quad \text{y} \quad j=1,2,3,\dots,r$$

$$\text{Si } \chi^2 > \chi_{\alpha}^2 \quad \text{con } u = (r - 1)(c - 1)$$

Donde α es el nivel de significancia asignado para la prueba, se rechaza la hipótesis nula. También se puede rechazar esta hipótesis, si el valor- p obtenido del valor chi-cuadrado es menor al valor α .

Se realizó este test de independencia Chi Cuadrado para cada marcador. Utilizando como variables el genotipo del marcador molecular dictado por la combinación de alelos de cada individuo y el genotipo sexual del individuo. Buscando el nivel de dependencia de cada marcador con el genotipo sexual. Por ello de cada análisis para cada marcador se derivan las siguientes hipótesis:

- H_0 : El marcador no está asociado al genotipo sexual en esta población.
- H_A : El marcador está asociado al genotipo sexual en esta población.

Se utilizó un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0,05$) y la decisión de rechazo de H_0 fue dictada por la diferencia entre el valor- p y α . Siendo más dependiente el marcador entre menor sea su valor- p . Este análisis fue realizado en el software InfoStat.

Finalmente el marcador con la más alta dependencia fue seleccionado para utilizarlo en el diagnóstico del genotipo sexual de los especímenes, y se procedió a evaluar su efectividad.

2.5. Evaluación de la utilidad del microsatélite seleccionado en el diagnóstico del genotipo sexual.

Para dar validez a una prueba es de suma importancia obtener un dato real acerca de lo precisa que puede ser. Por lo cual se usan los conceptos de sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

La sensibilidad, es la probabilidad de clasificar correctamente mediante un test a un individuo con una característica positiva.

La especificidad, es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo con ausencia de una característica.

Valor predictivo positivo (VPP): Es la probabilidad de poseer la característica de interés ante un resultado positivo en el test.

Valor predictivo negativo (VPN): Es la probabilidad de que un individuo con un resultado negativo en la prueba realmente no posee la característica.

Para obtener estos valores se realizó una tabla de comparación (tabla 7) entre los resultados test a evaluar frente a los individuos en los que se haya confirmado la presencia o ausencia de la característica de interés, por cualquier otro método.

Tabla 7. Tabla de comparación para la evaluación de una prueba de diagnóstico.

Resultado del test		
Presencia de la característica	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
<i>Positivo</i>	Verdaderos positivos (VP)	Falso negativo (FN)
<i>Negativo</i>	Falso positivo (FP)	Verdaderos negativos (VN)

Una vez obtenida esta tabla se calculó estos valores, utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} \quad \text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} \quad \text{VPP} = \frac{VP}{VP+FP} \quad \text{VPN} = \frac{VN}{VN+FN}$$

Se realizó este análisis en el marcador que presentó la mayor dependencia con el genotipo sexual. Y al tener tres genotipos se procedió a segmentar el análisis.

Primero se evaluó la capacidad del microsatélite para diferenciar entre machos y hembras, (genotipos XY o YY versus genotipo XX). Y posteriormente entre machos YY y machos normales (genotipo YY versus genotipo XY). Esto frente a los resultados de las pruebas de progenie.

Tanto los machos en el primer análisis como los machos YY en el segundo tuvieron la asignación positiva en las comparaciones con las pruebas de progenie, ya que es de mayor interés seleccionar estos genotipos.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1. Extracción y evaluación del DNA

La extracción de DNA de muestras de aletas de tilapia Nilo (*Oreochromis niloticus*) se realizó mediante el kit de extracción PureLink™ Genomic DNA, siguiendo el protocolo del fabricante con modificaciones en el tiempo de digestión, la preparación de la muestra y la cantidad de buffer de elución utilizado.

Para la evaluación del DNA obtenido se realizó una electroforesis horizontal en agarosa para evidenciar la presencia de DNA y contaminantes como el RNA; un ensayo de pureza por espectrofotometría, midiendo la relación de la absorbancia de 260/280 nm, para evidenciar una contaminación proteica. Y una cuantificación del DNA genómico mediante un método de fluorescencia específica con el Qubit® dsDNA BR Assay Kit.

Tanto el ensayo de pureza como la cuantificación de DNA se las realizó con 50 muestras de las totales extraídas, por cuestiones de costos.

En la electroforesis se observó una clara presencia de DNA no fragmentado, de alto peso molecular superior a los 10 Kb. Así como un ligero barrido que evidencia la presencia de contaminación (posiblemente de RNA). La intensidad de las bandas fueron ligeramente uniformes debido a la posible variación de la cantidad de muestra usada. Además se constató la ausencia de contaminación externa, al cargar el buffer de elución sin muestra (figura 7)

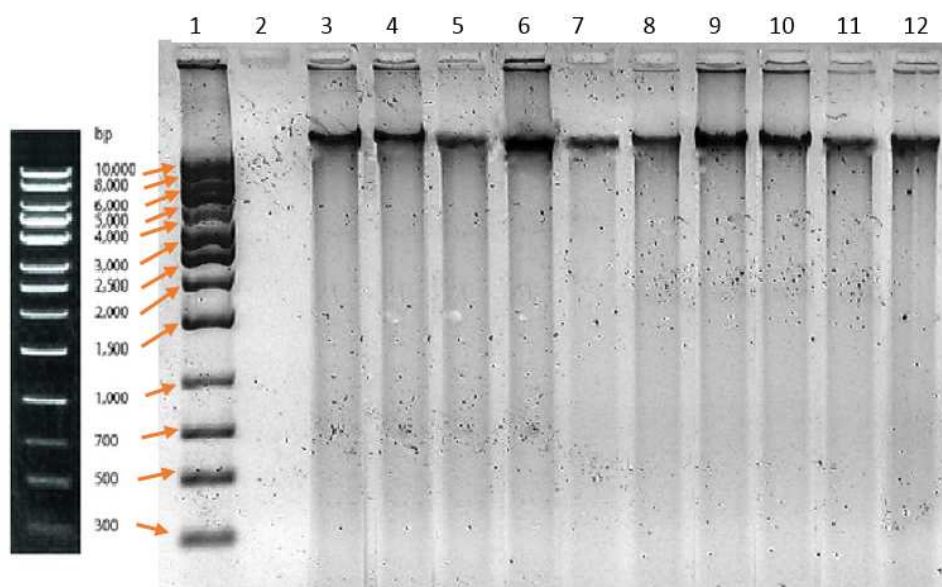


Figura 7. Muestras de DNA extraídas y corridas en un gel de agarosa. La descripción de los carriles es el siguiente: 1) Axygen® 1 Kb ladder DNA; 2) control de contaminación; 3-12) DNA extraído.

Para la cuantificación del DNA la media del peso de las muestras utilizadas fue 25,09 mg con una desviación estándar de 0,38 mg, de las cuales se obtuvo una media de 47,54 ng/ml de DNA con una desviación estándar de 13,23 ng/mL, utilizando 150 μ L de Buffer de Elución (TE 1X). La tasa de recuperación del DNA de la muestra fue de 284,38 ng de DNA por cada mg de muestra.

El radio de pureza mostró una media de 1,63 con una desviación estándar de 0,16, evidenciando la presencia de proteínas en el DNA extraído. En la siguiente tabla 8 se muestra los resultados completos de este ensayo.

Tabla 8. Resultados estadísticos de la evaluación del DNA obtenido.

Variable	Media	σ	Mínimo	Máximo	Mediana
Cantidad de muestra (mg)	25,09	0,38	24,40	25,80	24,40
Concentración de DNA en 150 μ L de TE 1X (ng/ml)	47,54	13,23	23,70	81,70	46,80
Tasa de recuperación de DNA (ng DNA/mg muestra)	284,38	80,62	143,90	500,20	276,90
Radio 260/280 nm	1,63	0,16	1,20	1,90	1,65

3.2. Validación de los primers utilizados y del ensayo de PCR

Para validar el ensayo de PCR y el correcto funcionamiento de los primers se realizó una electroforesis horizontal en geles agarosa; además que se evalúa si las condiciones para la amplificación fueron óptimas para cada primer.

La figura 8 muestra los resultados de la amplificación de cada microsatélite (UNH995, UNH898 y UNH104, de izquierda a derecha). Para cada marcador se colocó su respectivo control de contaminación preparado en la PCR. Se observa una correcta amplificación de los marcadores, encontrándose su producto dentro de los valores reportados para cada marcador y evidenciando la ausencia de productos inespecíficos y contaminación, en cada uno de los microsatélites, con las condiciones de reacción propuestas para la PCR.

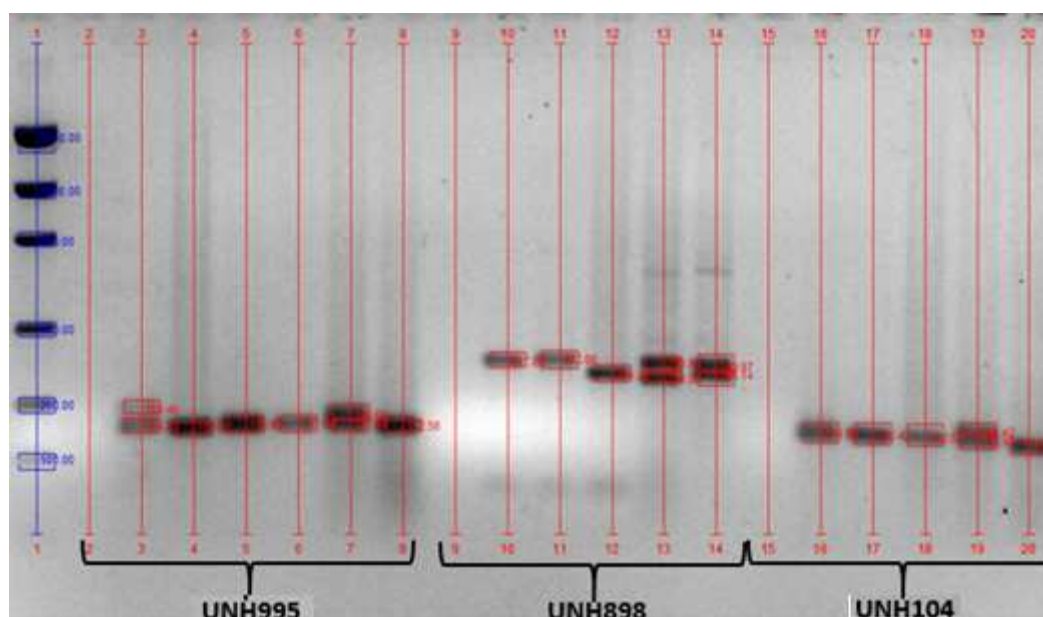


Figura 8. Electroforesis en agarosa de los productos de PCR para cada marcador. 1: Invitrogen Low DNA Mass Ladder (100bp, 200bp, 400bp, 800bp, 1000bp, 2000bp); 2, 9, 15: controles de reactivos; 3 – 8: amplificaciones UNH995; 10 – 14: amplificaciones UNH898; 16 – 20: amplificaciones UNH104.

Los marcadores mostraron diferencias de tamaño de banda entre sí. Para el marcador UNH104, se encontró fragmentos ubicados entre los 100 a 200 pares de bases, así como el marcador UNH995, con una pequeña diferencia

entre ellos. Sin embargo para el marcador UNH898 los fragmentos se ubicaron entre los 200 a 300 pares de bases.

3.3. Genotipaje y dependencia con el genotipo sexual

3.3.1. Genotipaje en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles no denaturantes de poliacrilamida mostró la presencia de bandas con diferentes tamaños para cada marcador, dentro del rango asignado para cada uno. Sin embargo en muchos de los geles se presentó un retraso en la migración de las muestras, mostrando bandas fuera de los rangos o bandas muy opacas en un solo carril. En las figuras 10, 13 y 16, se puede observar los resultados del genotipaje en los geles de poliacrilamida.

Los tamaños de los alelos fueron calculados automáticamente por el programa Quantity One™. Debido al retraso, muchos alelos similares presentan ligeras variaciones en el tamaño calculado, por lo cual se seleccionó una tolerancia del 3% de diferencia de tamaño entre alelos, por lo cual los el tamaño de los alelos identificados en el presente proyecto pueden tener una variación de ± 5 pares de bases. Además los valores de los alelos fueron aproximados a un número entero para su mayor comprensión.

3.3.2. Frecuencia alélica y genotípica

3.3.2.1. Microsatélite UNH104

En la genotipificación de los individuos con el microsatélite UNH104 se encontró la presencia de seis alelos en la población de estudio. Con tamaños de 123, 127, 131, 140, 154 y 170 pares de bases (bp) respectivamente. Siendo los alelos 127, 123 y 170 presente en mayor proporción en los machos (figura 9).

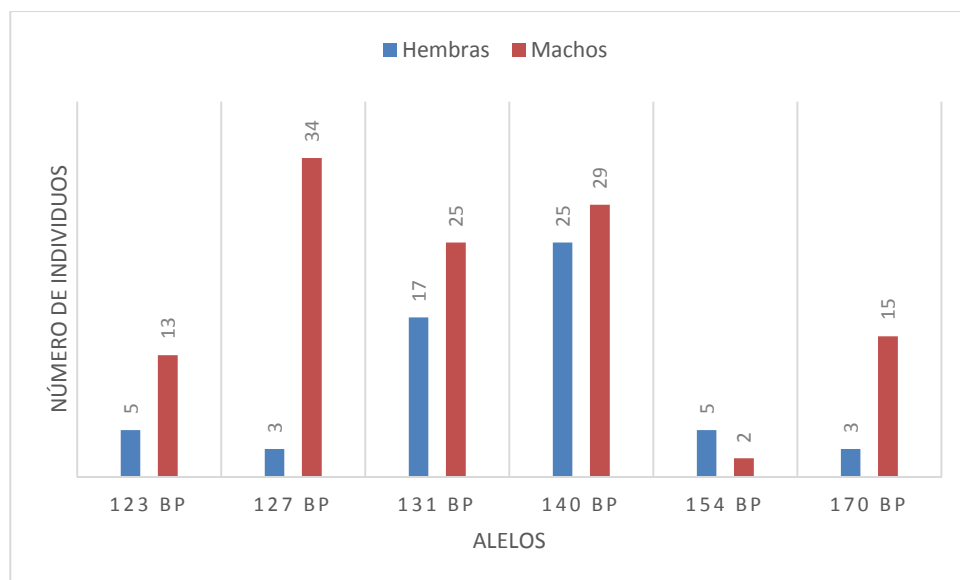


Figura 9. Frecuencias alélicas en hembras y machos en la población de estudio para el microsatélite UNH104.

Los genotipos obtenidos con este microsatélite pueden ser homocigotos o heterocigotos para los alelos obtenidos en la población. Por lo general los individuos YY son los que presentan homocigocidad para el alelo 127 (alelo #6 en la figura 10) y el alelo 123. Mientras que los individuos XY presentan una heterocigocidad del alelo 127 o 123 con uno de los alelos presentados en los individuos XX (alelos # 1 – 5 en la figura 10). Mientras que los alelos restantes pueden encontrarse en homocigocidad o heterocigocidad en los individuos XX.

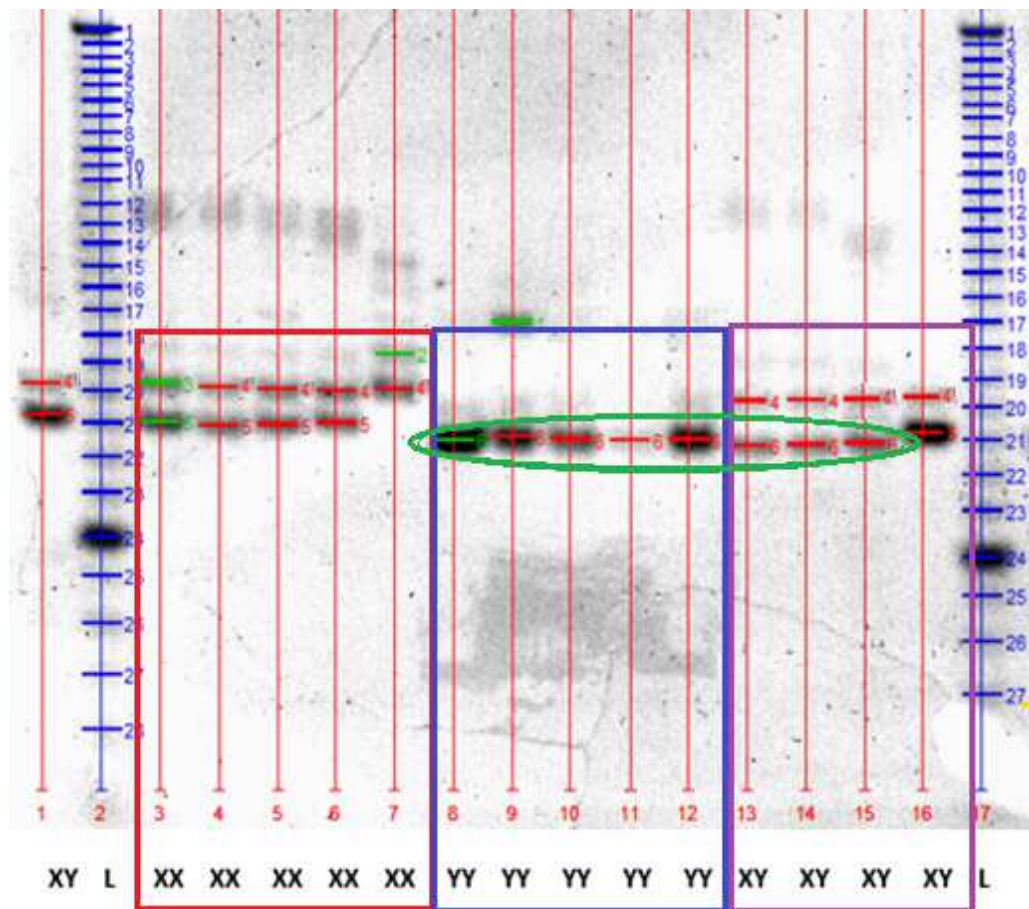


Figura 10. Diferencias entre los genotipos del marcador UNH104 presentados en individuos con distinto genotipo sexual.

Analizando las frecuencias de los genotipos alélicos encontrados en la población (figura 11 y anexo D), se puede notar de igual manera que los genotipos homocigotos $127/127$ y $123/123$ están presentes mayoritariamente en los individuos YY. Mientras que en los individuos XY es más frecuente encontrar un genotipo $127/x$ o $123/x$, y los individuos XX forman genotipos homocigotos y heterocigotos de los alelos restantes.

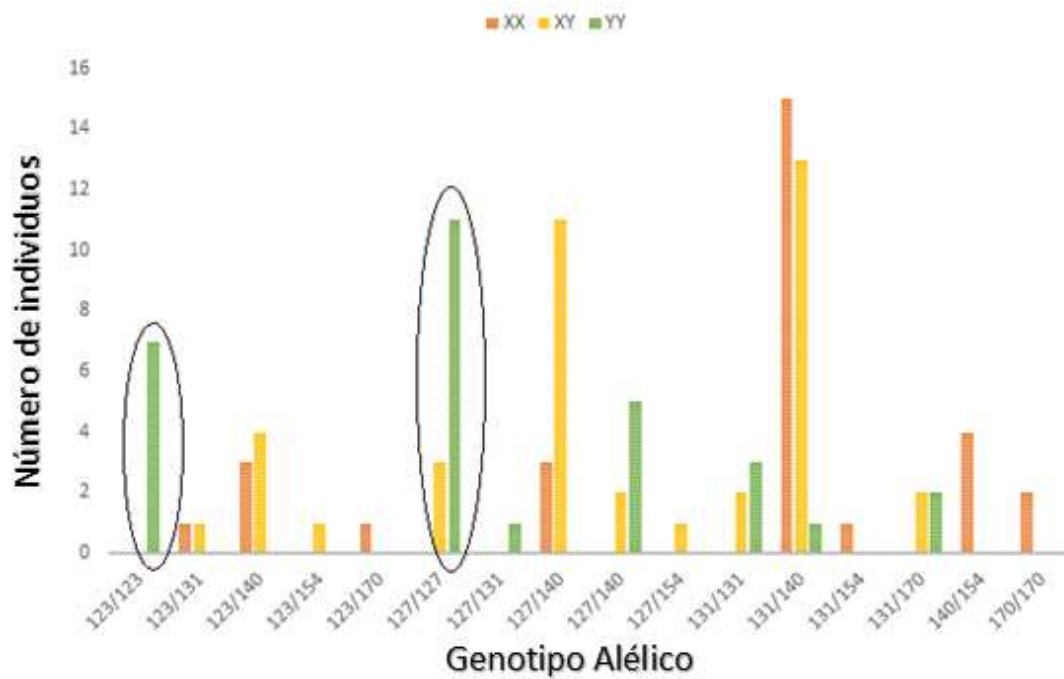


Figura 11. Frecuencia de las combinaciones alélicas encontradas para el marcador UNH104, en los diferentes genotipos sexuales. Los genotipos resaltados se presentan mayoritariamente en los individuos YY.

Estos resultados muestran una alta relación de los alelos 127 y 123 con el cromosoma Y, mientras que los demás alelos están más relacionados con el cromosoma X.

3.3.2.2. Microsatélite UNH898

En la genotipificación de los individuos con el microsatélite UNH898 se encontró la presencia de ocho alelos en la población de estudio. Con tamaños de 224, 227, 236, 245, 254, 264, 274 y 296 pares de bases (bp) respectivamente. Siendo los alelos 264 y 296 los más abundantes dentro de esta población, y además se encuentran mayoritariamente en machos (figura 12).

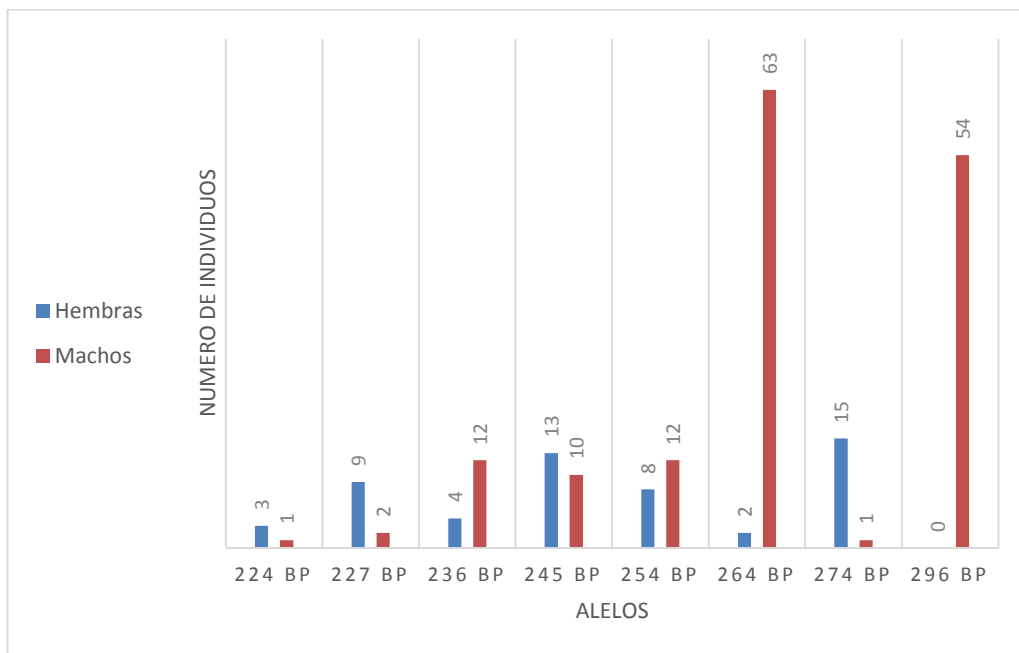


Figura 12. Frecuencias alélicas en hembras y machos en la población de estudio del microsatélite UNH898.

Los genotipos encontrados presentaron hasta tres alelos para cada individuo. Los alelos 264 y 296 (alelo # 1 y # 3, en la figura 13) aparecen generalmente ligados, formando un genotipo 264/296 en individuos YY, y un genotipo 264/296/x en los individuos XY. Los demás alelos se encuentran en homocigocidad o heterocigocidad en los individuos XX (figura 13).

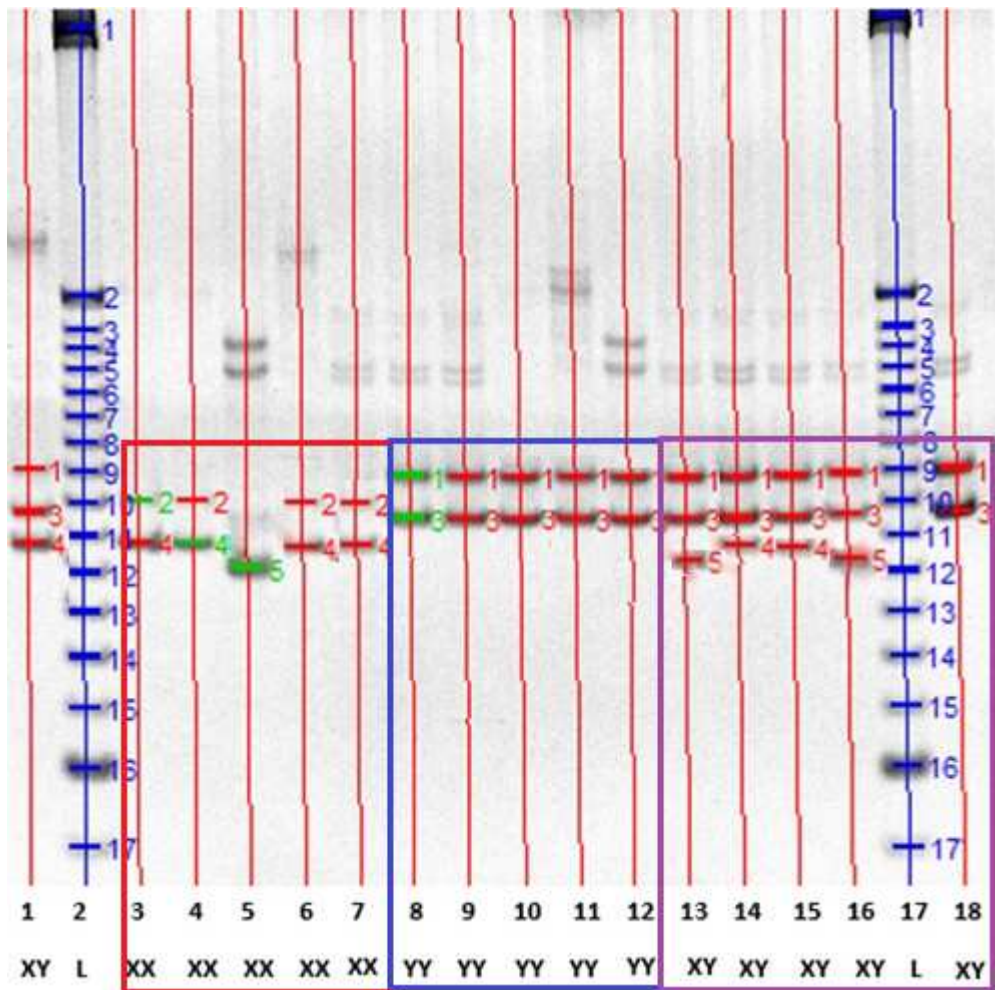


Figura 13. Diferencias entre los genotipos del marcador UNH898 presentados en individuos con distinto genotipo sexual.

De igual manera al analizar las frecuencias de los genotipos alélicos encontrados (figura 14 y anexo E), los individuos YY solo presentan el genotipo 264/296. Mientras que en los individuos XY es frecuente encontrar un genotipo 264/296/x. Los demás alelos forman distintas combinaciones en la mayoría de los individuos XX.

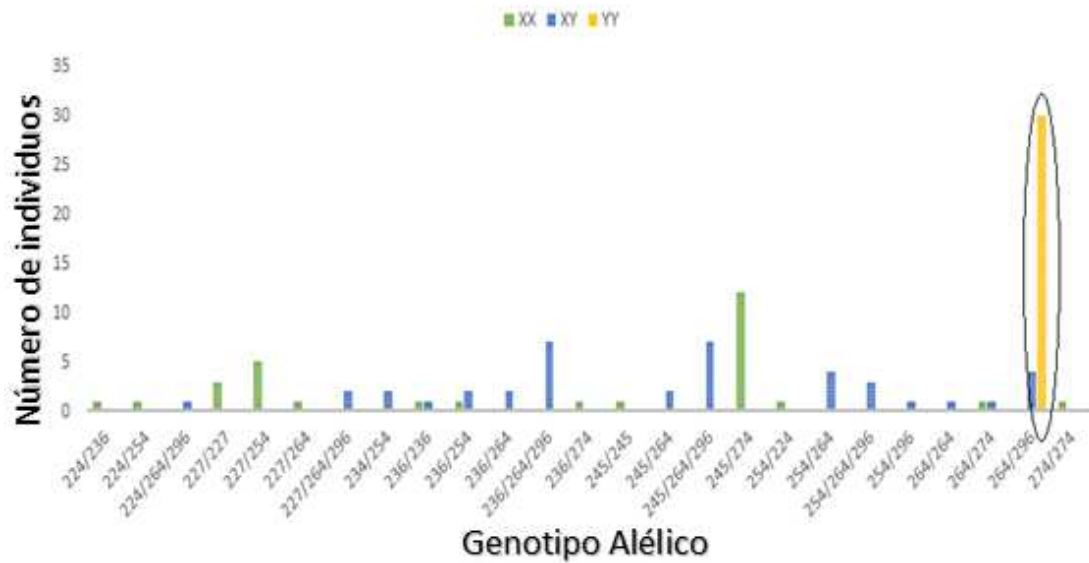


Figura 14. Frecuencia de las combinaciones alélicas encontradas para el marcador UNH898, en los diferentes genotipos sexuales. Los genotipos marcados se muestran mayoritariamente en individuos YY.

Estos resultados muestran que los alelos 264 y 296 están estrechamente relacionados con el cromosoma Y, sin embargo generalmente se presentan ligados tanto en individuos YY como en XY, lo que sugiere la existencia de una duplicación del microsatélite en cada cromosoma Y.

3.3.2.3. Microsatélite UNH 995

En la genotipificación de los individuos con el microsatélite UNH995 se encontró la presencia de cuatro alelos en la población de estudio. Con tamaños de 180, 200, 215 y 252 pares de bases (bp) respectivamente. Los alelos 182 y 200 fueron los más abundantes dentro de esta población, el alelo 200 está presente en todos los especímenes lo que indica que su segregación no se ve afectada por el sexo, de igual manera el alelo 182 que está presente en 97% de los individuos (figura 15).

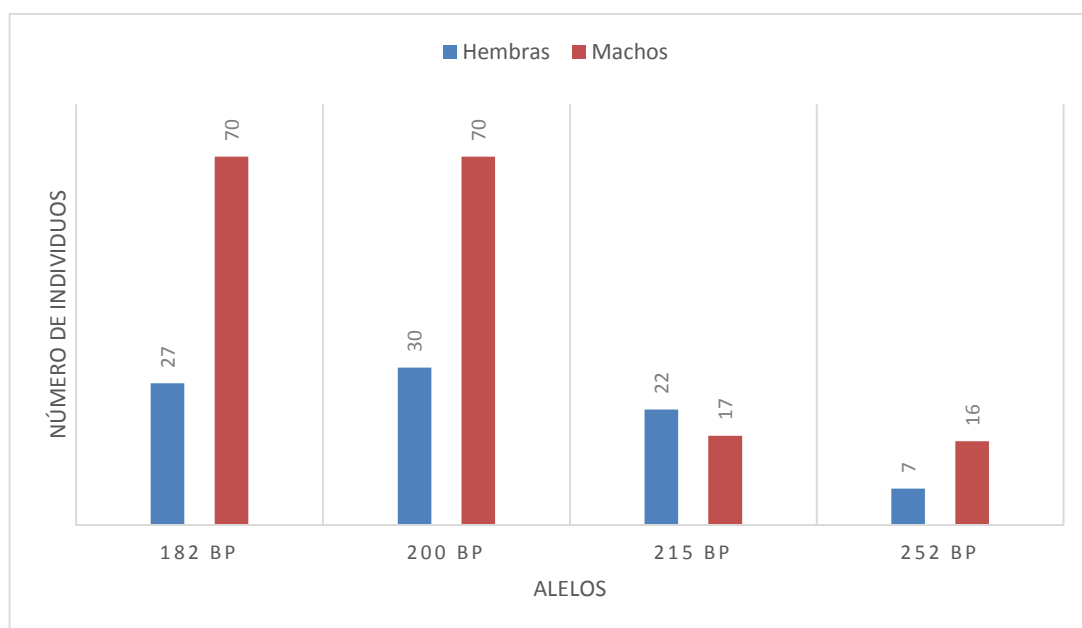


Figura 15. Frecuencias alélicas en hembras y machos en la población de estudio del microsatélite 995.

Los genotipos obtenidos con este microsatélite muestran una combinación de dos alelos (180/200) en los individuos YY y algunos individuos XY, mientras que en los individuos XX y en algunos XY presentan una combinación de tres alelos (180/200/x), como tal como se observa en la figura 16.

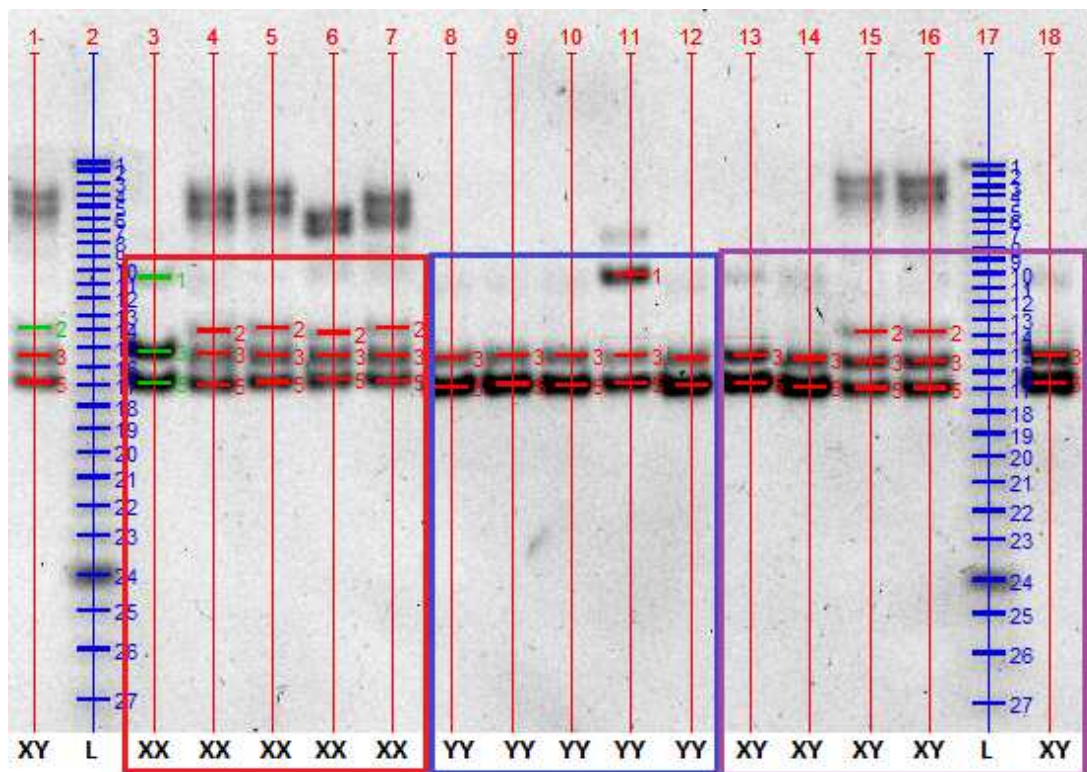


Figura 16. Diferencias entre los genotipos del marcador UNH995 presentados en individuos con distinto genotipo sexual.

Como se puede observar en la figura 16, el alelo #3 y #5 (200 y 182 respectivamente) está presentes en todos los individuos de una manera conjunta, coincidiendo con el análisis de la frecuencia alélica. Sin embargo aquí se puede apreciar que en los individuos YY y en algunos XY, no se halla la presencia de otros alelos (182/200), mientras que en los individuos XX y algunos XY se presenta un genotipo 180/200/x.

De igual manera, analizando las frecuencias de los genotipos alélicos encontrados (figura 17 y anexo F), se nota que el los individuos YY por lo general presentan el genotipo 180/200 al igual que cerca de la mitad de individuos XY, mientras que para los demás individuos es más frecuente encontrar un genotipo 180/200/x.

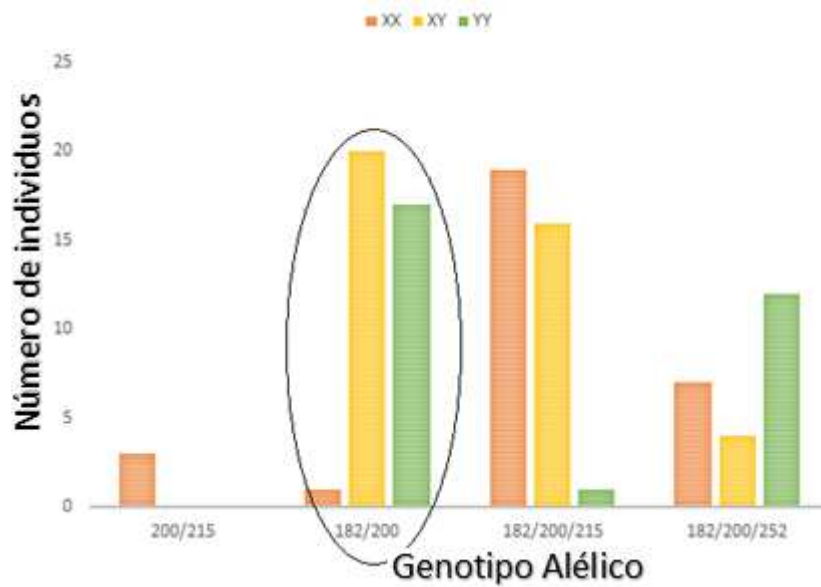


Figura 17. Frecuencia de las combinaciones alélicas encontradas para el marcador UNH898, en los diferentes genotipos sexuales.

Estos resultados muestran que los alelos 180 y 200 tienen una segregación al azar dentro de los diferentes genotipos sexuales, mientras que los alelos 252 y 215 están relacionados con el cromosoma X.

3.3.3. Análisis de dependencia

Para medir la relación entre marcador – genotipo sexual, se midió el nivel de dependencia entre estas dos variables, con una prueba de independencia Chi-cuadrado en tablas de contingencia.

Se realizó una categorización del resultado genotípico de cada marcador versus el genotipo sexual. Debido a la cantidad de genotipos encontrados en los microsatélites UNH104 y UNH898, fueron agrupados en los genotipos A, B y AB (anexo D y anexo E).

Para el microsatélite UNH104 se designó como genotipo B, a los genotipos que poseen solo los alelos 123 y 127; como genotipo A, a los genotipos que presentaron cualquier combinación alélica exceptuando los alelos ya mencionados; y finalmente el genotipo AB, a los genotipos que tenían una combinación de los alelos 123 o 127 con los demás alelos. La asignación de estos genotipos deducidos se presenta en el anexo D.

Para el microsatélite UNH898 se designó como genotipo B, a los genotipos que poseían solo los alelos 264 y 296; como genotipo A, a los genotipos que presentaron cualquier combinación alélica exceptuando los alelos ya mencionados; y finalmente el genotipo AB, a los genotipos que tenían una combinación de los alelos 264 y/o 296 con los demás alelos. La asignación de estos genotipos deducidos se presenta en anexo F.

Las tablas de contingencias para los marcadores con los genotipos categorizados se muestran en la tabla 9. Donde se presentan los resultados de cada análisis de dependencia, dando el valor chi-cuadrado, los grados de libertad y finalmente el valor- p que es de gran importancia para decidir que marcador es el más dependiente.

Tabla 9. Análisis de dependencia entre cada marcador y el genotipo sexual en la población de estudio.

Marcador	Genotipo	Genotipo Sexual			X ²	g.l.	valor-p
		XX	XY	YY			
UNH104	A	22	17	6	46,29	4	2,14 x 10 ⁻⁰⁹
	AB	8	20	6			
	B	0	3	18			
UNH898	A	28	6	0	135,26	4	2,92 x 10 ⁻²⁸
	AB	2	29	0			
	B	0	5	30			
UNH995	200/215	3	0	0	42,76	6	1,30 x 10 ⁻⁰⁷
	182/200	1	20	17			
	182/215	19	16	1			
	182/200/252	7	4	12			

Los resultados muestran que el marcador UNH898 tiene la más alta dependencia con el genotipo sexual con el valor-*p* más alejado del nivel de significancia ($\alpha = 0,05$). Además en el análisis de las frecuencias alélicas mostró alelos altamente relacionados con cada cromosoma en este marcador. Por lo cual fue seleccionado para usarlo en la detección del genotipo sexual.

3.4. Evaluación de la utilidad del microsatélite UNH898 en el diagnóstico del genotipo sexual.

El microsatélite UNH898 fue seleccionado para servir como un marcador que pueda detectar el genotipo sexual debido a la alta dependencia que existe entre ambos ($p = 2,91 \times 10^{-28}$). Además que el análisis de frecuencias alélicas mostro alelos altamente asociados con cada cromosoma, en especial con el cromosoma Y, que es el de principal interés.

Los alelos 296 y 264 fueron considerados como marcadores del cromosoma Y, debido a la alta relación que presentan con el mismo. Mientras que a los demás alelos fueron considerados como marcador del cromosoma

X, en la tabla 10 se muestra los alelos presentes en la población y su cromosoma asignado para la detección.

Tabla 10. Alelos encontrados en la población y su cromosoma asociado.

Alelo	Cromosoma Asociado
224	X
227	X
236	X
245	X
254	X
264	Y
274	X
296	Y

Los genotipos sexuales fueron determinados a partir de la asociación cromosoma sexual – alelo, tomando en cuenta que los alelos 296 y 264 suelen presentarse juntos y formar un genotipo con tres alelos en individuos XY.

Estos genotipos fueron contrastados con el genotipo sexual previamente identificado por pruebas de progenie, para generar una tabla de comparación y obtener la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo,

Este análisis se lo realizó en primer lugar para diferenciar los genotipos de machos (XY o YY) de los genotipos de hembras (tabla 11), y en segundo lugar diferenciar entre los supermachos (YY) y machos normales (XY) (tabla 12). Teniendo una asignación positiva tanto para los machos en el primer caso, como a los supermachos en el segundo caso, debido a su importancia para la selección en una población.

Tabla 11. Resultados de la evaluación de microsatélite UNH898 para diferenciar los machos de las hembras.

PRUEBA DE PROGENIE	RESULTADO UNH898	
	XY o YY	XX
XY O YY	64	2
XX	6	28

Indicador	Probabilidad
Sensibilidad	96,97 %
Especificidad	82,35 %
VPP	91,43 %
VPN	93,33 %

La diferenciación de los machos de las hembras produjo una alta sensibilidad y un valor predictivo alto, mientras que la especificidad y valor predictivo negativo fueron menores. Esto indica que la prueba de diagnóstico es más efectiva para detectar machos (tabla 11).

Tabla 12. Resultados de la evaluación de microsatélite UNH898 para diferenciar los individuos YY de los individuos XY.

PRUEBA DE PROGENIE	RESULTADO UNH898	
	YY	XX
YY	30	0
XX	5	29

Indicador	Probabilidad
Sensibilidad	100,00 %
Especificidad	85,29 %
VPP	85,71 %
VPN	100,00 %

La diferenciación de los individuos YY de los individuos XY mostró ser altamente eficiente, con una sensibilidad y un VPP moderadamente alto. Lo que indica que es posible encontrar individuos YY dentro de una población mixta con un grado de confiabilidad alto (tabla 12).

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

4.1. Extracción de DNA

La utilización de muestras de aletas para la extracción de DNA produce menos estrés en el individuo que al obtener sangre o tejido branquial, garantizando la viabilidad de los animales (Wasko *et al.*, 2003).

Con el uso del kit de extracción PureLink Genomic se obtiene DNA de alto peso molecular, lo cual concuerda con el DNA extraído que tuvo un peso superior a 10 Kb, así como el peso esperado para el método de separación de DNA por afinidad a sílica que es cercano a las 50 Kb (Invitrogen Corporation, 2007; Surzycki, 2000). Además se observó la presencia de contaminación posiblemente por RNA, que no interfirió significativamente en el desarrollo de la PCR (Malacinski, 2005).

La concentración de DNA esperada al utilizar 150 μL de buffer de elución es aproximadamente 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y la concentración de DNA obtenida en laboratorio fue de 47,54 $\text{ng}/\mu\text{L}$. La concentración propuesta por el kit es calculada a partir de ensayos realizados en sangre humana, donde existe menos cantidad de células nucleadas a diferencia de los tejidos animales, en este caso el tejido de la aletas permitieron obtener mayores cantidades de DNA (Invitrogen Corporation, 2007).

La tasa de recuperación de DNA es un dato más confiable en la extracción a diferencia de la concentración que varía de acuerdo a la cantidad de eluyente. Para tejidos animales se espera obtener una tasa de recuperación de 1 - 4 μg de DNA/mg de muestra (Surzycki, 2000), mientras que la tasa de recuperación obtenida fue de 284,38 ng de DNA/mg. Esta baja cantidad de DNA recuperado se debe al método de separación del DNA empleado, siendo la utilización de columnas de sílica el menos eficiente para recuperar DNA, a diferencia de otros métodos utilizados en este tipo de muestra, como la separación por fenol: cloroformo o en altas concentraciones de sal, donde se obtiene una mejor recuperación de DNA (Lopera *et al.*, 2008). A pesar que la

cantidad de DNA recuperado por la columna de sílica es menor que otros métodos, esta cantidad fue suficiente para la PCR y su utilización es relativamente más fácil y rápida (Invitrogen Corporation, 2007).

El radio 260/280 nm es un índice de contaminación proteica, considerando un DNA puro cuando este se encuentra entre 1,80 - 2,00 y un DNA de alta pureza sobre 2,00 (Sharma, 2008). El radio obtenido fue relativamente bajo con un promedio de 1,63 a pesar de que el método de separación por columnas de sílica ofrece una mayor pureza que otros métodos (Invitrogen Corporation, 2007), este resultado se debió a la cantidad de proteína presente en el tejido de las aletas (Lopera *et al.*, 2008). Sin embargo esta baja pureza no es de importancia para aplicaciones como PCR convencional (Surzycki, 2000). Obteniéndose una correcta amplificación con los DNA extraídos.

4.2. Validación de microsatélites

Las condiciones para la PCR fueron adaptadas del ensayo propuesto por Khan (2011), se disminuyó las temperaturas de hibridación debido a que en ese estudio se utilizó primers que tienen una secuencia de reconocimiento para el primer fluorescente M13, mejorando la detección de los productos de PCR en la electroforesis. Debido al menor tamaño de los primers sin secuencias extras la temperatura de fusión también lo es, por lo cual se modificó las temperaturas indicadas en ese estudio, de acuerdo a las especificaciones de los primers sintetizados por Invitrogen. Los resultados mostraron una correcta amplificación con estas modificaciones, donde hubo ausencia de productos inespecíficos lo que revela una correcta hibridación de los primers a las temperaturas seleccionadas (White, 1993).

De igual manera el rango en el tamaño de bandas en los alelos encontrados coinciden con alelos encontrados en trabajos realizados por Lee *et al.* (2003), Khan (2011) y Eshel *et al.* (2011, 2012).

Los tamaños de los alelos obtenidos para el microsatélite UNH104 estuvieron en un rango de 120 a 170 pares de bases, mientras que para el marcador UNH995 se encontró alelos con tamaños en un rango de 180 a 250

bp. Coincidiendo con alelos encontrados por Lee *et al.* (2003) y Khan (2011) en un rango de 130 a 189 pares de bases para UNH104; y en un rango de 160 a 240 pares de bases para UNH995.

El microsatélite UNH898 mostró un rango en el tamaño de banda de 220 a 300 pares de bases, coincidiendo con el rango de tamaños encontrados por Eshel *et al.* (2011) y Khan (2011), entre 250 y 300 pares de bases.

4.3. Genotipaje y dependencia con el genotipo sexual

Los resultados aportados por Lee *et al.*(2003), Khan (2011) y Eshel *et al.* (2011, 2012), en los cuales se usaron los microsatélites UNH104, UNH898 y UNH995, mostraron alta dependencia con el sexo para estos tres marcadores. Resultados que concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, donde también los tres marcadores fueron dependientes del genotipo sexual en diferente nivel.

En su investigación Lee *et al.* (2003), muestra que en dos de las tres familias estudiadas de *O. niloticus* presentaron una alta dependencia con el sexo para los marcadores UNH104 y UNH995 ($p < 0,0001$). En los cuales los alelos 132 y 179 para UNH104, y 236, 169 y 219 para UNH995, están altamente relacionados con los machos. Sin embargo en la tercera familia estudiada estos alelos no presentaron alguna relación con el sexo, segregándose de manera aleatoria en machos y hembras.

El marcador UNH104 presentó una dependencia significativa ($p = 2,14 \times 10^{-09}$), con los alelos 123 y 127 altamente relacionados con el cromosoma Y, aunque posiblemente por la resolución y el retraso en la migración de las bandas en los geles de poliacrilamida (Wang *et al.*, 2009), estos alelos sean los mismos debido a su estrecha diferencia en el tamaño de banda; a su vez por la diferencia en la metodología usada para la genotipificación estos alelos pueden corresponder al alelo ligado a los machos 132 identificado por Lee *et al.* (2003).

El microsatélite UNH995, presentó la más baja dependencia con el genotipo sexual ($p = 1,30 \times 10^{-07}$), debido a que en esta población este marcador se encuentra más alejado de los genes reguladores del sexo, teniendo una segregación más aleatoria (Miles & Wayne, 2008). Además en este marcador no se encontró ningún alelo ligado al cromosoma Y, aunque se halló que los alelos 215 y 252 están relacionados estrechamente con el cromosoma X.

A diferencia de los marcadores anteriormente mencionados el microsatélite UNH898 mostró la más alta dependencia con el sexo ($p = 2,92 \times 10^{-28}$), coincidiendo con el ensayo realizado por Eshel *et al.* (2011), en el cual se reportó que el alelo 276 presente mayoritariamente en machos, está relacionado con el cromosoma Y. En el presente estudio se encontró dos alelos (264 y 296) con similar relación con el cromosoma Y. El alelo 264 puede equivaler al alelo 276, ya que existe diferencia de tamaño de cerca de 10 pares de bases entre dos alelos iguales, durante la electroforesis vertical y en electroforesis capilar (Wang *et al.*, 2009).

La alta dependencia de este marcador con el genotipo sexual puede deberse a que se halla estrechamente ligado al gen *amh* (Eshel *et al.*, 2011). Shirak *et al.* (2006) encontró que este gen se ubica a 1 cM de distancia del microsatélite UNH898 en el grupo de ligación 23 (LG 23). Este gen codifica la hormona anti-mülleriana, la cual inhibe el desarrollo de los conductos de Müller que posteriormente formaran el útero y las trompas de Falopio (Lühmann, 2012). Adicionalmente Poonlaphdecha *et al.* (2011), demostró que este gen se expresa mayoritariamente en machos de *O. niloticus* a los 14 días post-fertilización (dpf), justo antes que comience la diferenciación sexual.

4.4. Evaluación de la utilidad del microsatélite UNH898 en el diagnóstico del genotipo sexual.

Las investigaciones en la reproducción de tilapia, tienen como prioridad obtener un cultivo monosexual de la manera más eficiente y en la actualidad se busca usar metodologías que generen el menor impacto ambiental

(Hartley, 2014). El desarrollo de la tecnología de machos YY, se basó en este principio, sin embargo su aplicación se ha visto disminuida por la ausencia de pruebas de diagnóstico que identifiquen con rapidez y una buena confiabilidad el genotipo sexual durante la producción de estos reproductores (Khan, 2011).

La única metodología que puede predecir la carga cromosómica sexual con una alta confianza, es la prueba de progenie. En la cual se mide el ratio entre machos y hembras de la descendencia de un espécimen de interés con un reproductor del que ya se conoce su genotipo sexual, y se lo compara con un ratio esperado. Por ejemplo si un individuo es un hembra revertida (XY), al cruzarlo con un macho normal (XY), se debería obtener una progenie compuesta por 25% hembras y 75% machos (Beardmore *et al.*, 2001).

Se ha buscado otras maneras de para poder identificar el genotipo sexual en tilapia, Crosetti *et al.* (1988), realizó estudios citogenéticos en algunas especies del género *Oreochromis* incluyendo a *O. niloticus*, para buscar posibles candidatos como cromosomas sexuales. Sus estudios revelaron que esta especie posee 44 cromosomas (2n) y no se encontró diferencias significativas en ningún par, por lo que no se ha podido reconocer los cromosomas sexuales mediante citogenética.

Posteriormente Foresti *et al.* (1999) y Carrasco *et al.* (1999) pudieron encontrar diferencias en el apareamiento de un par de cromosomas, mediante análisis del complejo sinaptotemal por microscopía electrónica. Sus estudios revelaron que en los individuos XY, en una sección del cromosoma más largo, había una ausencia de apareamiento, mientras que en los individuos YY y XX hubo un apareamiento normal. En esta sección donde se presume que existe un acumulamiento de heterocromatina, lo que inhibe el apareamiento, y en la cual se sospecha que están presentes los reguladores del sexo.

El desarrollo del mapa genético en la tilapia, llevó a la búsqueda de posibles marcadores relacionados con el sexo, que pudieran servir para una selección asistida por marcadores para una rápida identificación del genotipo sexual. Los estudios realizados por Lee *et al.* (2003), revelaron por primera

vez marcadores que están altamente ligados al sexo en el grupo de ligación 1 (LG1) y que posteriormente Khan (2011) los utilizaría para identificar machos YY como reproductores, aunque los alelos encontrados mostraron mucha disparidad y no se pudo identificar con una gran fidelidad este tipo de individuos.

Por el contrario Eshel *et al.* (2011) encontró una fuerte ligación del microsatélite UNH898 con el genotipo sexual, pudiendo predecirlo con una alta confiabilidad, que posteriormente usaría para validar individuos YY en investigaciones posteriores (Eshel *et al.*, 2012). Resultados que concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, ya que mediante la utilización de este marcador fue posible distinguir entre individuos machos y hembras, y posteriormente identificar los individuos YY con un alto nivel de confianza.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

1. La identificación del genotipo sexual mediante el uso de microsatélites mostró ser altamente sensible en la población investigada. Validando la hipótesis planteada, donde el marcador UNH898 presentó un alto grado de confiabilidad.
2. Con el uso del protocolo optimizado para la extracción de DNA genómico de muestras de aleta de tilapia del Nilo (*O. niloticus*) utilizando el kit PureLink™ Genomic (Invitrogen, USA) se logró obtener cantidad (284 ng DNA/mg de muestra seca) y calidad (radio 260/280 nm= 1,63) suficientes para utilizarlo en la genotipificación con microsatélites.
3. Las variantes de temperatura ($T_a = T_m - 3^{\circ}\text{C}$) durante la PCR para los microsatélites UNH104, UNH898 y UNH995 fueron importantes para obtener una buena amplificación, sin presencia de productos inespecíficos, y donde los amplicones obtenidos estuvieron dentro de los rangos reportados para cada marcador.
4. Para la detección del genotipo sexual se seleccionó al microsatélite UNH898 ya que mostró estar más ligado a los genes determinantes del sexo en la especie ($p = 2,91 \times 10^{-28}$).
5. Al cromosoma Y se encuentran altamente ligados los alelos 296 y 264 del microsatélite UNH898. Mientras que los demás alelos encontrados para este marcador muestran estar más ligados a los cromosomas X. Formando el genotipo 264/296 en individuos YY y el genotipo 264/296/x en individuos XY.
6. EL marcador UNH898 mostró ser altamente sensible en la identificación del genotipo sexual, permitiendo diferenciar machos de hembras (sensibilidad = 96,97% y VPP = 91,43%), y también diferenciar machos YY de machos XY (sensibilidad = 100% y VPP = 85,71%) con alto grado de confiabilidad.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

1. Para usar la técnica de selección asistida por marcadores moleculares, se recomienda aplicar el microsatélite UNH898 ya que permite identificar individuos con el genotipo sexual YY.
2. Para lograr una mayor confiabilidad en la identificación de alelos asociados a los cromosomas sexuales, es importante iniciar con pruebas de segregación filial o aumentar el tamaño muestral.
3. Para la aplicación de la metodología de detección del genotipo sexual en lotes de reproducción a gran escala, se recomienda utilizar una metodología de extracción de DNA alternativa, ya que utilizar kits comerciales conlleva altos costos.
4. En trabajos de investigación complementaria y para lograr mejor precisión en la cuantificación del tamaño de los alelos, se recomienda utilizar un sistema de electroforesis capilar con detección por fluorescencia.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alceste, C., & Illingworth, J. (2001). Tilapia Farming in Ecuador Rapid Development of a New Industry. *The Advocate*, 56–57.
- Ausubel, F. M. (Ed.). (2002). *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology* (5th ed., Vols. 1-2). New York: Wiley.
- Baroiller, J. F., d' Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., & Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(1), 30–38.
- Baroiller, J. F., & D'Cotta, H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 130(4), 399–409.
- Baroiller, J. F., & Toguyeni, A. (2004). The Tilapiini tribe: environmental and social aspects of reproduction and growth. *Fisheries and Aquaculture, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Eolss Publishers, Oxford. Extraído de: <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C10/E5-05-03-10.pdf>
- Bartley, D. M., Rana, K., & Immink, A. J. (2000). The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(3), 325–337.

- Beardmore, J. A., Mair, G. C., & Lewis, R. I. (2001). Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197(1–4), 283–301.
- Brooker, R. J. (2013). *Concepts of Genetics*. McGraw-Hill Education.
- Bwanika, G. N., Makanga, B., Kizito, Y., Chapman, L. J., & Balirwa, J. (2004). Observations on the biology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in two Ugandan crater lakes. *African Journal of Ecology*, 42, 93–101.
- Cámara Nacional de Acuicultura. (2014). *Exportaciones de Tilapia Ecuatoriana a EEUU - Diciembre 2013*. Cámara Nacional de Acuicultura, Comercio Exterior. Extraído de: <http://www.cna-ecuador.com/comercio-exterior/estadisticas/tilapia>
- Carrasco, L. A. P., Penman, D. J., & Bromage, N. (1999). Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. *Aquaculture*, 173(1–4), 207–218.
- Charlesworth, D., & Mank, J. E. (2010). The birds and the bees and the flowers and the trees: lessons from genetic mapping of sex determination in plants and animals. *Genetics*, 186(1), 9–31.
- Clement, S., & Lovell, R. T. (1994). Comparison of processing yield and nutrient composition of cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 119(2–3), 299–310.
- Crosetti, D., Sola, L., Brunner, P., & Cataudella, S. (1988). Cytogenetical Characterization of *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* and Their

- Hybrid (pp. 143–151). Presented at the The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Bangkok, Thailand: WorldFish.
- D’Cotta, H., Pepey, E., Pfennig, F., Bienvenu, D., Gutzeit, H., Volff, J., Baroiller, J. (2007). Sox9a, Sox9b and Amh are up-regulated in the gonads during natural and temperature-induced tilapia male differentiation. Presented at the Proceedings of the 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Saint-Malo, Francia.
- Devlin, R. H., McNeil, B. K., Solar, I. I., & Donaldson, E. M. (1994). A rapid PCR-based test for Y-chromosomal DNA allows simple production of all-female strains of chinook salmon. *Aquaculture*, 128(3–4), 211–220.
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3), 191–364.
- El-Sayed, A.-F. M. (2006). *Tilapia Culture*. CABI.
- Eshel, O., Shirak, A., Weller, J. I., Hulata, G., & Ron, M. (2012). Linkage and Physical Mapping of Sex Region on LG23 of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *G3 (Bethesda, Md.)*, 2(1), 35–42.
- Eshel, O., Shirak, A., Weller, J. I., Slossman, T., Hulata, G., Cnaani, A., & Ron, M. (2011). Fine-mapping of a locus on linkage group 23 for sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Genetics*, 42(2), 222–224.
- FAO. (2005). *Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758)* (Programa de información de especies acuáticas). Departamento de pesca y

- acuacultura. Extraído de:
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es
- FAO. (2014a). *Global aquaculture production*. Departamento de Acuicultura y Pesca. Extraído de: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>
- FAO. (2014b). *Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758)* (Species Fact Sheets). Departamento de pesca y acuicultura. Extraído de: <http://www.fao.org/fishery/species/3217/en>
- FAO. (2014c). *State of the World Fisheries and Aquaculture 2014*. Food and Agriculture Organization.
- Fishgen. (2005). *Development Sequence for GMT®*. Extraído de: http://www.fishgen.com/5GMT_%20Development.htm
- Foresti, F., Oliveira, C., Galetti Junior, P. M., & Almeida-Toledo, L. F. de. (1993). Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome*, 36(6), 1124–1128.
- Fryer, G., & Iles, T. D. (1972). *The cichlid fishes of the great lakes of Africa: their biology and evolution*. Oliver and Boyd.
- Fuentes, C., Soto, G., Torres, I., & Alejandro Flores. (2013). Male tilapia production techniques: A mini-review. *African Journal of Biotechnology*, 12(36), 5496–5502.
- Gamble, T., & Zarkower, D. (2012). Sex determination. *Current Biology*, 22(8), R257–R262. doi:10.1016/j.cub.2012.02.054
- Gobierno Autónomo del Distrito Metropolitano de Lago Agrio. (2014). *Demografía*. G.A.D.M. Lago Agrio. Extraído de:

<http://www.lagoagrio.gob.ec/nsite/index.php/lago-agrio/2013-05-12-04-20-05>

Hake, L., & O'Connor, C. (2008). Genetic Mechanisms of Sex Determination. *Nature Education*, 1(1), 25.

Hartley, A. (2014). Potential Of YY Tilapia Male Technology. *Global Aquaculture Advocate*.

Integrated Taxonomic Information System. (2014). *Oreochromis niloticus*.

Extraído de:
http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=553310

International Commission on Zoological Nomenclature. (1999). *International code of zoological nomenclature*. (W. D. L. Ride, Ed.) (4th ed.). London: International Trust for Zoological Nomenclature, c/o Natural History Museum.

Invasive Species Specialist Group. (2014). *Oreochromis niloticus*. *Global Invasive Species Database*. Base de datos en línea. Extraído de:
<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=1322&fr=1&sts=sss&lang=EN>

Invitrogen Corporation. (2007). *PureLink Genomic DNA Kits. For purification of genomic DNA* (Manual de Usuario No. Versión A, 25-1012). USA.

Khalil, W., Hasheesh, W., Marie, M., Abbas, H., & Zahran, E. (2011). Assessment the impact of 17 α -methyltestosterone hormone on growth, hormone concentration, molecular and histopathological changes in

- muscles and testis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Life Science Journal*, 8(3), 329–343.
- Khan, M. (2011). *Marker-assisted selection in enhancing genetically male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) production* (Tesis de Doctorado). Universidad de Stirling, Stirling, Escocia. Extraído de: <https://dspace.stir.ac.uk/handle/1893/2980>
- Kocher, T. D., Lee, W.-J., Sobolewska, H., Penman, D., & McAndrew, B. (1998). A Genetic Linkage Map of a Cichlid Fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 148(3), 1225–1232.
- Kondo, M., Nanda, I., Hornung, U., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., ... Schartl, M. (2003). Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b(Y)* of medaka from other fish species. *Current Biology: CB*, 13(5), 416–420.
- Lee, B., Penman, D. J., & Kocher, T. D. (2003). Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. *Animal Genetics*, 34(5), 379–383.
- Lee, B. Y., & Kocher, T. D. (2007). Exclusion of Wilms tumour (*WT1b*) and ovarian cytochrome P450 aromatase (*CYP19A1*) as candidates for sex determination genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Genetics*, 38(1), 85–86. doi:10.1111/j.1365-2052.2007.01563.x
- Lee, B.-Y., Lee, W.-J., Streelman, J. T., Carleton, K. L., Howe, A. E., Hulata, G., ... Kocher, T. D. (2005). A Second-Generation Genetic Linkage Map of Tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics*, 170(1), 237–244.

- León, A. (2009, June). *Proyecto de factibilidad para la creación de una microempresa dedicada al cultivo y comercialización de tilapia - oreochromis sp- al mercado de los Estados Unidos ubicada en la parroquia de Mindo, cantón San Miguel de los Bancos* (Tesis de Pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador. Extraído de: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/1484>
- Lim, C., & Webster, C. D. (2006). *Tilapia: Biology, Culture, and Nutrition*. Taylor & Francis.
- Liu, Z. J., & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1–4), 1–37.
- Lopera, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., Lopes, S., & Da, T. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia E Investigación Agraria*, 35(1), 77–86.
- Lorenzo, J. (2011). *Efecto de tres métodos de cocción sobre el contenido nutricional de la mojarra Tilapia (Oreochromis sp.)* (Tesis de Pregrado). Universidad de Papoalapan, Oaxaca, México. Extraído de: http://www.unpa.edu.mx/tesis_Tux/tesis_digitales/TESIS%20JOS%C3%89%20LUIS%20LORENZO%20MANZANAREZ.pdf
- Lühmann, L.-M. (2012). Quantitative and molecular genetic studies on temperature-dependent sex determination of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Extraído de: <https://ediss.uni-goettingen.de/handle/11858/00-1735-0000-000D-EF3C-C>

- Mair, G. (2001). Monosex tilapia: factors, effects, and methods for male-only production. *Global Aquaculture Advocate*, 4(4), 79–81.
- Mair, G. C., Abucay, J. S., Abella, T. A., Beardmore, J. A., & Skibinski, D. O. F. (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.
- Mair, G. C., Abucay, J. S., Beardmore, J. A., & Skibinski, D. O. (1995). Growth performance trials of genetically male tilapia (GMT) derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L.: On station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. *Aquaculture*, 137(1), 313–323.
- Malacinski, G. M. (2005). *Essentials of Molecular Biology*. Jones & Bartlett Learning.
- Marcillo, G., & Landívar, J. (2008). Tecnología De Producción De Alevines Monosexo De Tilapia. Retrieved from <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/6342>
- Martinez, V. (2007). Marker-assisted selection in fish and shellfish breeding schemes. *Marker-Assisted Selection-Current Status and Future Perspectives in Crops, Livestock, Forestry and Fish*, 329–362.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), 559–563.
- Matsuda, M., Shinomiya, A., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., ... Nagahama, Y. (2007). DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America,
104(10), 3865–3870. doi:10.1073/pnas.0611707104

- McConnell, S. K., Beynon, C., Leamon, J., & Skibinski, D. O. (2000).
Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. *Animal Genetics*, 31(3), 214–218.
- Miles, C., & Wayne, M. (2008). Quantitative Trait Locus (QTL) Analysis. *Nature Education*, 1(1), 208.
- Nagl, S., Tichy, H., Mayer, W. E., Samonte, I. E., McAndrew, B. J., & Klein, J. (2001). Classification and Phylogenetic Relationships of African Tilapiine Fishes Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(3), 361–374. doi:10.1006/mpev.2001.0979
- Nanda, I., Hornung, U., Kondo, M., Schmid, M., & Scharl, M. (2003). Common spontaneous sex-reversed XX males of the medaka *Oryzias latipes*. *Genetics*, 163(1), 245–251.
- Okumuş, İ., & Çiftci, Y. (2003). Fish Population Genetics and Molecular Markers: II- Molecular Markers and Their Applications in Fisheries and Aquaculture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8(1), 51–79.
- Oliván, A. (2010). Mecanismos de Determinación Sexual. Fundamentos de Genética. Extraído de:
<http://es.slideshare.net/CiberGenetica/mecanismos-de-determinacin-del-sexo>

- Pandian, T. J., & Sheela, S. G. (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138(1), 1–22.
- Pechsiri, J., & Yakupitiyage, A. (2005). A comparative study of growth and feed utilization efficiency of sex-reversed diploid and triploid Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research*, 36(1), 45–51. doi:10.1111/j.1365-2109.2004.01182.x
- Penman, D. J., & Piferrer, F. (2008). Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1), 16–34.
- Poonlaphdecha, S., Pepey, E., Huang, S.-H., Canonne, M., Soler, L., Mortaji, S., D'Cotta, H. (2011). Elevated amh gene expression in the brain of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) during testis differentiation. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 5(1), 33–47.
- Popma, T., & Masser, M. (1999). *Tilapia: Life History and Biology* (283). Souther Regional Aquaculture Center.
- Pruginin, Y., Rothbard, S., Wohlfarth, G., Halevy, A., Moav, R., & Hulata, G. (1975). All-male broods of *Tilapia nilotica* x *Tilapia aurea* hybrids. *Aquaculture*, 6(1), 11–21.
- Pullin, R. S. V., & McConnell, R. (1982). *The Biology and Culture of Tilapias: Proceedings of the International Conference on the Biology and Culture of Tilapias, 2-5 September 1980 at the Study and Conference Center of the Rockefeller Foundation, Bellagio, Italy*. WorldFish.

- Scott, A. G., Penman, D. J., Beardmore, J. A., & Skibinski, D. O. F. (1989). The “YY” supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in aquaculture. *Aquaculture*, 78(3–4), 237–251.
- Sharma, R. K. (2008). *Basic Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. I. K. International Pvt Ltd.
- Shirak, A., Seroussi, E., Cnaani, A., Howe, A. E., Domokhovskiy, R., Zilberman, N., ... Ron, M. (2006). Amh and Dmrt2 genes map to tilapia (*Oreochromis spp.*) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination. *Genetics*, 174(3), 1573–1581.
- Solís, L., & Andrade, A. (2005). ¿Qué son los marcadores moleculares? *La Ciencia Y El Hombre*, 8(1).
- Solomon, E., Martin, C., Martin, D., & Berg, L. (2014). *Biology*. Cengage Learning.
- Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer Verlag.
- Takehana, Y., Demiyah, D., Naruse, K., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2007). Evolution of Different Y Chromosomes in Two Medaka Species, *Oryzias dancena* and *O. latipes*. *Genetics*, 175(3), 1335–1340.
- Varadaraj, K., & Pandian, T. (1989). First report on production of supermale tilapia by integrating endocrine sex reversal with gynogenetic technique, 58(8), 434–440.
- Velasco, M., & Freire, G. (2008). Tilapia Culture in Ecuador: Resilient Industry Coexists With Shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, 49–50.

- Vidal, L. V. O., Albinati, R. C. B., Albinati, A. C. L., Lira, A. D. de, Almeida, T. R. de, & Santos, G. B. (2008). Eugenol as an anesthetic for Nile tilapia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(8), 1069–1074.
- Wang, X., Rinehart, T. A., Wadl, P. A., Spiers, J. M., Hadziabdic, D., Windham, M. T., & Trigiano, R. N. (2009). A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles*. *African Journal of Biotechnology*, 8(11).
Extraído de: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/60628>
- Wasko, A. P., Martins, C., Oliveira, C., & Foresti, F. (2003). Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*, 138(3), 161–165.
- Watanabe. (2002). Tilapia production systems in the Americas: Technological advances, trends, and challenges, v. 10, no. 3/4, p. 465-498.
- White, B. A. (1993). *PCR Protocols: Current Methods and Applications*. Springer Science & Business Media.
- Wohlfarth, G. W. (1994). The unexploited potential of tilapia hybrids in aquaculture. *Aquaculture Research*, 25(8), 781–788.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., ... Guiguen, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology: CB*, 22(15), 1423–1428.
- Zhang, Q., Sun, X., Qi, J., Wang, Z., Wang, X., Wang, X., & Zhai, T. (2009). Sex determination mechanisms in fish. *Journal of Ocean University of China*, 8(2), 155–160.