



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**DETECCIÓN DEL GENOTIPO SEXUAL EN
NEOHEMBRAS DE TILAPIA ROJA
(*Oreochromis sp.*) MEDIANTE
CITOGENÉTICA CLÁSICA Y MOLECULAR EN
EL VALLE DEL CAUCA**

GYNA GYSELA ACOSTA VILLOTA

Código 7414501

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencia Animal

Palmira, Colombia

2017

DETECCIÓN DEL GENOTIPO SEXUAL EN NEOHEMBRAS DE TILAPIA ROJA (*Oreochromis* sp.) MEDIANTE CITOGENÉTICA CLÁSICA Y MOLECULAR EN EL VALLE DEL CAUCA

GYNA GYSELA ACOSTA VILLOTA

Código 7414501

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias Agrarias

Directores:

Creucí María Caetano MSc., DSc.
José Ader Gómez Peñaranda. Zoot., Ph.D

Co-Directora:

Marta Lucia Bueno Angulo Biol. M.sc.

Línea de Investigación:

Línea Producción Animal Tropical

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencia Animal

Palmira, Colombia

2017

Dedicatoria

A Dios, primeramente, por cumplir fielmente su promesa de alcanzar este galardón tan anhelado,

“En la multitud de mis pensamientos dentro de mí, tus consolaciones alegraban mi alma porque Jehová me ha sido por refugio y mi Dios por roca de confianza”

Salmos 94, 18-22

A mis padres por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, a mi hija por ser la motivación de mí día a día...

Agradecimientos

Al profesor José Ader Gómez por creer en mis capacidades como investigadora y profesional, por todo su respaldo y confianza.

A la profesora Luz Ángela Álvarez por abrirme las puertas en su grupo de investigación Recursos Zoogenéticos y poder llevar a cabo la primera fase de este trabajo.

A la profesora Creucí María Caetano por su interés y respaldo a este trabajo, por depositar su confianza en mí.

A la profesora Marta Lucía Bueno por su interés durante todas las etapas de este trabajo, por abrirme las puertas del laboratorio de citogenética para capacitarme en las técnicas y por su calidez humana.

A Nubia Rodríguez y Alexandra Torres, auxiliares del Laboratorio de Microbiología y Sanidad agrícola por su disposición, colaboración y consejos en las etapas iniciales de este trabajo.

A Colciencias y la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto y mi talento humano.

A Fabio y Julián Tascón, propietarios de la piscícola Los Lagos, por abrirme las puertas de su granja para la realización de éste trabajo, por su respaldo y contribuciones financieras.

A Fernando Lubo, por su apoyo logístico en el cuidado de los animales en la piscícola durante dos años.

A mis queridas compañeras de maestría Yuri Garzón, Claudia Lenis, Ángela Vinasco que sin ellas esto no se hubiera podido realizar, por el aprendizaje obtenido de cada uno de ellas y el respaldo que nunca faltó.

A Laura Rengifo, David Aguillón, Jorge y Samanta Martínez por enseñarme las técnicas de laboratorio, compartirme un poco de su conocimiento y por su calidez humana.

Resumen

La tecnología GMT® (Tilapia genéticamente macho) se convierte en una alternativa viable para producir lotes monosexo machos de tilapia sin el uso de hormonas, pero como primer paso es necesario producir e identificar neohembras XY. El principal problema es identificar neohembras de hembras normales, sin necesidad de emplear pruebas de progenie que implica la producción de múltiples generaciones. El objetivo de este estudio fue producir ejemplares de neohembras de tilapia roja e identificar el genotipo de neohembras por citogenética clásica y molecular. Se feminizaron 800 larvas de tilapia suministrando una dosis de hormona 17 β -estradiol a razón de 200mg/Kg de alimento por 30 días y un tratamiento control de 200 larvas sin hormona feminizante. A los 350g de peso se realizó sexaje manual por inspección de la papila urogenital y marcación con microchip para su posterior identificación. Los cromosomas se obtuvieron mediante la técnica de cultivo de linfocitos de sangre periférica y se emplearon las técnicas de bandeo cromosómico C, Q, G y NOR. Se genotipificaron los individuos de los dos tratamientos con el microsatélite UNH898, y se empleó una sonda que contenía el genotipo 260/290, específica para machos normales en la técnica FISH. Los resultados de los análisis mostraron que la especie *Oreochromis sp.*, posee 2n=44 cromosomas y se encontraron patrones únicos de banda C sin evidencia de cromosomas sexuales. Se encontró un genotipo recurrente en machos, pero mediante citogenética molecular se logró evidenciar que no es exclusivo para machos porque hibridó en dispersiones cromosómicas de hembras.

Palabras clave: cromosomas, neohembras, FISH, feminización hormonal, tilapia roja.

Abstract

GMT® technology (genetically male tilapia) becomes a viable alternative to produce male monosex lots of tilapia without the use of hormones, but as a first step, it is necessary to produce and identify neofemales XY. The main problem is to identify neofemales of normal females, without the need to use progeny tests that involve the production of multiple generations. The objective of this study was to produce neofemales from red tilapia and identify the genotype of neofemales by classical and molecular cytogenetics. About 800 tilapia larvae were feminized by supplying a dose of 17β -estradiol hormone at a rate of 200 mg / kg of feed for 30 days and a control treatment of 200 larvae without a feminizing hormone. At 350g of weight, manual sexing was performed by inspection of the urogenital papilla and microchip marking for later identification. Chromosomes were obtained by the peripheral blood lymphocyte culture technique and then used chromosome banding techniques C, Q, G and NOR. Individuals of the two treatments were genotyped with the UNH898 microsatellite, and a probe containing the genotype 260/290, specific for normal males in the FISH technique, was used. The results of the analysis showed that the species *Oreochromis* sp., has $2n = 44$ chromosomes and unique C-band patterns were found without evidence of sex chromosomes. A recurrent genotype was found in males, but through molecular cytogenetics it was found that it is not exclusive for males because it hybridized in female chromosomal dispersions.

Keywords: chromosomes, neofemales, FISH, hormonal feminization, red tilapia.

Contenido

Pág.

RESUMEN	IX
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABLAS.....	XVI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XVII
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	4
2. MARCO DE REFERENCIA	7
2.1. Situación actual de la tilapia en la acuicultura del mundo	7
2.2. Situación actual de la tilapia en la acuicultura colombiana	8
2.3. Taxonomía de tilapia roja	10
2.4. Características biológicas.....	11
2.5. Ciclo reproductivo y diferenciación sexual	12
2.6. Obtención de poblaciones monosexo de machos en tilapia	13
2.7. Citogenética clásica como herramienta de identificación sexual en peces	15
2.8. Citogenética molecular como herramienta de identificación sexual en peces...	18
2.9. Marcadores moleculares ligados al sexo en tilapia.....	21
3. METODOLOGIA.....	24
3.1. Material biológico	24
3.2. Feminización de la progenie y selección de hembras.....	24
3.3. Marcación de los peces y extracción de sangre	25
3.4. Cultivo de linfocitos	26
3.5. Técnicas de bandeo cromosómico	27
3.5.1. Bando CBG	28
3.5.2. Bando NOR	28
3.5.3. Bando G-W.....	29
3.5.4. Bando QFQ	29
3.5.5. Procesamiento de imágenes y análisis de bandeos cromosómicos.....	29
3.6. Elección de la sonda específica.....	30

3.7.	Extracción de ADN para síntesis de la sonda específica.....	31
3.7.1.	Tipo de muestra	31
3.7.2.	Protocolo extracción.....	33
3.7.3.	Visualización y cuantificación de la extracción de ADN	33
3.8.	Optimización de la PCR para el marcador UNH898 y verificación de los productos amplificados	33
3.9.	Visualización de los productos de PCR, análisis de geles y determinación de tamaño de alelos	35
3.10.	Producción de la sonda específica.....	36
3.10.1.	Síntesis de la sonda específica	36
3.10.2.	Precipitación de la sonda específica y dilución en buffer de hibridación .	37
3.11.	Protocolo FISH	37
4.	RESULTADOS.....	38
4.1.	Feminización hormonal.....	38
4.2.	Parámetros morfométricos del cariotipo de <i>Oreochromis</i> sp.	38
4.3.	Bandas CBG.....	40
4.4.	Bandas NOR.....	42
4.5.	Bandeo G-W	46
4.6.	Bandas QFQ.....	48
4.7.	Identificación de alelos y genotipos en <i>Oreochromis</i> sp., con el marcador microsatélite asociado al sexo UNH898	49
4.8.	Análisis de señales de FISH	53
5.	DISCUSIÓN.....	56
5.1.	Feminización Hormonal	56
5.2.	Parámetros morfométricos del cariotipo de <i>Oreochromis</i> sp.	57
5.3.	Bandas CBG.....	61
5.4.	Bandas NOR.....	62
5.5.	Bandas G-W y QFQ.....	63
5.6.	Identificación de alelos y genotipos en <i>Oreochromis</i> sp., con el marcador microsatélite asociado al sexo UNH898	65
5.7.	Señales de FISH.....	67
6.	CONCLUSIONES	69
7.	RECOMENDACIONES	70

Anexo 1. Reporte de la asignación del código de microchip a numeración básica de ejemplares de tilapia roja distribuidos en los dos tratamientos.	71
Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN usando kit comercial Quiagen®.....	75
Anexo 3. Datos promedio de Cuantificación espectrofotométrica para muestras de extracción de DNA	76
Anexo 4. Protocolo FISH para cromosomas metafasicos de tilapia roja obtenidos por cultivo de linfocitos	79
Anexo 5. Datos morfométricos de los cariotipos	80
Anexo 6. Tablas de frecuencia para alelos y genotipos	87
8. BIBLIOGRAFÍA	88

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Producción de tilapia por especies en millones de toneladas	8
Figura 1-2 Especies piscícolas continentales producidas en Colombia	9
Figura 1-3. Morfología externa de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i>	11
Figura 1-4. Programa para obtención de supermachos en tilapia.....	14
Figura 1-5. Marcadores moleculares asociados al sexo en el grupo de ligamiento ocho en tilapia nilótica	22
Figura 1-6. Mapa de ligamiento No.23 mostrando la cercanía del marcador microsatélite UNH898 al gen amh	23
Figura 3-1. Frecuencia del número cromosómico de <i>Oreochromis sp.</i>	38
Figura 3-2. Extendidos cromosómicos de los dos tratamientos en <i>Oreochromis sp</i> con Bandas CBG	41
Figura 3-3. Cariotipo de una hembra* de <i>Oreochromis sp</i> con Bandas CBG	42
Figura 3-4. Extendidos cromosómicos de los dos tratamientos en <i>Oreochromis sp</i> con Bandas NOR.....	44
Figura 3-5. Extendidos cromosómicos del cromosoma 1 en <i>Oreochromis sp</i> con Bandas NOR y asociación NOR en núcleos	45
Figura 3-6. Cariotipo de un macho* de <i>Oreochromis sp</i> con Bandas NOR.....	46
Figura 3-7. Extendidos cromosómicos de los dos tratamientos en <i>Oreochromis sp</i> con Bandas G-W	47
Figura 3-8. Cariotipo de <i>Oreochromis sp</i> con Bandas G-W	48
Figura 3-9. Extendidos cromosómicos de dos individuos del GC en <i>Oreochromis sp</i> con Bandas QFQ.....	49

Figura 3-10. Pesos moleculares en gel de Poliacrilamida al 10% mostrando amplificadores del microsatélite UNH898 en machos y hembras de <i>Oreochromis sp.</i> , del GC	50
Figura 3-11. Frecuencias alélicas con el marcador microsatélite UNH898 presentes en la población total de individuos de <i>Oreochromis sp.</i> , compuesta por el GC y GH	51
Figura 3-12. Frecuencias alélicas con el marcador microsatélite UNH898 presentes en individuos Machos y Hembras del GC y Neohembras del GH en <i>Oreochromis sp.</i>	51
Figura 3-13. Frecuencias de las combinaciones alélicas con el marcador microsatélite UNH898 presentes en individuos Machos y Hembras del GC y Neohembras del GH en <i>Oreochromis sp.</i>	52
Figura 3-14. Dispersiones cromosómicas en metafase del macho No. 66 del GC de <i>Oreochromis sp.</i> , mostrando las señales de hibridación con la sonda específica	54
Figura 3-15. Dispersiones cromosómicas en metafase de dos individuos del GC de <i>Oreochromis sp.</i> , mostrando ausencia de señales de hibridación con la sonda específica y background	55

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1. Identificación de los ejemplares de <i>Oreochromis</i> sp., muestreados para el cultivo de linfocitos y obtención de las dispersiones cromosómicas.....	27
Tabla 2-2. Identificación de los ejemplares de <i>Oreochromis</i> sp muestreados para extracción de DNA	31
Tabla 2-3. Coctel de amplificación para marcador UNH898.....	34
Tabla 2-4. Perfil de amplificación para marcador UNH898	34
Tabla 2-5. Coctel de amplificación para producción de la sonda.....	36
Tabla 3-1. Formulas cariotípicas en pares cromosómicos de los individuos del grupo GC y GH de <i>Oreochromis</i> sp.	39
Tabla 3-2. Otras características cariotípicas de los individuos del grupo GC y GH de <i>Oreochromis</i> sp.....	40
Tabla 3-3. Frecuencia y localización de bandas NOR en cromosomas de <i>Oreochromis</i> sp	43
Tabla 3-4. Señales de hibridación y ubicación de la señal en individuos del GC de <i>Oreochromis</i> sp.....	54

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
GH	Grupo Tratamiento Hormonal
GC	Grupo Control
μ l	Microlitros
CBG	Bandas C por hidróxido de bario utilizando Giemsa
QFQ	Bandas Q por fluorescencia usando quinacrina
G-W	Bandas G y colorante Wright
NOR	Regiones Organizadoras del nucléolo
Ag-NOR	Regiones Organizadores del nucléolo utilizando nitrato de plata.
p	Brazo corto
q	Brazo largo
pb	Pares de bases
GMT	Tilapia Genéticamente macho
FISH	Hibridización fluorescente <i>in situ</i>
Amh	Hormona antimülleriana
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
cM	Centimorgan
MAA	Alelo asociado a machos
nm	Nanómetros
mM	Milimolar
DNAr	Ácido desoxiribonucleico ribosomal
E ₂	17 β -estradiol

Introducción

Entre las dificultades productivas en la piscicultura de la tilapia están la precocidad reproductiva que genera disparidad en los lotes por reproducción indeseada, menores tasas de desarrollo de las hembras por incubación bucal y la más importante que es el gonocorismo indiferenciado durante los primeros días de vida, influenciada por varios factores que invierten el sexo fenotípico (Von-Hessberg, Quintero-Grajales, & Restrepo-Murillo, 2012). Sin embargo, la manipulación de los factores del gonocorismo indiferenciado permitió obtener poblaciones de solo machos, solucionando parcialmente las dificultades productivas debido al mejor rendimiento de canal a comparación de las hembras y evita la presencia de nacimientos (Castillo Campo, 2011). Los factores que tienen una alta influencia en la inversión del sexo fenotípico son la temperatura y las hormonas, siendo la técnica de reversión sexual con andrógeno la más usada y rentable en la piscicultura intensiva de la tilapia en todo el mundo (Baroiller, D’Cotta, Bezault, Wessels, & Hoerstgen-Schwark, 2009). Éste método hormonal es cuestionado por las implicaciones éticas y legales que conlleva la utilización de hormonas en animales para consumo humano. Diversos estudios utilizaron la reversión sexual hormonal para proponer modelos teóricos de determinación del sexo en *O.niloticus* y *O.aureus*; y descubrieron que el genotipo del sexo no se afecta con la reversión sexual fenotípica mediante evaluación de las proporciones de sexos en las progenies (Baroiller & Jalabert, 1989; Muller-Belecke & Horstgen-Schwark, 1995). A partir de estos hallazgos, se crearon los programas de producción monosexo de machos de tilapia por manipulación genética sin el uso de hormonas (GMT®) que consiste en cruzar machos-YY o supermachos con hembras-XX normales generando 100% machos. La primera fase para la producción de supermachos es a partir de hembras funcionales con genotipo de macho conocidas como neohembras-XY.

La técnica más usada para identificar los genotipos de neohembras son las pruebas de progenie, que consisten en evaluar la proporción de sexos mediante cortes histológicos de gónadas en las larvas. De esta manera las progenies cuya proporción sea 3:1(♂:♀) se asume que el genotipo maternal es XY, mientras que las progenies con proporciones 1:1 provienen de un genotipo maternal normal XX (Mair, Abucay, Skibinski, Abella, &

Beardmore, 1997). Las dificultades en el uso de esta técnica para identificar neohembras son: 1) producción de varias generaciones y agrupación de familias que implica tiempo y costo, 2) sacrificio de progenies completas para visualizar espermatoцитos y ovocitos, y 3) la proporción de sexos no siempre obedece a la segregación mendeliana 3:1(♂:♀) dando a entender que la determinación del sexo es más compleja (Cnaani & Kocher, 2008; Shirak, Palti, Cnaani, Korol, & Hulata, 2002).

Estudios citogenéticos con tinción no diferencial concluyen que, para varias especies de tilapia incluyendo *O. niloticus* no existen diferencias cariotípicas visibles de los cromosomas sexuales a diferencia de otras especies de peces y mamíferos (Chalopin, Voff, Galiana, Anderson, & Scharl, 2015; Harvey et al., 2003; Klinkhardt, Tesche, & Greven, 1995; Mair et al., 1997; Majumdar & McAndrew, 1986a). Aún las investigaciones en citogenética molecular sugieren que no hay un solo *locus* determinante del sexo o alelo fijo en la población, sino a un complejo modelo de interacción de genes situados en diferentes grupos de ligamiento para *O. niloticus* (LG1-LG3-LG23) (Cnanni, 2013; Palaiokostas et al., 2015).

Recientemente, algunos autores han propuesto utilizar peces atípicos para identificar genotipos de neohembras pero también se necesita de pruebas de progenie (Alcantar-Vazquez, De la torre, Calzada-Ruiz, & Carolina, 2014). Por esta razón, gran parte de la investigación utilizando las técnicas moleculares y citogenéticas está dirigida a buscar métodos para diferenciar el genotipo de las tilapias de manera rápida sin necesidad de utilizar las pruebas de progenie.

En Colombia el método tradicional para obtener lotes monosexo de machos de tilapia es la reversión hormonal con andrógeno en el alimento y la implementación de nuevas tecnologías de producción de machos en el gremio piscícola es incipiente (FEDEACUA, AUNAP, & MINAGRICULTURA, 2015) aunque en el ámbito académico se conocen las primeras investigaciones de producción e identificación de neohembras por medio de marcadores moleculares (Lopez-Escudero, Alvarez Arcila, & Botero Aguirre, 2013).

El manejo de poblaciones monosexo de machos de tilapia es una solución para las dificultades productivas mostradas por esta especie (Von-Hessberg et al., 2012). Se han desarrollado diferentes métodos para producir poblaciones monosexo de machos (sexaje

por hibridación, poliploidia, ginogénesis, androgénesis, manejo de temperaturas) siendo la reversión hormonal con andrógeno la más utilizada pero muy cuestionada, debido a sus efectos residuales en canales para consumo humano y los residuos circulantes en el medio acuático (Duarte, Silva, & Meirelles, 2002). Aunque las implicaciones éticas y legales del uso de hormonas en la producción animal son diferentes entre países, hay una tendencia mundial a buscar alternativas de producción limpia para proporcionar a la sociedad alimentos sanos (Dunham *et al.*, 2001).

En Colombia no existen restricciones legales para el uso de hormonas en peces destinados a consumo humano, pero para el 2014 se posiciona como el décimo país productor de tilapia en el mundo aportando 97.227 toneladas y 5219 toneladas de tilapia para exportación con una participación del 5,7% de las exportaciones en Sur América (FEDEACUA *et al.*, 2015) cuyos principales destinos de exportación son USA y Europa. El futuro de la exportación de tilapia colombiana se verá obligada a corto plazo a modificar sus métodos de producción libre de hormonas para cumplir con los requisitos legales que se están implementando en los países importadores.

Por esta razón, la tecnología GMT (*Genetically Male of Tilapia*) se convierte en una alternativa viable para producir lotes monosexo de machos de tilapia sin el uso de hormonas. Pero como primer paso es necesario identificar neohembras, evitando emplear pruebas de progenie, de una manera más rápida mediante la citogenética clásica y molecular. Los estudios recientes usando técnicas de citogenética molecular han ayudado a explicar y rebatir las conclusiones de los anteriores estudios que utilizaban como parámetro de respuesta las pruebas de progenie (Cnanni, 2013).

De acuerdo a las justificaciones anteriormente expuestas se propone: 1) Producir un núcleo de neohembras para un futuro de programa de producción monosexo de tilapia nilótica en el Valle del Cauca, 2) Utilizar técnicas de citogenética clásica y molecular para detectar neohembras rápidamente.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General

Detectar el genotipo sexual de neohembras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) producidas mediante feminización hormonal, utilizando técnicas de citogenética clásica y molecular en el Valle del Cauca.

1.2. Objetivos Específicos

- Producir neohembras (XY) de *Oreochromis sp.*, mediante la feminización hormonal de una población de larvas.
- Estandarizar la técnica de cultivos de linfocitos en *Oreochromis sp.*, para obtener cromosomas en metafase de las hembras feminizadas y el grupo control.
- Aplicar técnicas de bandeo cromosómico como G, C, NOR y Q a las metafases obtenidas para encontrar diferencias entre las hembras feminizadas y el grupo control.
- Estandarizar la extracción de ADN a partir de aleta de las hembras feminizadas y del grupo control mediante kit de extracción comercial y la reacción de cadena de la polimerasa para la amplificación del microsatélite UNH898.

- Identificar un alelo y/o genotipo frecuente en la población de machos de *Oreochromis* sp, para sintetizar una sonda y emplear la técnica FISH en los cromosomas metafásicos en las hembras feminizadas y grupo control.

- Diferenciar el genotipo de hembras feminizadas de *Oreochromis* sp., (XY) y de hembras normales (XX) mediante señales de hibridación en una región asociada a la determinación del sexo.

2. MARCO DE REFERENCIA

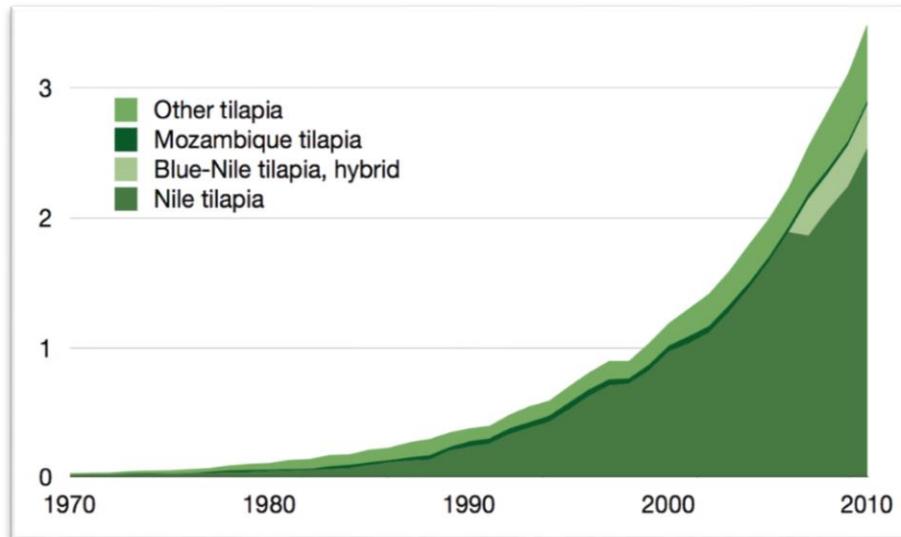
2.1. Situación actual de la tilapia en la acuicultura del mundo

La producción acuícola mundial ha seguido creciendo, y ha pasado de ser casi insignificante a equipararse totalmente a la producción de la pesca de captura en cuanto a la alimentación de la población en el mundo (FAO, 2016). En el año 2012 la producción acuícola mundial alcanzó su nivel máximo de 41,9 millones de toneladas (FEDEACUA et al., 2015). La piscicultura representa el 16,6% del aporte de proteínas animales de la población mundial, siendo considerado como una fuente valiosa de proteínas y nutrientes esenciales para tener una nutrición equilibrada y buena salud (Castillo Campo, 2006).

La producción mundial en 2014 fue de 49,8 millones de toneladas de peces de escama, que representó el 44,1 % de la producción total de la pesca de captura y la acuicultura; una cifra superior al 31,1 % registrado en 2004 y 42,1 % alcanzado en 2012 (FAO, 2016). La acuicultura de tilapia es la más extendida del mundo, pues debido a su adaptabilidad se producen en todos los continentes (Figura 2-1)(Espinal G, Martínez C, & Gonzales Rodriguez, 2005).

Se producen algunas especies de tilapia a nivel comercial, sin embargo, las principales especies de tilapia más producidas en el mundo son la tilapia del nilo que representa un 82,11% de la producción mundial y la tilapia roja con 16,46% (FAO, 2016).

Figura 2-1. Producción de tilapia por especies en millones de toneladas



Fuente: FAO (2016)

2.2. Situación actual de la tilapia en la acuicultura colombiana

La tendencia de crecimiento de la acuicultura en Colombia durante el período 1990 - 2011 fue muy positiva al pasar de 9.200 toneladas en 1990 a 82.733 en 2011, es decir, un 12% anual promedio y con una tendencia creciente en el cultivo de camarón. Pero la acuicultura continental es únicamente piscicultura y está representada principalmente por la producción de tilapia, cachama, trucha y algunas especies nativas (Merino, Bonilla, & Bages, 2013).

La producción total de la piscicultura en el año 2011 representó un 89,7% de la producción de la acuicultura, y a su vez el 51,77% de ésta corresponde a la producción de tilapias roja y plateada (Merino et al., 2013). Es decir, que la piscicultura nacional se concentra en la producción de tilapia roja y nilótica debido

a que muestran una mayor dinámica en producción y participación en el mercado (Figura 2-2).

Figura 2-2 Especies piscícolas continentales producidas en Colombia

Especies más cultivadas en Colombia		
Especie	Producción (Ton)	% Participación
Tilapia roja	41.732	51,77
Tilapia plateada	10.913	13,54
Cachama	17.308	21,47
Trucha	6.121	7,59
Otras especies	4.535	5,63
TOTAL	80.609	100,00

Fuente: FEDEACUA *et al.*, (2015).

Los principales núcleos productores de tilapia son Huila (42,96 %), Meta (14,59%) y Tolima (11%). Éstos tres departamentos producen el 60% del total nacional, mientras que el 40% restante se encuentra en departamentos como Antioquia, Caquetá, Córdoba, Cundinamarca, Santander y Valle del Cauca (Usgame, Usgame, & Valverde, 2008).

Los principales productos derivados de la tilapia en Colombia es la tilapia entera fresca, tilapia eviscerada fresca para consumo nacional y participa en mercado internacional con el filete de tilapia fresco pues los productos congelados no logran los niveles competitivos de otros países proveedores (Merino *et al.*, 2013).

Para el año 2014 se posicionó como el décimo país productor de tilapia en el mundo aportando 97.227 toneladas y 5219 toneladas de tilapia para exportación con una participación del 5,7% de las exportaciones en Sur América (FEDEACUA *et al.*, 2015) cuyos principales destinos de exportación son USA y Europa.

2.3. Taxonomía de tilapia roja

Tilapia es la designación genérica de un grupo de peces de la familia Cichlidae, subfamilia Tilapiinae y Tribu Tilapiini que abarca aproximadamente 70 especies pertenecientes a cuatro géneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon*, *Tilapia* y *Danakillia* (Leonhardt, 1997).

Las tilapias de importancia comercial están divididas en tres principales grupos taxonómicos de acuerdo al comportamiento reproductivo: *Oreochromis* que son incubadores bucales maternos, *Sarotherodon* que son incubadores bucales biparentales y *Tilapia* que incuban en sustrato (He, Luo, & Yang, 2015).

La distribución geográfica natural de la tilapia es de África Oriental (cuenca del Nilo), el Congo y el África Occidental (cuencas de los ríos Níger y Senegal), y luego introducida progresivamente a Israel, Sudoeste Asiático, Estados Unidos y América del Sur (Balarin y Hatton, 1979 citado por Leonhardt, 1997).

La tilapia roja se obtuvo de múltiples cruces entre cuatro especies de tilapia: *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* y *Oreochromis hornorum*, para mejorar su coloración; lo que estimuló a productores e investigadores a iniciar un acelerado programa de hibridación permitiendo la obtención de nuevas líneas (strain) de tilapia roja (Castillo Campo, 2011).

De acuerdo a la herramienta de Taxonomía disponible en NCBI (2017) se presenta la clasificación taxonómica para la tilapia roja como organismo modificado:

Dominio: Eucariota
Reino : Animalia
Subreino: Bilateria
Rama : Deuterostomia
Infrareino: Chordonia
Phylum: Chordata
Sub Phylum: Vertebrata
Infra Phylum: Gnathostomata

Superclase: Osteichthyes

Clase : Actinopterygii

Orden : Perciformes

Suborden: Percoidei

Familia: Cichlidae

Género: *Oreochromis*

Especie: *Oreochromis* sp (red tilapia)

2.4. Características biológicas

Las características morfológicas externas de la tilapia roja son cuerpo comprimido y discoidal, boca protractil con labios prominentes, mandíbulas con dientes, no poseen bandas en la aleta caudal y la coloración es naranja con tonalidades rojizas (Figura 2-3). Las especies de tilapia son territoriales y habitan en una gran diversidad de cuerpos de agua con preferencia por aguas lenticas y de poca profundidad. Los rangos óptimos de temperatura oscilan entre 20-30 °C (aunque pueden soportar temperaturas menores) y rangos de altitud de 850 a 2000 m.s.n.m. Las tilapias son especies rústicas y adaptables debido a que toleran bajos niveles de oxígeno y pH alcalinos. Los hábitos alimenticios del género *Oreochromis* son omnívoros, razón por la cual aceptan fácilmente los alimentos suministrados artificialmente.

Figura 2-3. Morfología externa de la tilapia roja *Oreochromis* sp



Fuente: Castillo Campo (2011)

2.5. Ciclo reproductivo y diferenciación sexual

El género *Oreochromis* presenta dimorfismo sexual externo, que consiste en que el macho presenta dos orificios (ano y el orificio urogenital también denominado papila urogenital), mientras que la hembra presenta tres orificios (ano, el poro genital y el orificio urinario); se pueden observar a simple vista empleando azul de metileno al 1% (Alcántar Vázquez, Rueda Curiel, Calzada Ruiz, Antonio Estrada, & Moreno de la Torre, 2015).

La tilapia es un pez de una alta eficiencia reproductiva, debido a que alcanza su madurez sexual a temprana edad (3 a 4 meses) y pequeño tamaño, el número de huevos por desove varía de 200 a 2500, y la eclosión se produce de 3 a 5 días, con tasas de mortalidad menores del 5% (Saavedra, 2006). Las hembras incuban en la boca, y hasta después de la eclosión presentan cuidado parental. Esta precocidad reproductiva propia de la especie y la particularidad de las hembras incubadoras genera problemas en la producción a gran escala de la tilapia, debido a la disparidad en los lotes por reproducción indeseada y menores tasas de desarrollo muscular de las hembras (Von-Hessberg, Quintero-Grajales, & Restrepo-Murillo, 2012).

Los procesos de diferenciación sexual en ésta especie son del tipo gonocorismo indiferenciado, donde la gónada indiferenciada en las primeras etapas de vida del organismo se desarrolla en una gónada ovárica, y mediante diversos estímulos externos (temperatura, sustancias químicas, etc.) desarrollan gónadas de machos y hembras en diferentes proporciones. Mientras que las especies gonocóricas diferenciadas desarrollan directamente testículos y ovarios como los mamíferos (Sarasquitez, González, & Muñoz-Cueto, 1999). Esta particularidad de diferenciación sexual permitió la obtención de poblaciones monosexo de machos en el grupo de peces como las Tilapias y Salmónidos eliminando las dificultades reproductivas para su producción a gran escala, mediante el uso de hormonas masculinas y femeninas, respectivamente (Leonhardt, 1997).

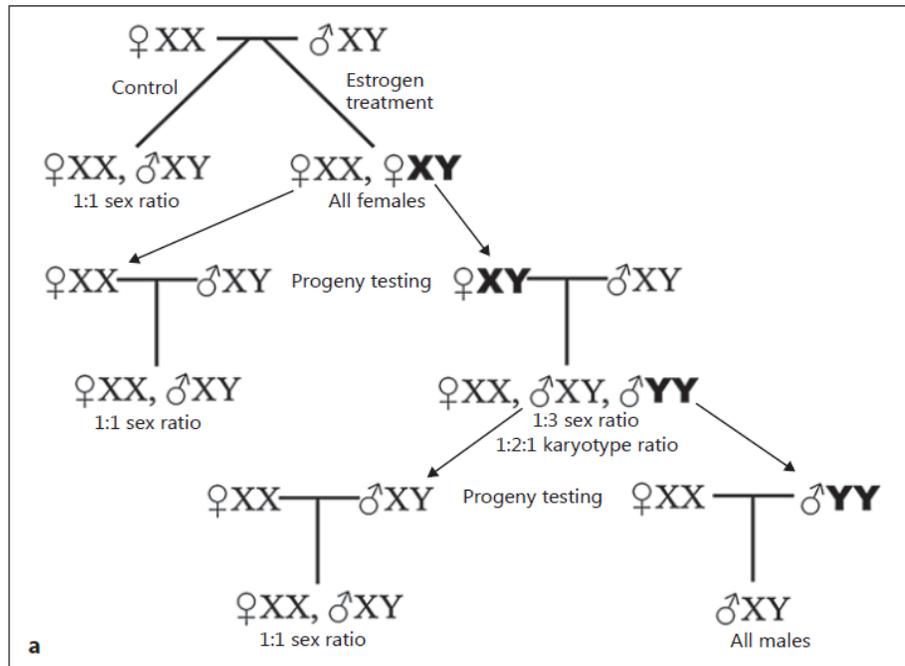
2.6. Obtención de poblaciones monosexo de machos en tilapia

La tilapia es una de las especies ícticas de agua dulce más explotadas en el mundo, por ende gran parte de la investigación en acuicultura está dirigida al desarrollo de poblaciones monosexo de machos (Abucay & Mair, 2004). Se han desarrollado diferentes métodos para éste propósito tales como: sexaje por hibridación utilizando los dos mecanismos de determinación sexual en tilapias XX/XY y ZW/ZZ, poliploidia, manipulación de los cromosomas sexuales por ginogénesis o androgénesis, manejo de temperaturas y el tratamiento con hormonas (Cnanni, 2013). Éste último método es el más utilizado en las producciones de gran escala en el mundo por el alto porcentaje de machos obtenidos, pero también condujo al planteamiento de programas para producción de supermachos mediante manipulación genética sin utilización de hormonas. Como resultado de estas investigaciones se desarrolló la tecnología GMT (Tilapia genéticamente macho), la cual permite la producción de supermachos de tilapia homogaméticos YY que al cruzarlos con hembras homogaméticas XX generan una progenie 100% machos (Mair et al., 1997) (Figura 2-4).

Esta tecnología está basada en la hipótesis de predominancia monofactorial de la determinación del sexo y consta de dos fases: 1) feminización hormonal de una progenie para producir 100% de hembras con genotipos XY/ XX, donde el 50% esperado, se refiere a hembras funcionales con genotipo XY llamadas neohembras y 2) cruzamiento de machos XY con las neohembras identificadas en la fase uno, donde se obtienen tres diferentes genotipos XX/XY/YY de los cuales se espera un 25% de machos con genotipo YY de acuerdo a la segregación mendeliana.

Dentro del programa GMT, Beardmore, Mair, & Lewis (2001) desarrollaron un esquema para la producción masiva de supermachos de tilapia y la conservación del stock de reproductores YY, que implica la producción de numerosas generaciones para identificar los genotipos por medio de pruebas de progenie.

Figura 2-4. Programa para obtención de supermachos en tilapia



Fuente: Cnanni (2013)

Las pruebas de progenie utilizan el método de squash gonadal propuesto por Guerrero & Shelton (1974) mediante inspección de las gónadas en cortes histológicos de una muestra representativa de alevines sacrificados. De acuerdo a la proporción de sexos encontrada se asigna el genotipo, las progenies cuya proporción de sexos sea 3:1 (♂:♀) indica que hay un genotipo maternal XY que corresponde a las neohembras, mientras que las proporciones de las progenies cuyo genotipo maternal sea XX o hembras normales se espera que sea de 1:1. Diversos autores han desarrollado programas de producción de supermachos a partir de pruebas de progenie en *O. niloticus* (Baroiller & Jalabert, 1989; Mair et al., 1997; Mair, Scott, Penman, Skibinski, & Beardmore, 1991) y *O. mosambicus* (Varadaraj & Pandian, 1989; Yang et al., 1980).

Además, el tratamiento hormonal permitió a los investigadores estudiar la complejidad de los dos mecanismos propuestos de determinación sexual en tilapias (Cnanni, 2013). Mair et al., (1991), llevaron a cabo experimentos con *O. aureus* y *O. niloticus* evaluando las proporciones de sexos de las progenies y encontraron evidencias de un genotipo materno

heterogamético y genotipo materno homogaméticos, respectivamente. Sin embargo, en estos estudios se encontraron desviaciones en las proporciones de sexo esperadas lo que sugiere la influencia de otros factores para la determinación del sexo. Los autores atribuyen este factor a la acción de un gen recesivo autosomal (Ff) epistático.

Los estudios recientes utilizando biología molecular y citogenética molecular ayudaron a explicar las conclusiones de los estudios que utilizaron la proporción de sexos en las progenies de las últimas 5 décadas (Cnanni, 2013).

2.7. Citogenética clásica como herramienta de identificación sexual en peces

Los estudios de citogenética clásica han proporcionado información valiosa sobre las relaciones evolutivas entre especies de peces, la aparición de especies crípticas y complejos de especies, el mecanismo de la determinación del sexo y la evolución de los cromosomas sexuales, la distribución de las regiones organizadoras del nucléolo, los cromosomas supernumerarios, la existencia y la relación del entre poliploidía y la evolución (Oliveira, Foresti, & Hilsdorf, 2009).

Los peces son los animales que presentan el más amplio mecanismo de determinación sexual, en los que se incluyen hermafroditismo, unisexualidad (hembra que producen una descendencia de hembras por ginogénesis o hibridogénesis), bisexualidad y en otros casos mediado por el medio ambiente, hormonas, etc. (Burbano, 2002). Los cromosomas sexuales son conocidos para aproximadamente 50 especies de peces neotropicales empleando técnicas simples de coloración homogénea y técnicas de bandeamiento cromosómico (Claudio Oliveira & Nirchio, 2006).

Los sistemas de determinación sexual reportados en la literatura corresponden a sistemas simples XX/XY; ZW/ZZ y XX/XO, hasta sistemas complejos compuestos por varios pares de cromosomas con rearrreglos cromosómicos entre cromosomas sexuales y autosomas

($X_1X_1X_2X_2/X_1X_1X_2$; $ZW_1, W_2/ZZ$; $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2,Y$) (Burbano, 2002). En el caso del género *Oreochromis*, no se han encontrado hallazgos de cromosomas sexuales pero mediante el proceso de tratamiento hormonal (andrógenos y estrógenos) y pruebas de progenie, se determinó que el mecanismo de determinación sexual para *O. mossambicus* y *O. niloticus* corresponde a XX/YY, donde el macho es heterogamético; y para *O. urolepis hornorum* y *O. aureus* corresponde a ZZ/WZ donde la hembra es heterogamética (Mair et al., 1991).

La técnica de bandeo C ha mostrado ser muy útil en los estudios citogenéticos de peces, permitiendo la identificación de las regiones de heterocromatina constitutiva, formadas por ADN altamente repetitivo. Esta heterocromatina generalmente no contiene genes mendelianos, no es transcripta y se replica tardíamente en la fase S, lo que explica el hecho de que variaciones en las bandas C parecen no afectar el fenotipo (Claudio Oliveira & Nirchio, 2006).

En términos de composición, las bandas C están normalmente constituidas por secuencias satélites, mientras que algunos segmentos banda C positivos están constituidos por retroelementos (Ziegler et al., 2003). Las bandas C son, por lo tanto, importantes marcadores cromosómicos debido a su universalidad, diversidad y variabilidad, posibilitando la identificación de cromosomas homólogos en el cariotipo, la identificación de patrones diferenciales de heterocromatina constitutiva entre individuos, poblaciones y/o especies. Además representan una técnica simple para diferenciar los cromosomas del complemento A de los supernumerarios (Claudio Oliveira & Nirchio, 2006).

A partir de los estudios realizados por Singh *et al.* (1980), en cromosomas sexuales de serpientes, relacionan los bloques de heterocromatina constitutiva (secuencias de ADN altamente repetitivas) a un solo sexo por lo regular el masculino, cuando se analizan por la técnica de bandeo c. La presencia de regiones heteromórficas en el cromosoma resulta en una restricción en el proceso de recombinación entre los originalmente homólogos, aislando la región que incluye genes involucrados en la determinación del sexo (Foresti, Oliveira, Galetti, & Almeida-Toledo, 1993). La mayoría de las hipótesis coinciden en que las etapas iniciales de diferenciación implicaron la supresión de la recombinación en la región determinante del sexo (Griffin et al., 2002).

Para Cioffi, Camacho, & Bertollo (2011), la diferenciación del sistema ZW está frecuentemente correlacionada con mecanismos de heterocromatización, mientras que la evolución de sistemas múltiples resulta de reordenaciones estructurales de cromosomas, principalmente del tipo translocación. En los casos donde hay cromosomas XY, el cromosoma Y exhibe, en general, un tamaño menor que el X en la mayoría de los casos estudiados, y no se evidencia una aparente heterocromatinización del Y.

Entre los casos de diferenciación sexual empleando patrones de bandeo C, en peces neotropicales se encuentran los reportes en los géneros *Hoplias*, *Eigenmannia*, *Leporinus*, *Apareidon*, *Eigenmannia*, *Parodon* y *Pseudotocinclus* (Claudio Oliveira & Nirchio, 2006).

Por su parte, el bandeo G y Q son las técnicas más comúnmente utilizadas para la identificación de cromosomas (elaborar cariotipo) y para identificar anomalías del número de cromosomas, translocaciones de material de un cromosoma a otro y deleciones, inversiones o amplificaciones de segmentos cromosómicos (Bickmore, 2001). Las comparaciones de los patrones de bandas cromosómicas pueden confirmar las relaciones evolutivas entre especies, identificar una especie y/o individuo (citotipos) y también revelar cambios en el cariotipo importantes en la especiación (Bickmore, 2001).

Mediante patrones de bandeo G, Silva, (2001) identificó el mecanismo de determinación sexual en bocachico (*Prochilodus reticulatus*) que corresponde a un sistema ZZ/ZW. Otro ejemplo, es la identificación de patrones de bandeo G diferentes entre dos especies de bagre rayado y bagre tigre (*Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum*), que permitió evidenciar la viabilidad y posibles consecuencias de la hibridación entre éstas dos especies, como son su inestabilidad y difícil manejo en condiciones controladas (Camacho, 1999).

Otra técnica de bandeo estructural es la denominada NORs (Regiones Organizadoras del Nucléolo), constituidas por secuencias de genes ribosomales responsables de la transcripción, que aun estando localizadas en distintos cromosomas se asocian íntimamente (Nirchio & Oliveira, 2014). En los peces, éstas regiones por lo regular, se han encontrado en constricciones secundarias en los cromosomas, o distribuidas en varios

cromosomas del complemento cuyas características de localización son específicas para algunos grupos taxonómicos; por lo que se considera un buen marcador para la identificación de la especie (Claudio Oliveira & Nirchio, 2006).

En el caso del género *Oreochromis*, la mayoría de especies tienen 22 pares de cromosomas, pero como la mayoría de peces no presentan dimorfismo sexual en sus cromosomas. Por lo tanto, no es posible observar diferencias en el cariotipo con tinción homogénea (Cnanni, 2013; Harvey et al., 2003; Klinkhardt et al., 1995; Mair et al., 1997; Majumdar & McAndrew, 1986a).

Ante esta situación, Foresti, Oliveira, Galetti, & Almeida-Toledo (1993) estudiaron el complejo sinaptonémico (SC) en espermatoцитos de machos y ovocitos de hembras de *O. niloticus*, encontrando segmentos no apareados en las regiones terminales del bivalente más grande (cromosoma 1 ó LG3) presumiblemente asociado a la condición heterogamética; después un estudio realizado por Carrasco, Penman, & Bromage (1999) logró evidenciar mediante microscopia electrónica ésta condición heterogamética en machos con genotipo XY comparándolos con los genotipos homogaméticos XX /YY que presentaban apareamiento total del bivalente más grande por el análisis de SC. Más tarde, varios autores desarrollaron estudios similares observando el SC durante la meiosis de *O. niloticus* y *O. aureus* cuyos resultados son consistentes con los primeros estudios y sugieren que existe una heteromorfismo en el primer par de cromosomas posiblemente relacionada a un ancestro común antes de la especiación y al desarrollo de los diferentes mecanismos de determinación sexual en las especies de tilapia (Campos-Ramos et al., 2002; Cnanni, 2013; Ocalewicz, Mota-Velasco, Campos-Ramos, & Penman, 2009).

2.8. Citogenética molecular como herramienta de identificación sexual en peces

Conforme las técnicas de biología molecular avanzaban, la citogenética evolucionó adaptando en sus principios éstos avances, lo que se conoce hoy como citogenética molecular, que consiste en detectar secuencias específicas de ADN o ARN en células en

metafase o interfase mediante sondas marcadas con un compuesto fluorescente que son observadas en un microscopio de fluorescencia (Waters & Wolff, 2000). La secuencia marcada se une a la célula por complementariedad de bases nitrogenadas.

La principal técnica en citogenética molecular es la *Hibridación Fluorescente in Situ* (FISH) desarrollada en 1988 empleando sondas radioactivas, y posteriormente se desarrollaron métodos de marcación no radioactivos como fluorocromos o haptenos, inclusive facilitando la marcación simultánea de varias secuencias de ADN (Fan, 2002; Gall, 2016). Estas sondas se pueden marcar mediante dos formas: 1) marcaje directo donde la molécula fluorescente se une directamente en la secuencia de ácidos nucleicos, 2) marcaje indirecto donde la molécula fluorescente se une a un hapteno (biotina/digoxigenina) y posteriormente se une a la secuencia por métodos citoquímicos, formando una especie de "sándwich" (Waters & Wolff, 2000). Entre los tipos de secuencias que se pueden utilizar como sondas están: DNA doble cadena, DNA de cadena sencilla, RNA y péptidos de ácidos nucleicos; y entre los métodos de marcación de las secuencias están: reacción en cadena de la polimerasa o PCR, Nick-translation o marcaje terminal (Fan, 2002). Además la técnica de FISH se ha adaptado para emplearse en diferentes tipos de muestras como tejidos fijados, tejidos embebidos en parafina, células en suspensión, cromosomas en metafase ó núcleos interfásicos de células (Galetti, Aguilar, & Molina, 2000).

FISH es una técnica complementaria a la citogenética clásica, dirigida a determinados cromosomas, por lo tanto es necesaria la información preliminar obtenida mediante técnicas de bandeo cromosómico (Pinton *et al.*, 1998).

En *Poecilia reticulata*, se confirmó mediante FISH el par sexual del tipo XX/XY utilizando una sonda específica con repeticiones de dinucleótidos (GACA) que hibridó en la región heterocromática del cromosoma Y, que anteriormente se había identificado mediante bandeo C (Nanda *et al.*, 1990).

En el género *Oreochromis* algunas investigaciones se han dirigido a caracterizar y aislar secuencias de ADN satélite en el genoma de la tilapia del nilo en busca de patrones específicos para el sexo, impulsados por la evidencia encontrada con el bandeo C, que localiza la heterocromatina a lo largo y alrededor de los centrómeros (Majumdar &

McAndrew, 1986b; C. Oliveira & Wright, 1998). Más tarde, mediante la técnica FISH Ferreira & Martins (2008) encontraron patrones para machos y hembras en el cromosoma No. 1 de *O. niloticus* empleando sondas de ADN satélite altamente repetitivo (tipo SATA, LINE, SATB asiladas de *O. niloticus* y otras especies de peces), sin embargo, dichos patrones no obedecen a una diferenciación en un cromosoma del par o bloques compactos en el cromosoma de acuerdo al modelo de determinación de *O. niloticus* (XX/XXY) sino a un tipo distribución de secuencias satélite a lo largo del par de cromosomas en machos y hembras.

Harvey, Powell, Kennedy, McAndrew, & Penman (2002) retiraron por microdissección los cromosomas del primer par con el fin de probar mediante FISH que la diferenciación sexual en *O. niloticus* tiene lugar en los cromosomas del primer par. El cromosoma Y para las pruebas de hibridación fue extraído por microdissección de metafases con genotipo YY de *O. niloticus* y para hembras el cromosoma X de metafases con genotipo XX. Después, varias copias de los cromosomas diseccionados fueron colectadas y amplificadas por PCR-DOP obteniendo tres sondas Y1, Y2 y X1. Las tres sondas se probaron en metafases de *O. niloticus* con genotipo XY, encontrando que las tres sondas hibridan específicamente en el par de cromosomas 1 y que hibridan para los dos cromosomas sexuales. Para la sonda X1 se encontró que la hibridación tiene lugar solo en el brazo largo del cromosoma 1, mientras que para las sondas Y1 y Y2 la hibridación tiene lugar a lo largo del cromosoma 1, y para la combinación de las tres sondas se observaron diferencias en la hibridación en las dos copias del cromosoma 1; aunque en algunas metafases no se observaron diferencias evidentes. Por lo tanto, los autores concluyen que: 1) existen diferencias de secuencias entre las copias del cromosoma uno, lo que sugiere que el sexo genético en los individuos de *O. niloticus* pueden diferenciarse a nivel molecular 2) el brazo largo del cromosoma 1 en *O. niloticus* es el principal sitio determinante del sexo.

Los anteriores estudios defienden la hipótesis que el par cromosómico determinante del sexo en *O. niloticus* es el No. 1 o cromosoma más grande del complemento. Aunque Lee *et al.* (2011) emplearon sondas construidas en base a marcadores moleculares AFLP's asociados al sexo en *O. niloticus*, encontrando que hibridaban en un par de cromosomas pequeños del complemento.

2.9. Marcadores moleculares ligados al sexo en tilapia

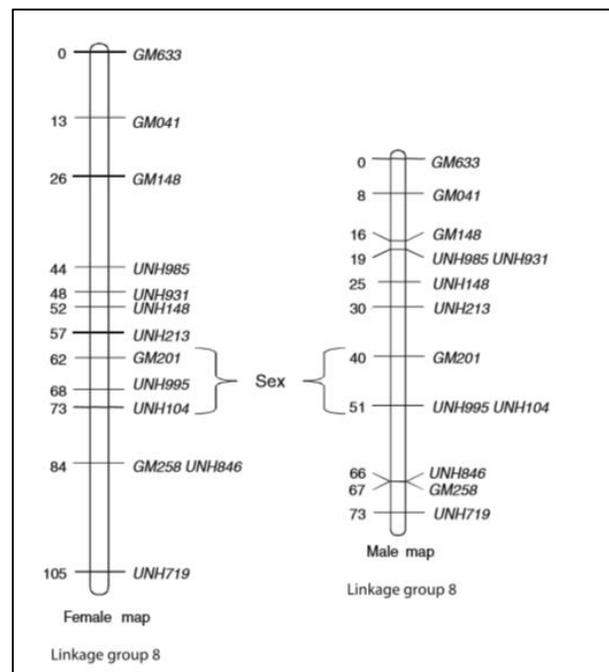
A nivel molecular se encuentran estudios usando marcadores microsatélites y AFLP para generar mapas de ligamiento en *O. niloticus* asociados a caracteres de importancia comercial como color y sexo (Kocher, Lee, Sobolewska, Penman, & Mcandrew, 1998). En un estudio Lee, Penman, & Kocher (2003) encontraron una región determinante del sexo en *O. niloticus* mediante marcadores moleculares microsatélites; sus resultados sugieren que el locus que en su mayor parte es responsable de la determinación del sexo se encuentra a unos pocos centimorgans entre los marcadores UNH995 and UNH104, siendo representativo para dos de tres familias evaluadas (Figura 2-5). Los marcadores del grupo de ligamiento (LG8) mostraron diferencias significativas en frecuencia genotípica entre machos y hembras en la familias 5 y 7, y cuya proporción de sexos fenotípico era consistente con el cromosoma Y. Al analizar la consistencia de los genotipos se encontró que los marcadores GM201, UNH995 y UNH104 corresponden a marcadores diferenciales para hembras y machos, respectivamente. El posible haplotipo Y predijo el sexo fenotípico con precisión del 95% en las familias 5 y 7, el 5% restante de individuos cuyo sexo era contrario a las expectativas pueden ser atribuido a errores en el fenotipo, a la recombinación o la acción de los factores genéticos-ambientales que afectan la determinación del sexo.

Sin embargo, LG8 no tuvo influencia en el sexo de los peces de la familia 2, a pesar de que las tres familias vinieron de la misma población de *O. niloticus*. La familia 2 no parece tener la segregación para el haplotipo Y identificados en las familias 5 y 7. Los autores atribuyen estos resultados a factores adicionales que están segregando en esta población, y refuerza aún más la teoría de que los sistemas que determinan el sexo son altamente polimórficos en este grupo de peces.

Eshel *et al.* (2011) reportan marcadores asociados a los grupos de ligamiento LG 1, 2, 3, 6 y 23 para conocer el de mayor efecto sobre la diferenciación sexual en *O. niloticus*. Inicialmente genotiparon un grupo control (20 hembras y 25 machos sin tratamiento hormonal) utilizando los marcadores moleculares BYL002, UNH159, GM139, GM390 and UNH898, localizados en LG 1, 2, 3, 6 y 23, respectivamente. Obtuvieron una asociación altamente significativa para el marcador UNH898 indicando que el alelo 276 se encontró

exclusivamente en machos (52♂:1♀) y lo denominaron alelo asociado a machos MAA responsable de la diferenciación sexual. Para validar esta hipótesis, realizaron pruebas de progenie en tres familias. La familia A provenía de dos padres segregantes para MAA que produjo 98,6% de machos y 8% de hembras, mientras que las familias B y C provenientes de cruces entre padres no segregantes para MAA produjeron 96 y 100% de hembras, respectivamente. Los autores atribuyen a un efecto genético de LG1 al porcentaje de hembras que se obtuvo en la familia A, como también a la doble recombinación entre UNH898 y el gen determinante del sexo.

Figura 2-5. Marcadores moleculares asociados al sexo en el grupo de ligamiento ocho en tilapia nilótica



Fuente: Lee *et al.*, (2003)

Los mapas de ligamiento generados para algunas especies de tilapia, ubican al microsatélite UNH898 en el grupo de ligamiento No. 23 (LG23) con un tamaño de 1.5Mbp de 101 de la longitud total de LG23, que corresponde a un par de cromosomas pequeños (subtelocéntricos/acrocéntricos) del complemento (Eshel, Shirak, Weller, Hulata, & Ron, 2012). La importancia de éste microsatélite como marcador ligado al sexo en las tilapias es la cercanía de 1cM al gen *amh*, responsable de la producción de la hormona anti-mülleriana, que se conoce en mamíferos que interviene en la regulación de la

esteroidogénesis gonadal al inhibir la expresión de la aromatasa en gónadas en desarrollo (Andrey Shirak et al., 2006; Verneti et al., 2013) (Figura 2-6). Se conoce que el gen *Amh* en las gónadas masculinas de tilapia se expresa entre 10-15 días pos-eclosión y después a los 19 días (Ijiri et al., 2008)

Figura 2-6. Mapa de ligamiento No.23 mostrando la cercanía del marcador microsatélite UNH898 al gen *Amh*

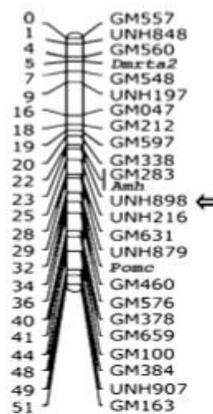


FIGURE 2.—The tilapia linkage group 23. Mapping positions of QTL for sex determination

Fuente: Shirak *et al.*, (2006)

Investigaciones recientes llevadas a cabo por Lee *et al.* (2011) muestran que los cromosomas sexuales están ubicados en el LG1 de la tilapia del nilo mediante marcadores AFLP (GM201 y UNH995), mientras que otro estudio utilizando marcadores QTL ligados al sexo sugieren que se encuentran en el LG23 (Eshel et al., 2011, 2012). Estos resultados están en contradicción con los estudios de Carrasco *et al.*(1999) que atribuye el apareamiento incompleto del cromosoma más grande o LG3 a los cromosomas sexuales de *O. niloticus*; y Ferreira & Martins (2008) cuyos estudios encontraron una patrón diferencial de ADN repetitivo entre hembras y machos de *O. niloticus* también en el par cromosómico No. 1.

Estos hallazgos sugieren que no existe un solo locus que determine el sexo o un alelo fijado en la población, es la acción de varios genes situados en tres grupos de ligamiento, por lo tanto los cromosomas sexuales de la tilapia se encuentran en un estado de evolución (Cnanni, 2013).

3. METODOLOGIA

3.1. Material biológico

El experimento se desarrolló en la Estación piscícola Los Lagos de carácter privado, ubicada en el departamento de Valle del Cauca en el municipio de Ginebra a una temperatura ambiental de 22- 28 °C y a una altura sobre el nivel del mar de 1100 msnm (Alcaldía de Ginebra, 2017). Se utilizaron 1000 larvas que provienen de padrotes de línea pura de *Oreochromis* sp, sin manipulación hormonal previa, obtenidos de un núcleo piscícola en el departamento del Huila, Colombia. Las 1000 larvas se distribuyeron según los tratamientos así: 1) Grupo control (GC): 200 larvas sin tratamiento hormonal ubicadas en una japa de 1m x2m x 0,50m y 2) Grupo tratamiento hormonal (GH): 800 larvas para feminización hormonal alojadas en una japa de 1m x2m x 0,50m. Las japas de los tratamientos se instalaron en lagos independientes para evitar el contacto de la hormona con el grupo control. Los tratamientos fueron evaluados en lagos de tierra, con aireación natural y flujo constante de agua. Se monitorearon los parámetros básicos de calidad de agua durante los 6 primeros meses de levante de los alevines.

3.2. Feminización de la progenie y selección de hembras

Para el GH se suministró un preparado de alimento comercial en harina de 200 micras (Solla®- proteína 45%) con una dosis de 200mg/kg de hormona feminizante natural 17β-Estradiol al 98% (Sigma®) incorporado mediante el método de evaporación del alcohol (Guerrero, 1975). El tratamiento hormonal inició una vez las larvas reabsorbieron su saco vitelino hasta los 30 días de vida. Para GC se suministró alimento comercial sin hormona. Se empleó el programa de alimentación de la piscícola Los Lagos disminuyendo el nivel de proteína así: Alimento iniciación de 45% de proteína suministrado de 1 – 10g de peso

con una frecuencia de 8 – 12 raciones/día, alimento levante de 38% de proteína suministrado de 15-80g de peso con una frecuencia de 9 - 6 raciones/día, alimento iniciación de 32% de proteína suministrado de 80 gr – 300g de peso con una frecuencia de 4 raciones/día. La evaluación se realizó por 365 días hasta que los peces alcanzaron un peso de 300- 450 g. Para esto se realizaron dos pesajes en el año, pero no se midió el efecto de la feminización sobre el crecimiento.

Una vez alcanzado éste peso, solo para GH se realizó sexaje fenotípico manual por inspección de la papila urogenital para conocer el porcentaje de reversión a hembras y descartar los machos; solo las hembras que expulsaron huevos a través de masaje abdominal, presentaban papila normal de hembra y fenotipo característico de hembra (cabeza redondeada, color suave) se seleccionaron como hembras feminizadas funcionales. Se calculó el porcentaje de peces atípicos, es decir peces con papila anormal, que se observó durante la selección de hembras y se descartaron.

3.3. Marcación de los peces y extracción de sangre

De las hembras feminizadas funcionales se seleccionaron el 30% de los individuos de manera aleatoria para formar el GH y para el GC se conformó por 10 machos y 10 hembras sin tratamiento hormonal. A cada grupo se les implantó un microchip debajo de la piel que permitió su identificación. Este código de identificación tiene 8 dígitos numéricos y 2 letras que se visualizaba por un lector de microchips de marca Vetechip®; pero se les asignó una numeración básica del 1-80 (1-60 para el GH y 61-80 para GC) para facilitar la identificación de los peces (Anexo 1). Se realizó un seguimiento de 15 días para evaluar la reacción y sobrevivencia al implante del microchip. Cuando se presentaron mortalidades de los peces marcados, se extraía el microchip del pez muerto y se implantaba en otro ejemplar del mismo tratamiento.

Para la toma de muestra sanguínea, se anestesiaron los peces con aceite de clavo (Eugenol) a razón de 1ml/30L de agua y por punción de la vena caudal se extrajo de 0,5-1ml de sangre adicionando 0,1ml de heparina sódica por cada ml de sangre. Todos los anteriores procedimientos se realizaron bajo las directrices dispuestas por el comité de bioética animal que garantiza el bienestar animal de los animales.

3.4. Cultivo de linfocitos

Previamente, se realizó una evaluación de viabilidad y conteo de linfocitos para conocer el promedio de siembra en el cultivo. Se centrifugaron las muestras a 1200 x 3min para separar las diferentes capas celulares, se tomaron 100µl de muestra de células mononucleares y se agregó 900µl del colorante azul tripano al 0,4% en PBS (Búfer fosfato salino). Después de mezclar por pipeteo para homogenizar la muestra, se transfirieron 400µl en una cámara de Newbauer. Se visualizaron en microscopio óptico con el objetivo 40x y se contaron los cuatro cuadrantes externos para calcular cel/ml y la viabilidad.

Las láminas con cromosomas en metafase se prepararon de acuerdo al protocolo descrito por Camacho y Burbano (1999) con algunas modificaciones a partir de sangre periférica. Se tomó un volumen de 400-500µl de sangre heparinizada a partir de un volumen recolectado de muestra (1-5- 0,5ml) para la preparación del cultivo. Se incubó por 70 horas a 28°C en 4,5ml de medio de cultivo RPMI1640 (Sigma ®), 0,5ml de SFB, 200µl de PHA a una concentración de $1,25 \times 10^{-4}\%$ y 100 µl de solución antibiótica (Penicilina/Streptomina) obteniendo un volumen final de 5ml. En las últimas tres horas del cultivo se adicionó 100µl de colchicina (a una concentración de 12,5µgr/ml) para detener las células en metafase. Se agregó 7ml de solución hipotónica al 0,56% precalentada a 37°C por 30minutos y fijadas en tres recambios de fijador Carnoy 3:1 (metanol: ácido acético). Una vez se obtiene la suspensión celular se gotea en láminas portaobjetos limpias y desinfectadas, sobre un soporte con inclinación de 45°, y luego se dejó secar las láminas cerca de un mechero para evitar que la humedad ambiental afecte la calidad de las metafases.

Para verificar la calidad de las metafases (índice mitótico, condensación de los cromosomas, hinchamiento y extensión celular), las láminas se tiñeron con colorante Giemsa al 2% diluido en buffer fosfato pH 6.8. Las láminas se observaron a 40 y 100X en microscopio óptico marca Carl Zeis y se fotodigitalizaron las imágenes.

Una vez, verificada la calidad de las metafases, los botones celulares en fijador Carnoy de los individuos muestreados (Tabla 3-1) se conservaron a -20°C hasta el procesamiento de bandeos.

Tabla 3-1. Identificación de los ejemplares de *Oreochromis sp.*, muestreados para el cultivo de linfocitos y obtención de las dispersiones cromosómicas.

Tratamiento		# Muestra	Código ID Chip
GH	Hembras feminizadas	1	00076B840C
		4	00076B7048
		6	00076B7B9D
		17	00075B9681
		30	00076B6141
		33	00076B5B89
		42	00076B5CD4
		50	00076B5A63
	TOTAL	8	
GC	Hembras	63	00075BA36A
		62	00075BD48A
		68	00075BD810
		65	00076B743E
		70	00076B7B3D
	TOTAL	5	
	Machos	75	00075BB0CF
		80	00076B7E50
		12	00076B5F98
		55	00075BA370
		72	00075B8850
TOTAL	5		

3.5. Técnicas de bandeos cromosómico

Se aplicaron diferentes técnicas de bandeos cromosómico para encontrar bandas diferenciales entre los genotipos del grupo control y el grupo con tratamiento hormonal. Las técnicas de bandeos empleadas son las descritas y estandarizadas para cromosomas humanos por el Laboratorio de Citogenética del IGUN (Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia – Bogotá) con algunas modificaciones. Se procesaron

7 individuos del GC (4 machos, 3 hembras) y 8 individuos del grupo GH, debido a que se descartaron los individuos que no presentaron buena calidad de metafases.

3.5.1. Bando CBG

Se emplearon láminas envejecidas de 1 día, y se trataron con un solución de HCL 0,4N por 40 minutos. Para eliminar residuos del tratamiento ácido se lavaron las láminas con agua corriente y se sumergieron en un Coplin con agua destilada por 1 minuto. En un soporte de coloración se cubrieron las láminas con una solución de BaOH (hidróxido de bario) saturado al 3% por 21 minutos. Para eliminar excesos del hidróxido, se lavaron las láminas con agua corriente y se sumergieron en un coplin con agua destilada por 1 minuto. Luego, las láminas se sumergieron en un coplin con etanol al 70% y seguidamente a un coplin con etanol al 90% por 5 minutos para cada uno. Una vez se secaron las láminas, se adicionaron 4-5 gotas de 2XSSC sobre toda la superficie y se cubrieron con laminillas, para incubar en cámara húmeda de 2XSSC a 60°C x 16 horas. Transcurrido el tiempo indicado, se lavaron las láminas con agua corriente retirando con suavidad las laminillas que las cubrían y se sumergieron en un coplin con agua destilada por 1 minuto. Nuevamente, las láminas se sumergieron en un coplin con etanol al 70% y seguidamente a un Coplin con etanol al 90% por 5 minutos para cada uno. Las láminas se colorearon con una mezcla al 5% de buffer fosfato pH 6,8 y colorante Giemsa filtrado por 7 minutos. Se realizó un solo lavado fuerte con agua corriente para retirar el colorante.

3.5.2. Bando NOR

A las láminas recién goteadas, se les adicionó de 4 a 5 gotas de una solución de AgNO₃ (nitrato de plata) al 50% y se cubrieron con fragmentos de laminilla para mejorar la penetración del nitrato. Luego, las láminas se incubaron en cámara húmeda de agua destilada a 37°C por 16 horas. Transcurrido el tiempo indicado, se lavaron las láminas con agua corriente retirando con suavidad las laminillas que las cubrían y se secaron. Las láminas se colorearon con una mezcla al 2% de agua destilada y colorante Giemsa filtrado por 8 segundos. Se escurrió el colorante de la lámina sin lavados con agua.

3.5.3. Bando G-W

Se emplearon láminas envejecidas de 1 a 2 días, y luego se secaron a 100°C por 3 horas para fijar los cromosomas. Las láminas se sumergieron en un coplin con HCL al 0,025N y se probaron tres tiempos de exposición al ácido 5, 7 y 10 segundos, considerando que la humedad ambiental fuera menor a 40%. Inmediatamente, se realizó un lavado con agua destilada por 2 minutos para limpiar residuos del ácido y se secó la lámina. Luego fueron sumergidas en un coplin con 1XSSC precalentado a 42°C por 10 y 20 minutos, y se lavaron con agua corriente. Las láminas se colorearon con una mezcla de buffer fosfato pH 6,8 y colorante Wright filtrado en una proporción 3:1 respectivamente por 1:45 minutos. Se realizó un solo lavado fuerte con agua corriente para retirar el colorante.

3.5.4. Bando QFQ

Se utilizaron láminas recién goteadas y se cubrieron por completo con mostaza de quinacrina por 15 minutos. Transcurrido el tiempo indicado, se realizaron 3 lavados fuertes con agua corriente y secado. Se adicionaron 3-2 gotas de buffer fosfato pH 6,8 en una región determinada de la lámina y se cubrieron con laminillas. Para este bando solo se procesaron 2 muestras del GC: Hembra No. 68 y Macho No. 55.

3.5.5. Procesamiento de imágenes y análisis de bandeos cromosómicos

Los mejores campos encontrados en los bandeos, se observaron en un microscopio óptico Axiphot Carl Zeiss con el objetivo de 40x y se foto digitalizaron con el objetivo 100x y ocular 1,6x. Con el programa Lucia Karyotyping® se editaron las imágenes tomadas para mejorar contraste, brillo y transformar el formato de imagen a jpg. Para el bando G, C, y NOR se analizaron 5 láminas por individuo y se foto digitalizaron de 10-20 metafases, a excepción del bando Q donde se analizaron 2 láminas por individuo y se fotodigitalizaron 10- 20 metafases.

Luego, se seleccionaron las mejores dispersiones cromosómicas y se analizaron con las herramientas del software Photoshop CS6 ® para estimar el número cromosómico modal

diploide, se organizaron los cariotipos por orden descendente según el tamaño del cromosoma y la medición de brazos cromosómicos para estimar los parámetros morfométricos de la especie como: fórmula cariotípica utilizando la clasificación según Levan, Fredga, & Sandberg (1964), índice de asimetría (TF%), número fundamental (NF) y tamaño del lote haploide/diploide.

Se analizaron 4 metafases por individuo para tomar las medidas morfométricas, cuya escala de las fotografías fue de 5 μ m a una resolución de 150% y se transformaron de pixeles a micrómetros usando la regla de tres. Se tomaron las medidas de longitud de los brazos p (brazo corto) y q (brazo largo) de cada cromosoma, y se calculó un promedio de los cromosomas homólogos para machos y hembras del grupo control, y para cada individuo del grupo con tratamiento hormonal. A partir de éstos promedios se calculó en el programa Microsoft Excell: la desviación estándar y la longitud relativa de cada par de cromosomas, longitud total de cada par de cromosomas (p+q), proporción de los brazos ($r=p/q$), índice centromérico (i).

3.6. Elección de la sonda específica

Se realizó una revisión de los estudios recientes donde se reporta marcadores moleculares ligados al sexo genético en especies derivadas como *O. niloticus*, y los criterios para su elección fueron:

- Mayor proporción de machos atribuidos al marcador (80-99%)
- El marcador está mapeado a pocos cM de una región determinante del sexo en varias especies de tilapia.
- Trayectoria investigativa del autor y publicaciones en revistas reconocidas internacionalmente.

De acuerdo a esto, se seleccionó el marcador microsatélite reportado por Carleton *et al.*, (2002) y evaluado por (Eshel *et al.*, 2011) denominado alelo asociado a machos o MAA UNH898, que mediante la asociación entre el sexo y los genotipos encontraron un 98,6% de machos de tilapia con MAA contra 8.0% de hembras. Este marcador microsatélite posee una longitud de 237 pares de bases, y cuya repetición de nucleótidos se basa en CA.

3.7. Extracción de ADN para síntesis de la sonda específica

3.7.1. Tipo de muestra

Se tomaron muestras de 35 individuos del GH, 18 individuos del grupo GC (9 hembras y 9 machos), y se cortaron pequeños trozos de aleta dorsal y caudal de forma aséptica, se depositaron en tubos Eppendorf de 2ml con etanol al 90% y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento (Tabla 3-2).

Tabla 3-2. Identificación de los ejemplares de *Oreochromis* sp muestreados para extracción de DNA

Tratamiento	Sexo	Individuo No.	CODIGO ID CHIP
GC	♀	61	00076B6DC5
	♀	62	00075BD48A
	♀	63	00075BA36A
	♀	64	00076B7C00
	♀	67	00076B81D2
	♀	68	00075BD810
	♀	69	00076B585B
	♀	70	00076B7B3D
	♀	79	00076B7DDF
TOTAL	9		
GC	♂	66	00076B6DBF
	♂	71	00075BAA6B
	♂	72	00075B8850
	♂	73	00076B6DC3
	♂	74	00076B6153
	♂	75	00075BB0CF
	♂	76	00076B8418
	♂	80	00076B7E50
	♂	12	00076B5F98
TOTAL	9		

Tabla 3-2. (Continuación)

Tratamiento	Sexo	No. Individuo	CODIGO ID CHIP
GH	Δ♀	1	00076B840C
	Δ♀	4	00076B7048
	Δ♀	6	00076B7B9D
	Δ♀	7	00075BC1A1
	Δ♀	13	00075BA52B
	Δ♀	14	00076B7AD1
	Δ♀	15	00075BCA71
	Δ♀	16	00075BCDCD
	Δ♀	17	00075B9681
	Δ♀	21	00076AABD4
	Δ♀	22	00075BA49D
	Δ♀	26	00075BD6EF
	Δ♀	28	00076B5F05
	Δ♀	30	00076B6141
	Δ♀	31	000759F1EA
	Δ♀	32	00075BD91D
	Δ♀	34	00074CBBC9
	Δ♀	38	00075BA35F
	Δ♀	39	00075BA0B5
	Δ♀	41	00076B750D
	Δ♀	42	00076B5CD4
	Δ♀	44	00076B70C8
	Δ♀	45	00076B6003
	Δ♀	46	00075BB04C
	Δ♀	47	00076B7C81
	Δ♀	49	00076B65E8
	Δ♀	50	00076B5A63
	Δ♀	51	00076B7FBB
	Δ♀	52	00076B576A
	Δ♀	53	00076B81D3
Δ♀	54	00075B8B59	
Δ♀	56	00076B6C80	
Δ♀	57	00076B6001	
Δ♀	58	00076B7525	
Δ♀	59	00075BBFE8	

Total	35
--------------	----

3.7.2. Protocolo extracción

Para la extracción del DNA se empleó un kit de extracción comercial DNeasy Blood & Tissue de la marca Quiagen® a partir de aleta con digestión de proteinasa K, siguiendo el protocolo descrito por Lopez Garcia (2012), para especies de pargo con algunas modificaciones (Anexo 2).

3.7.3. Visualización y cuantificación de la extracción de ADN

Se preparó un gel de agarosa al 0,8% para visualizar el ADN total producto de la extracción con kit comercial; y se cuantificó el ADN utilizando bacteriófago lambda de 30ng/μl para comparar con el tamaño, resolución e intensidad de la banda obtenida de las muestras. Adicionalmente, se cuantificó el ADN de todas las muestras por espectrofotometría para conocer la calidad y pureza mediante los datos de absorbancia para A260/A280 que estuvieran entre 1,8-2, y para A260/230 <1,5 (Anexo No. 4).

3.8. Optimización de la PCR para el marcador UNH898 y verificación de los productos amplificados

Mediante la técnica de PCR (Mullis & Faloona, 1987) se amplificaron todos los individuos a los cuales se les realizó extracción de DNA. Para esto, se tomaron las condiciones de amplificación reportadas por Carleton *et al.* (2002) para el marcador UNH898 disponibles en el GenBank (número de acceso G68215) con algunas modificaciones (Tabla 3-3 y Tabla 3-4). Se emplearon los siguientes primers o cebadores:

- Primer A: GATGTCCCCACAAGGTATGAA (forward)
- Primer B: TAATCCACTCACCCGTTTC (reverse)

Tabla 3-3. Coctel de amplificación para marcador UNH898

Reactivo	Concentración final
dNTPs	200µM
Primers	0,4µM
Taq polimerasa	0.08 unidades/µl
MgCl ₂	1,5mM
DNA tilapia	2µl
Volumen total	25µl

Tabla 3-4. Perfil de amplificación para marcador UNH898

Paso 1	Temperatura °C	Tiempo(Min)	Etapas
1	94	05:00	Desnaturalización inicial
	94	00:30	Desnaturalización
2	55 - 60	00:45	Hibridación
	30 ciclos desde 2		
3	72	0:70	Extensión
	72	10:00	Extensión final

Se verificaron los productos amplificados en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) en TAE corrido a 100V x 45 minutos, con un marcador de peso molecular para verificar que el tamaño de la banda se encontrara entre 200-300pb. Las geles se fotodigitalizaron para verificar la amplificación y descartar posibles contaminaciones.

3.9. Visualización de los productos de PCR, análisis de geles y determinación de tamaño de alelos

Debido al tamaño de los productos amplificados y la presencia de alelos en la población, se empleó un método de visualización de alta resolución en geles de poliacrilamida de acuerdo al protocolo estándar descrito por Sambrook & Russell (2001). De esta manera, se prepararon geles de poliacrilamida al 10% que contenían: 3,3 ml poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 37:1), 2,5 TBE 5X, 7ml de agua miliQ, 90 μ l persulfato de amonio y 16 μ l de TEMED (tetrametiletilendiamina). Para la electroforesis, se cargaron 3 μ l de muestra y 3 μ l de azul bromo fenol con intercalante Gelred. En la mitad de la longitud de los carriles se cargaron dos marcadores de peso molecular de 100pb y 10pb DNA Ladder (Invitrogen, USA) para evitar retrasos en la migración de las muestras; y las muestras de los amplificados se cargaron a los lados de los marcadores evitando cargar muestras en los extremos.

Se corrieron los geles a 140V x 105 minutos en TBE 1X en cámaras de electroforesis vertical para geles de poliacrilamida, posteriormente se revelaron los geles en un transiluminador y se fotodigitalizaron las imágenes.

Una vez obtenidas las imágenes de los geles, se utilizó el programa Image J (National Institute for Health) para mejorar la calidad de las fotografías y convertir a formato Tiff.

Para calcular el tamaño de las bandas y el número de alelos en la población del GC Y GH se empleó el programa Quantity One (Biorad®), que permitió exportar los datos en Microsoft Excell para calcular frecuencia alélica y genotípica de los tratamientos evaluados. Los tamaños de los alelos calculados por el programa pueden tener una variación de ± 5 pares de bases, debido a retrasos en las corridas, por lo cual se convirtió en número entero para su mejor comprensión.

3.10. . Producción de la sonda específica

Para la síntesis de la sonda se utilizó el método de marcaje directo mediante la técnica de PCR, se empleó deoxinucleótidos unidos a una molécula de fluoresceína (dUTP-12-Fluoresceína), cuyo rango de excitación es de 450-490nm de longitud de onda y 515nm de emisión, que corresponde a una fluorescencia de color verde (FITC) detectada con un microscopio de fluorescencia. La sonda se sintetizó a partir de DNA de machos del grupo control, se seleccionó uno de los individuos que presentó el alelo más frecuente, es decir, el alelo que se encontró solo en machos.

3.10.1. Síntesis de la sonda específica

El perfil de amplificación de la PCR para el marcaje de la sonda, fueron las empleadas en la tabla No. 3-2 del capítulo 3,7 de ésta metodología, el coctel de amplificación se modificó al incluir el deoxinucleótido marcado con fluoresceína (Fluorescein -12-dUTP Thermo Scientific®) (Tabla 3-5). A partir del DNA del individuo macho No. 72 del GC que presento un genotipo 260/290, se prepararon 4 reacciones de PCR cada una con volumen final de 25 μ l. Para verificar la amplificación y descartar contaminaciones, se preparó un gel de agarosa al 1,5%.

Tabla 3-5. Coctel de amplificación para producción de la sonda

Reactivo	Concentración final
<i>Tampón PCR</i>	Tris-HCl 10 mM pH 8.5 – KCl 50 mM
dNTPs	200 μ M
dUTP-12-Fluoresceína	25 μ M
Primers	0,4 μ M
Taq polimerasa	1,85 unidades/reacción
MgCl ₂	1,5mM
DNA tilapia	2 μ l
Volumen total	25 μ l

3.10.2. Precipitación de la sonda específica y dilución en buffer de hibridación

Se empleó la técnica de precipitación alcohólica, a los 4 amplificados se les adicionó un volumen de isopropanol, tampón acetato 0,3M y cloruro de magnesio 10mM; luego se incubaron a -20°C durante toda la noche. Los precipitados se recuperaron por centrifugación a 12.000 rpm durante 2 minutos, y se hicieron dos lavados con etanol al 70% (v/v) frío. Los pellets obtenidos con la sonda marcada se reconstituyeron en 25 µl de un buffer de hibridación comercial (LSI/WCP Hybridization Buffer) que contenía 50% formamida, 2XSSC, 10% dextran sulfato pH 7.0.

Adicionalmente, se realizó cuantificación de la sonda específica por espectrofotometría y fluorometría usando como blanco el buffer de hibridación.

3.11. Protocolo FISH

Para llevar a cabo la técnica FISH se diseñó un protocolo modificado tomado de García Cegarra (2010) e IGUN (Instituto de Genética de la Universidad Nacional Sede Bogotá) aplicando co-desnaturalización de la sonda y la muestra (Anexo No. 4). Se procesaron 19 individuos del GH y 13 individuos del GC (6 hembras y 7 machos).

En primera instancia, se sometieron a FISH las láminas obtenidas para el GC, con el fin de confirmar el sexo fenotípico con el genotípico mediante la presencia de señales de hibridación en los cromosomas homólogos No. 23 (cromosomas pequeños), y después las láminas obtenidas para el GH.

Se fotodigitalizaron 4 -5 metafases por individuo en un microscopio de epifluorescencia AxioPlus Carl Zeis® y la edición en los software Lucia Karyotyping® y ZEN® Para analizar las imágenes obtenidas, se clasificaron por ausencia y presencia de señales de hibridación en las metafases de cada individuo, número de señales por metafase y la ubicación de la señal de hibridación en los cromosomas o cromosoma.

4. RESULTADOS

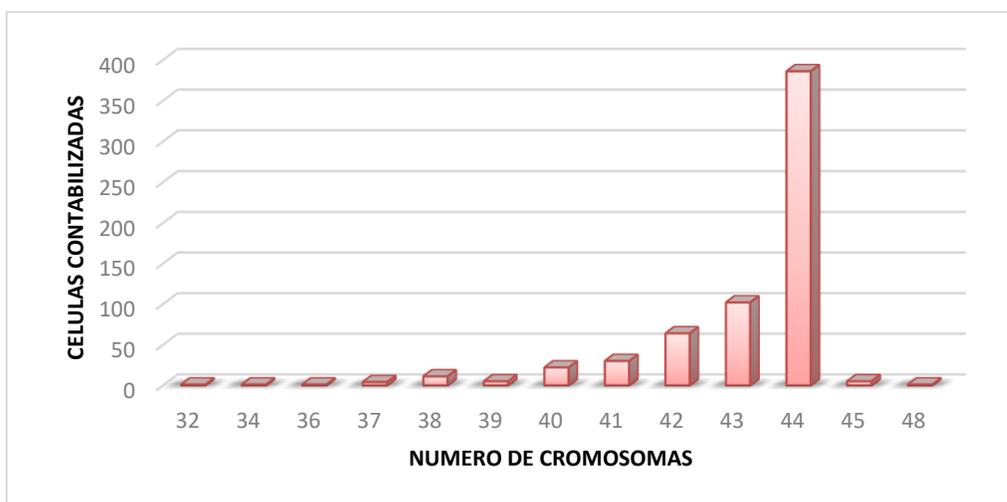
4.1. Feminización hormonal

Debido al intenso fenómeno del Niño presentado entre el año 2015 y mediados del 2016 (IDEAM, 2015) se reporta una alta mortalidad (25%) por la baja disponibilidad de agua, que redujo la población, a 600 peces para el GH y a 150 peces para el GC. Se encontró un porcentaje de feminización del 64.3%, es decir, de 600 peces que se les suministró el tratamiento hormonal 386 se convirtieron en hembras feminizadas funcionales. Por lo tanto se descartó un 35,6% de peces que no tuvieron efecto de la hormona, de los cuales el 5% de éstos correspondían a peces atípicos y el resto machos normales. Se presentó 3% de mortalidad por la reacción al implante.

4.2. Parámetros morfométricos del cariotipo de *Oreochromis* sp.

De las 633 células contabilizadas, los datos mostraron que un 60,98% de las metafases posee un número modal diploide $2n=44$ cromosomas para los dos tratamientos (Figura 4-1). No se encontraron diferencias en el número cromosómico entre tratamientos.

Figura 4-1. Frecuencia del número cromosómico en *Oreochromis* sp



En el Anexo No. 5 se presentan las tablas que contienen los datos morfométricos de los cariotipos analizados para los individuos de los dos tratamientos, mientras que el compendio de estos datos se simplifica en la presentación de la fórmula cariotípica y otras características del cariotipo en las Tablas 4-1 y 4-2.

Se encontraron diferencias entre tratamientos para la fórmula cariotípica de *Oreochromis* sp, utilizando la clasificación de Levan, Fredga, & Sandberg (1964). En el GC, los machos presentan 1 par metacéntrico (m), 1 par submetacéntrico (sm), 16 pares subtlocéntricos (st) y 4 pares telocéntricos (t) (1m+1sm+16st+4t), mientras que las hembras presentan solo 1 par metacéntrico, y más pares telocéntricos que subtlocéntricos (1m+9st+12t) (Tabla 4-1).

En cuanto al GH, se encontraron diferencias en los 8 individuos analizados, que formaron diferentes fórmulas cariotípicas. Los individuos No. 4, 6, 30 y 50 presentan 2sm que no presentan los machos ni hembras, los individuos No. 17 y 33 presentan una fórmula cariotípica muy similar a los machos (1m+1sm+13st+7t), el individuo No. 1 presenta una fórmula muy similar a las hembras (1m+8st+13t) y el individuo No. 42 presenta una fórmula totalmente diferente a los otros individuos (Tabla 4-1).

Tabla 4-1. Formulas cariotípicas en pares cromosómicos de los individuos del grupo GC y GH de *Oreochromis* sp.

Formula cariotípica	Individuos									
	GC		GH							
	♂	♀	Δ♀ 1	Δ♀ 4	Δ♀ 6	Δ♀ 17	Δ♀ 30	Δ♀ 33	Δ♀ 42	Δ♀ 50
Metacéntrico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Submetacéntrico	1	0	0	2	2	1	2	1	9	2
Subtelocéntrico	16	9	8	12	13	13	14	13	12	15
Telocéntrico	4	12	13	7	6	7	5	7	0	4

♂: individuos machos; ♀: individuos hembras; Δ♀: individuos hembras con tratamiento hormonal

Se encontraron diferencias en el número fundamental entre tratamientos y entre los dos sexos que componen el GC. Para el índice de asimetría se encontró que para todos los tratamientos fue menor de TF= 50%, lo que indica cariotipos muy asimétricos. En machos se encontró que el TF es mayor en un 3% comparado con las hembras, sin embargo para éste parámetro los datos son muy homogéneos en toda la población.

Tabla 4-2. Otras características cariotípicas de los individuos del grupo GC y GH de *Oreochromis* sp.

Características cariotípicas	Individuos									
	GC		GH							
	♂	♀	Δ♀ 1	Δ♀ 4	Δ♀ 6	Δ♀ 17	Δ♀ 30	Δ♀ 33	Δ♀ 42	Δ♀ 50
Tamaño set haploide (μm)	12	12	12	11	11	13	11	11	13	10
%TF	18	15	15	17	18	16	18	17	23	19
NF	48	46	46	50	50	48	50	48	64	50

♂: individuos machos; ♀: individuos hembras; Δ♀: individuos hembras con tratamiento hormonal, NF: número fundamental, %TF: índice de asimetría.

En este estudio se tuvo en cuenta los brazos visibles de los cromosomas, aún de los subtelocéntricos debido a que las coloraciones diferenciales empleadas permitieron obtener una buena resolución de los cromosomas ubicando el centrómero para las mediciones. Por lo tanto, se encontró que *Oreochromis* sp presentan un número fundamental que oscila entre NF= 46-64, siendo de NF=48 para machos y NF=46 para hembras debido a la variación de la fórmula cariotípica. Para el GH, se presenta en mayor cantidad el NF=50 (Tabla 4-2).

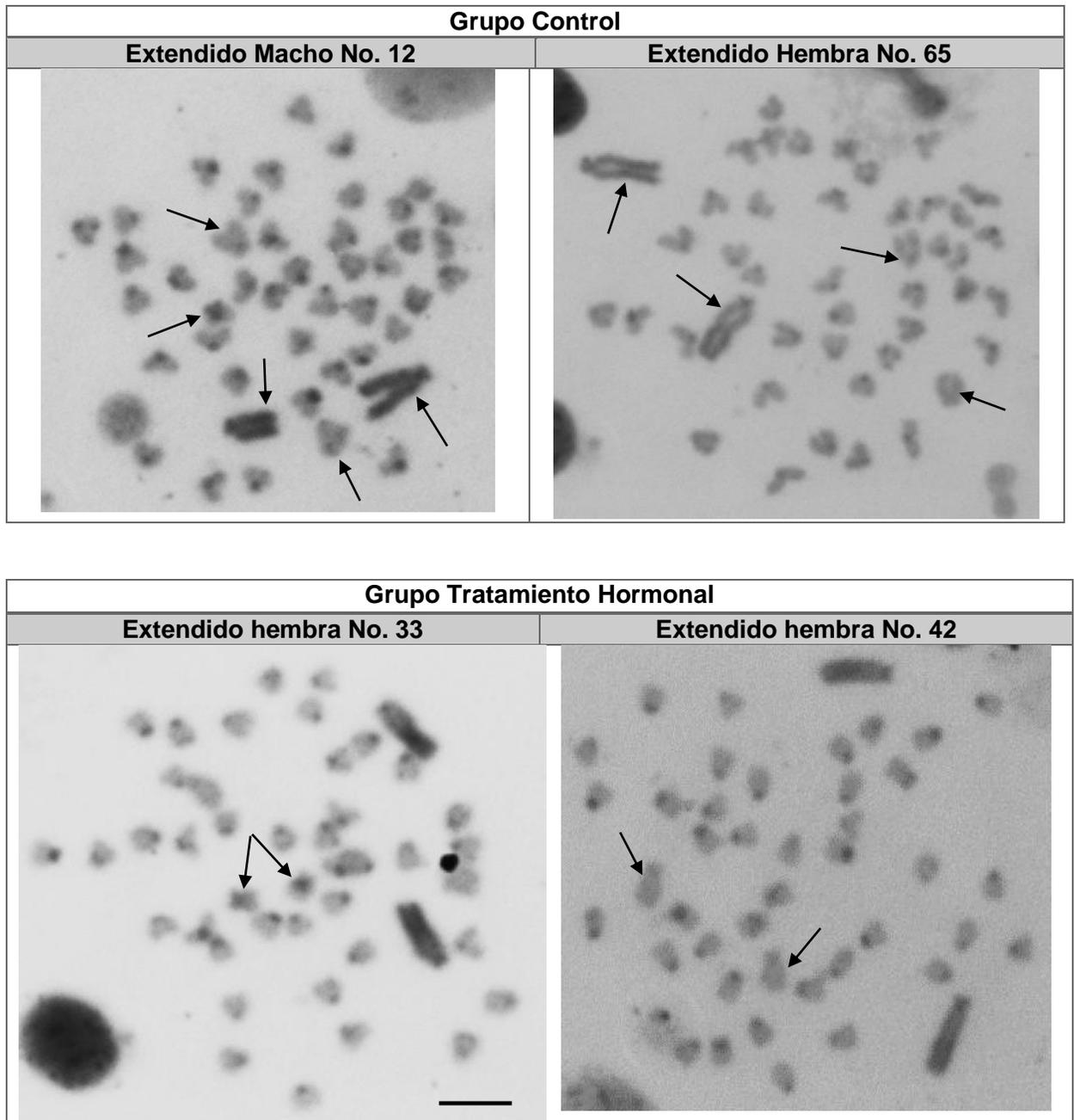
En cuanto, el parámetro tamaño de lote haploide se presentó igualdad para los dos sexos que componen el GC, sin embargo para los individuos del GH se encontró una variación de 10 a 13μm (Tabla 4-2).

4.3. Bandas CBG

Las bandas C positivas de *Oreochromis* sp., analizadas se localizaron en la región centromérica, en la región intersticial o intermedia del par de cromosomas No. 7, en los extremos terminales de los cromosomas telocéntricos y subtelocéntricos, y en la región media de los brazos p de par de cromosomas No. 1 y extremo terminal del brazo q de éste mismo cromosoma como se muestra en la figura 4-2 y el correspondiente cariotipo en la figura 4-3. Se encontró una particularidad en todas las dispersiones cromosómicas de los dos tratamientos, donde el par de cromosomas No. 2 presenta banda c negativas. No se encontraron diferencias en la localización de las regiones de heterocromatina entre los

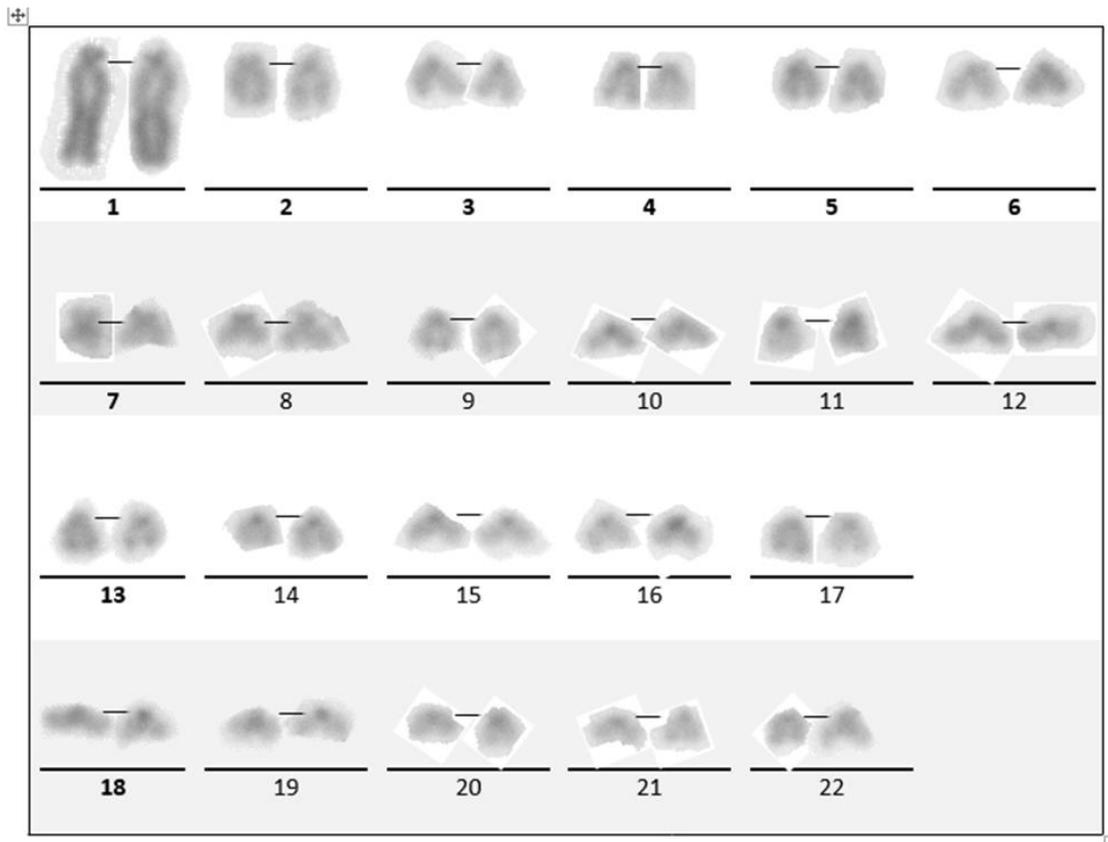
tratamientos, fueron iguales para los tres genotipos hembras, machos y hembras con tratamiento hormonal.

Figura 4-2. Extendidos cromosómicos de los dos tratamientos en *Oreochromis* sp con Bandas CBG



Escala 5µm

Figura 4-3. Cariotipo de una hembra* de *Oreochromis* sp con Bandas CBG



* Hembra No.65

4.4. Bandas NOR

En el presente trabajo se identificaron como portadores de NOR activos un par de cromosomas para los dos tratamientos, a excepción de dos individuos que presentan dos pares de cromosomas con NOR activos (σ^75 y Δ^4). En algunos casos los NOR activos no se presentaron en estado homocigoto, independientemente del tratamiento. Se encontró en todos los casos, que la ubicación de los NOR activos está en los brazos cortos del par de cromosomas metacéntricos No. 7 (Figura 4-4, Figura 4-6). En pocos casos, se encontraron NOR activos muy pequeños a lo largo del cromosoma 1, el cromosoma grande característico del género *Oreochromis*; además se observan asociaciones cromosómicas formando el nucléolo (Figura 4-5). En la Tabla 4-3 se presentan las frecuencias encontradas.

Tabla 4-3. Frecuencia y localización de bandas NOR en cromosomas de *Oreochromis* sp

TRATAMIENTO	INDIVIDUOS	#NOR	CROMOSOMAS Y FRECUENCIA		
GC	♂12	1	7(1)		
	♂55	2	7(2)		
	♂72	1	7(1)		
	♂75	4	7(2)	9(2)	
	♀62	1	7(1)		
	♀65		1	7(1)	
			2	7(2)	
		♀68	2	7(2)	
GH	Δ♀ 1	1	7(1)		
	Δ♀ 4	4	7(2)	9(2)	
	Δ♀ 6	2	7(2)		
	Δ♀ 17	2	7(2)		
	Δ♀ 33	2	7(2)		
	Δ♀ 50	2	7(2)		

Los individuos del GH Δ♀ 30 y Δ♀ 42 se descartaron, debido a que no se encontraron metafases claras con bandeo NOR.

Figura 4-4. Extendidos cromosómicos de los dos tratamientos en *Oreochromis* sp con
Bandas NOR

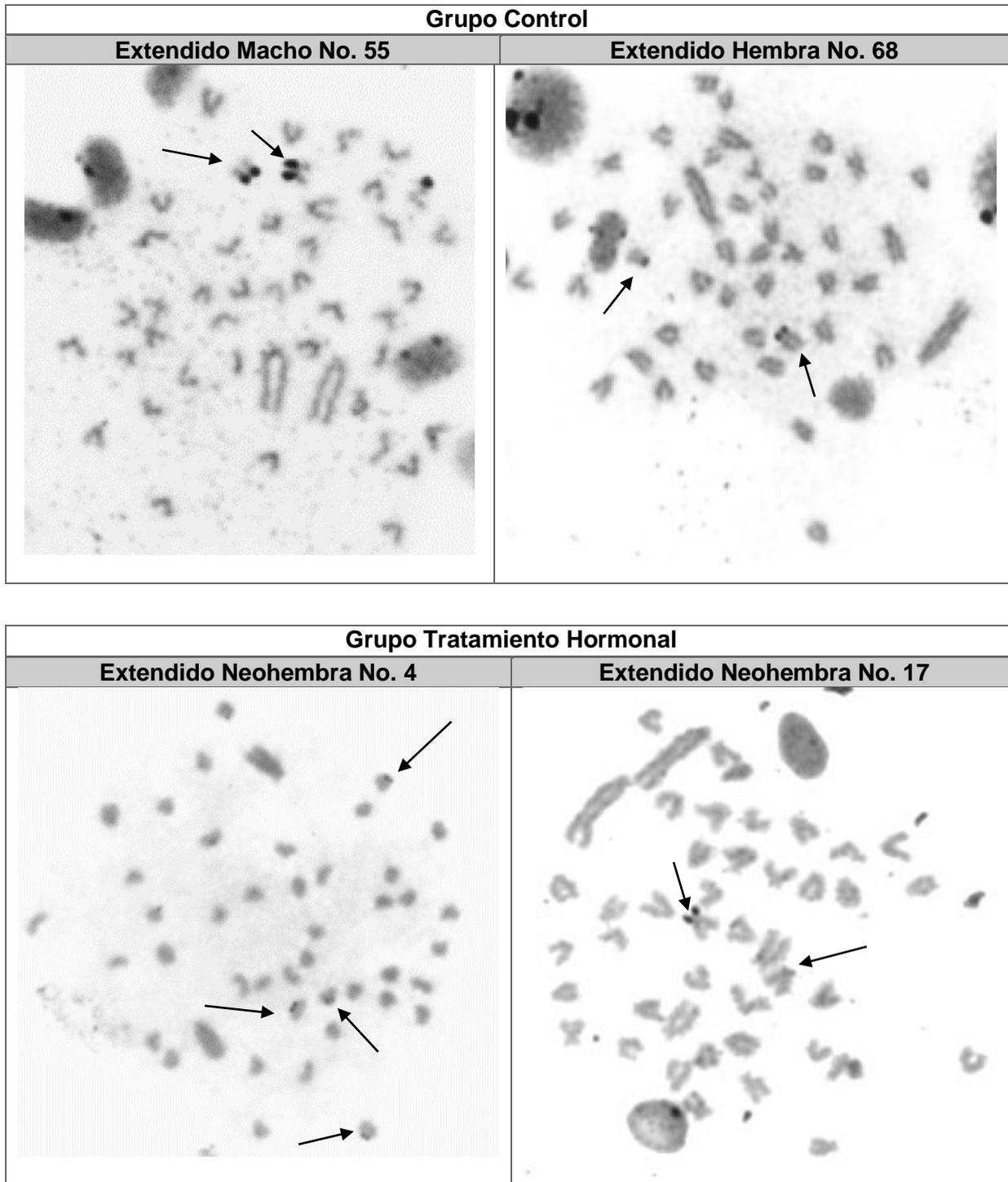


Figura 4-5. Extendidos cromosómicos del cromosoma 1 en *Oreochromis* sp con Bandas NOR y asociación NOR en núcleos

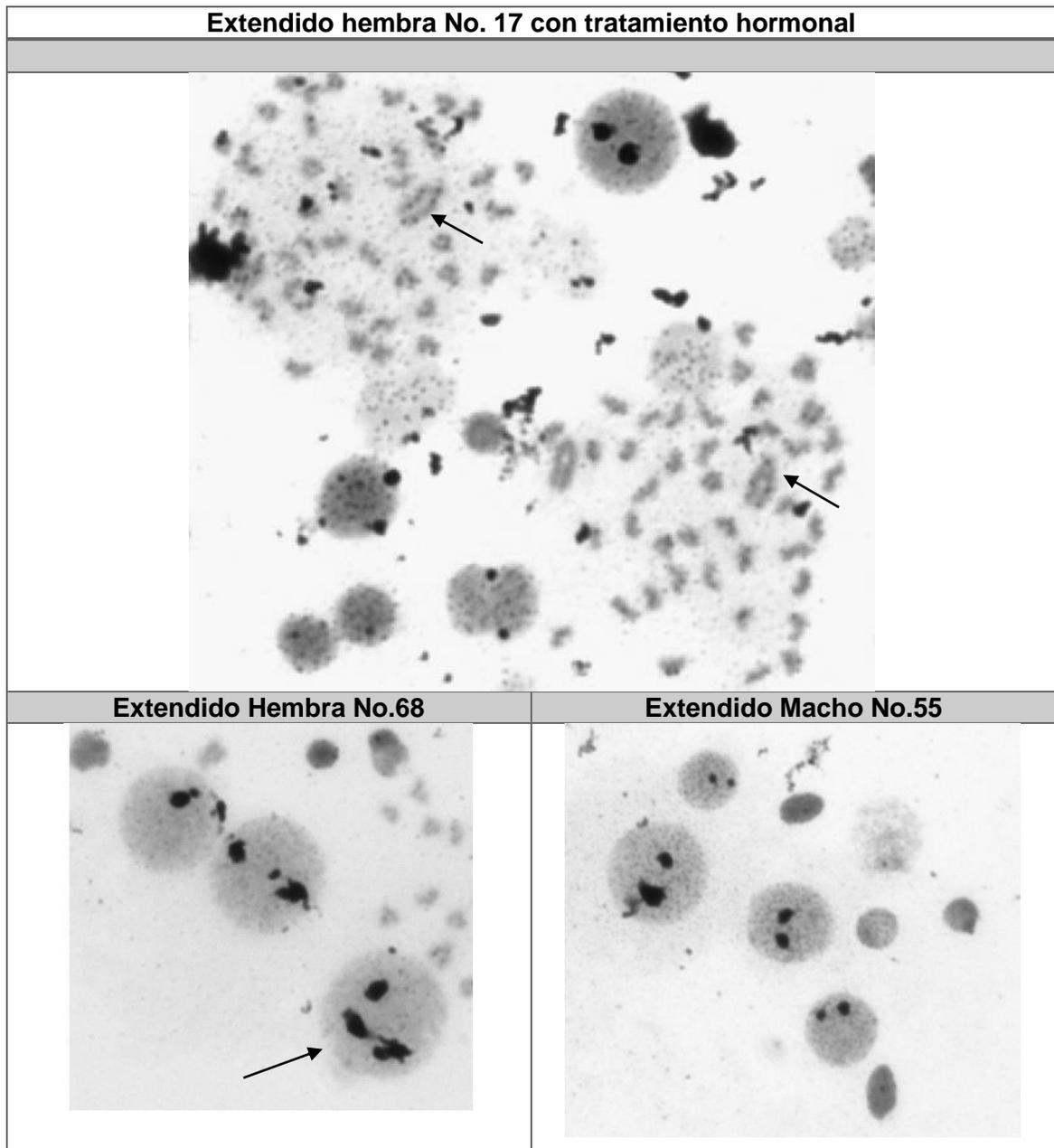
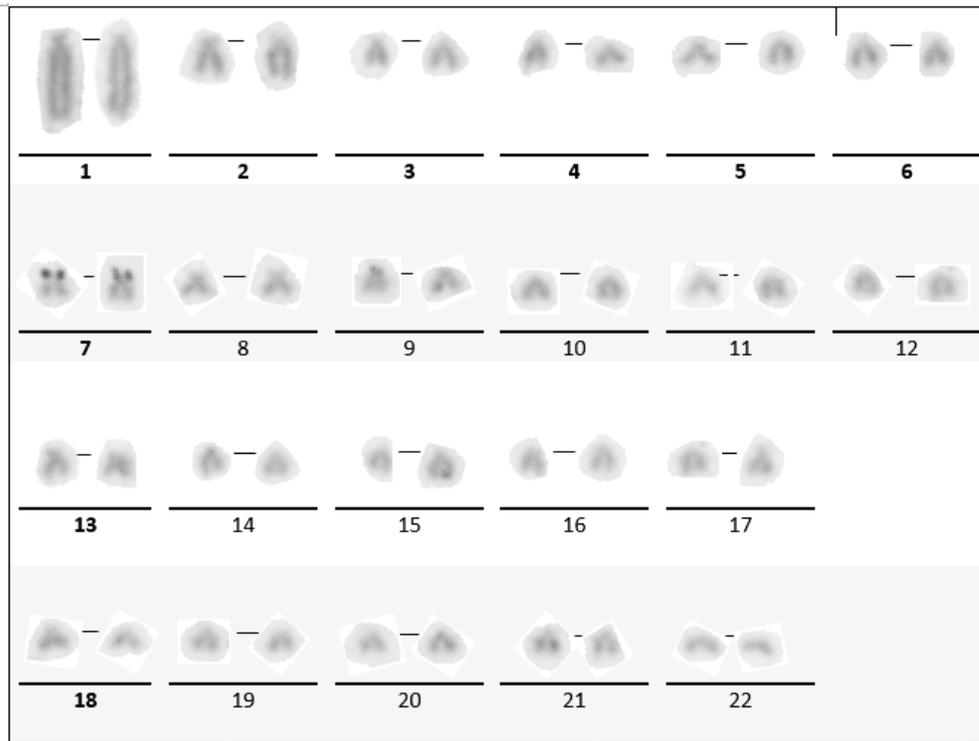


Figura 4-6. Cariotipo de un macho* de *Oreochromis* sp con Bandas NOR

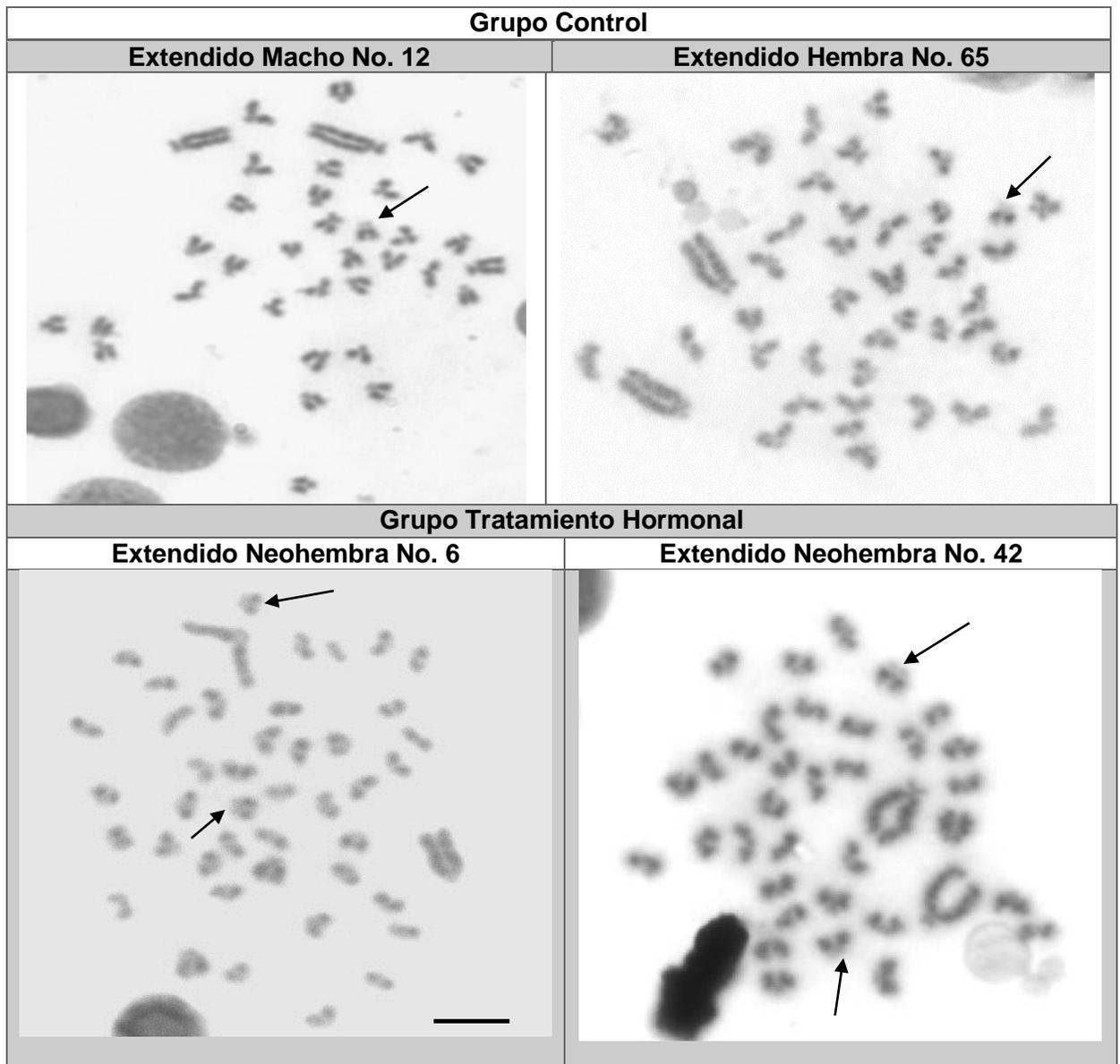


* Macho No.55

4.5. Bando G-W

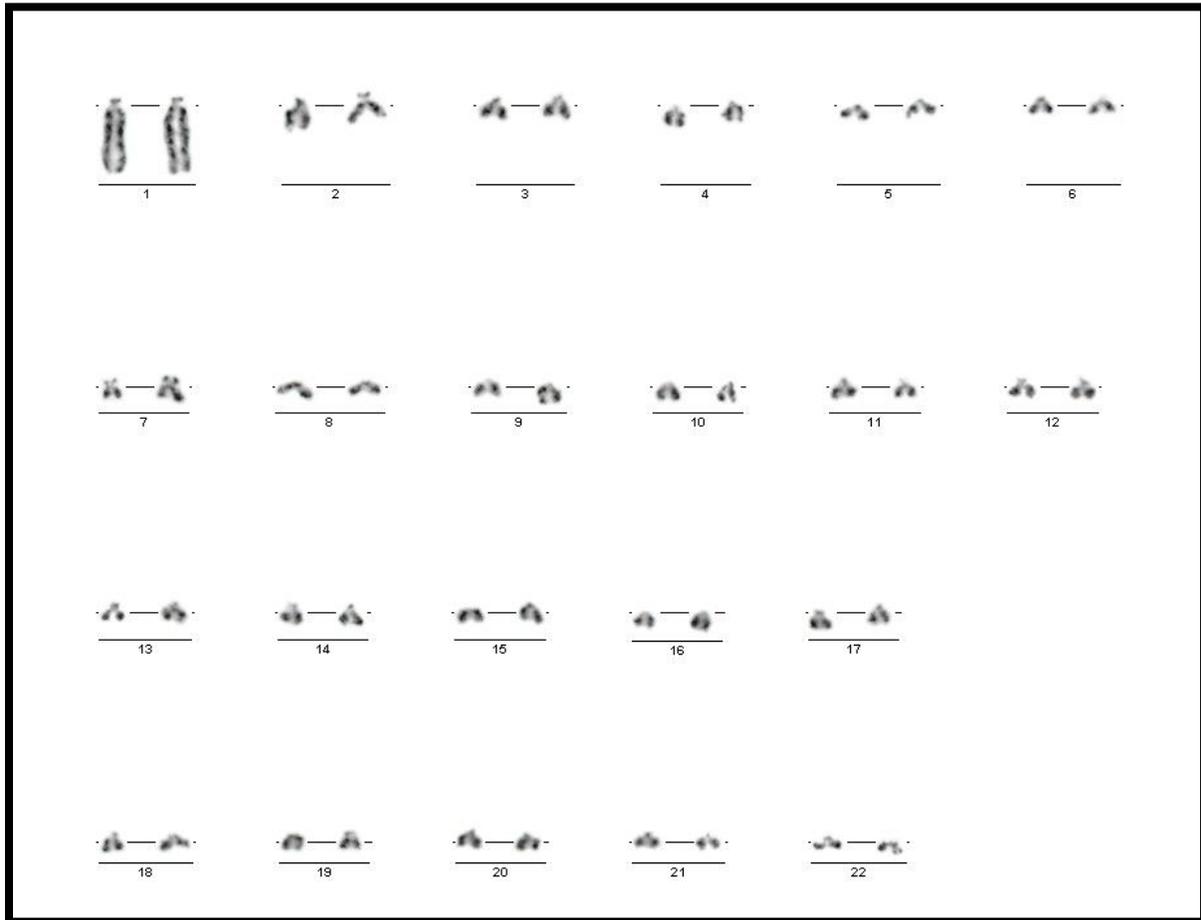
Las metafases y el cariotipo con bandas G-W se presentan en la Figura 4-7 y Figura 4-8. Mediante la técnica de bandeo G empleando digestión ácida con HCL y solución salina no se logró evidenciar las regiones eucromáticas, por lo tanto no se logró buena resolución en las bandas de forma clara, dificultando la elaboración del ideograma. Además, no se contó con un número suficiente de metafases con bandeo para realizar un análisis y determinar las bandas. Solo se observó en todas las metafases de los individuos de los dos tratamientos, que el par de cromosomas submetacéntrico No. 7 o en un solo cromosoma de éste par, presentan una banda G negativa en el extremo terminal de los brazos q.

Figura 4-7. Extendidos cromosómicos de los dos tratamientos en *Oreochromis* sp con
Bandas G-W



Escala 5 μ m

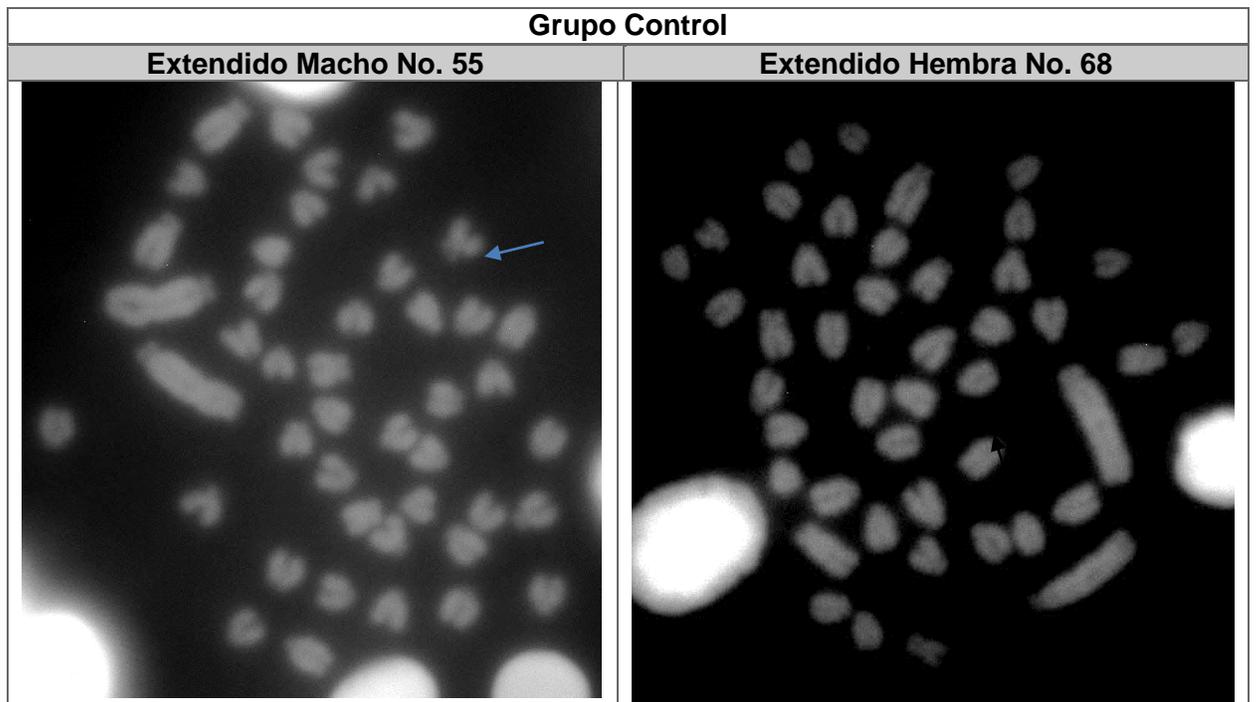
Figura 4-8. Cariotipo de *Oreochromis* sp con Bandas G-W



4.6. Bandas QFQ

Debido a los resultados negativos utilizando la técnica de bandeo G-W, se empleó la técnica de bandeo Q porque el patrón de bandas es similar al bandeo G, es decir, permite identificar regiones ricas en A-T. En la Figura 4-9 se presentan las dispersiones cromosómicas solo para el GC. No se lograron identificar patrones de bandeo diferenciales con ésta técnica, los extendidos obtenidos se colorearon homogéneamente.

Figura 4-9. Extendidos cromosómicos de dos individuos del GC en *Oreochromis* sp con Bandas QFQ



4.7. Identificación de alelos y genotipos en *Oreochromis* sp., con el marcador microsatélite asociado al sexo UNH898

Inicialmente se emplearon las condiciones reportadas en GenBank para la amplificación del microsatélite, pero en la electroforesis de geles de poliacrilamida se observó la presencia de bandas inespecíficas. Por lo cual, se probaron diferentes gradientes de temperatura para el paso de anillaje o hibridación. Se consideraron los reportes de Khan (2011) y Naranjo Meneses (2014), lo cuales emplean temperaturas de anillaje más altas a las reportadas por Carleton *et al.* (2002) en el Genbank para la amplificación del microsatélite UNH898 en tilapia nilótica (61-65°C y 59°C, respectivamente).

De ésta manera, se encontró que 60°C fue la temperatura de anillaje ideal para su amplificación en tilapia roja (Figura 4-10).

Se identificaron 8 alelos en toda la población (Figura 4-11), 7 de éstos alelos se encontraron en individuos del GC y 1 alelo exclusivo del GH (Figura 4-12). Siendo el alelo de 260pb el más abundante en la población de machos del grupo control, seguido de 290 y 295pb; y los alelos 270 y 240pb exclusivos en hembras. Para los individuos sometidos al tratamiento hormonal con estradiol, se encontró que el alelo 280pb es exclusivo para éste grupo.

Figura 4-10. Pesos moleculares en gel de Poliacrilamida al 10% mostrando amplificadas del microsatélite UNH898 en machos y hembras de *Oreochromis* sp., del GC

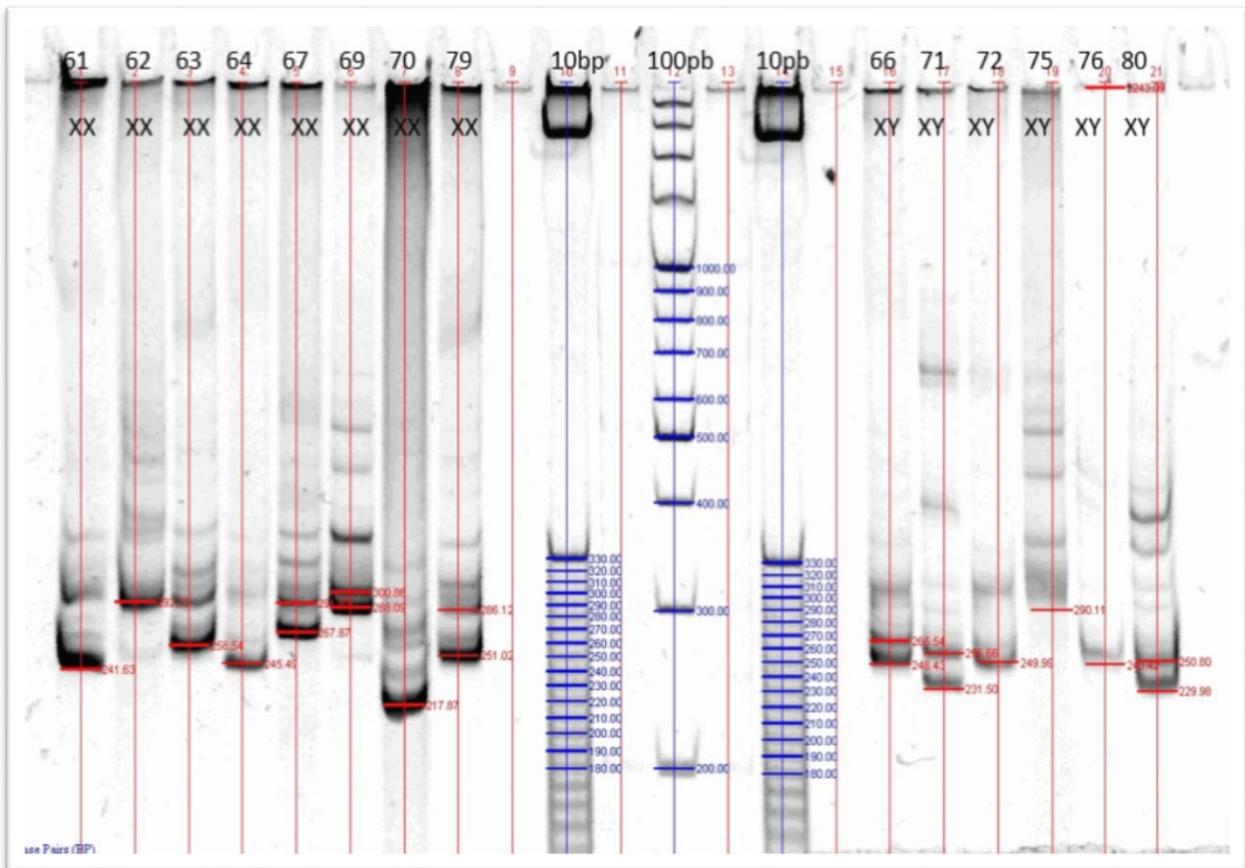


Figura 4-11. Frecuencias alélicas con el marcador microsatélite UNH898 presentes en la población total de individuos de *Oreochromis* sp., compuesta por el GC y GH

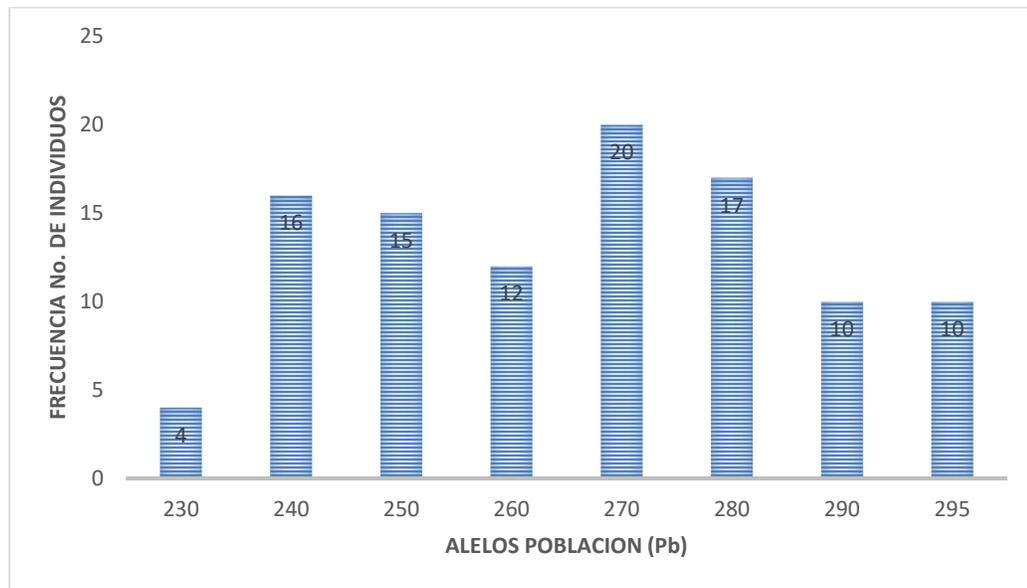
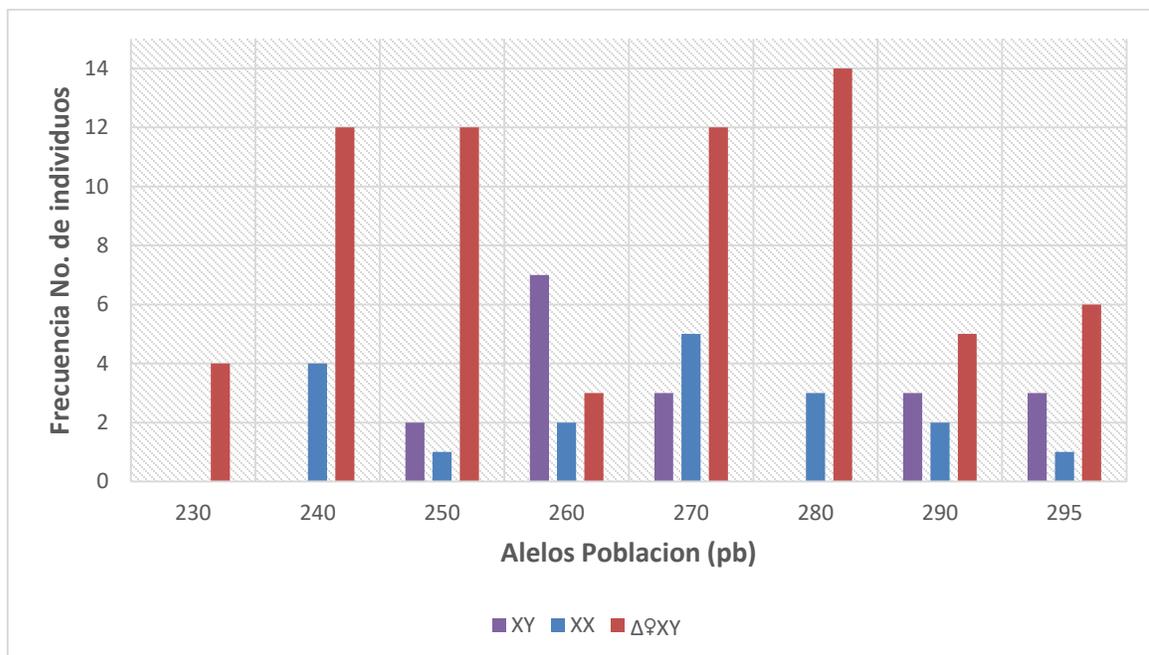


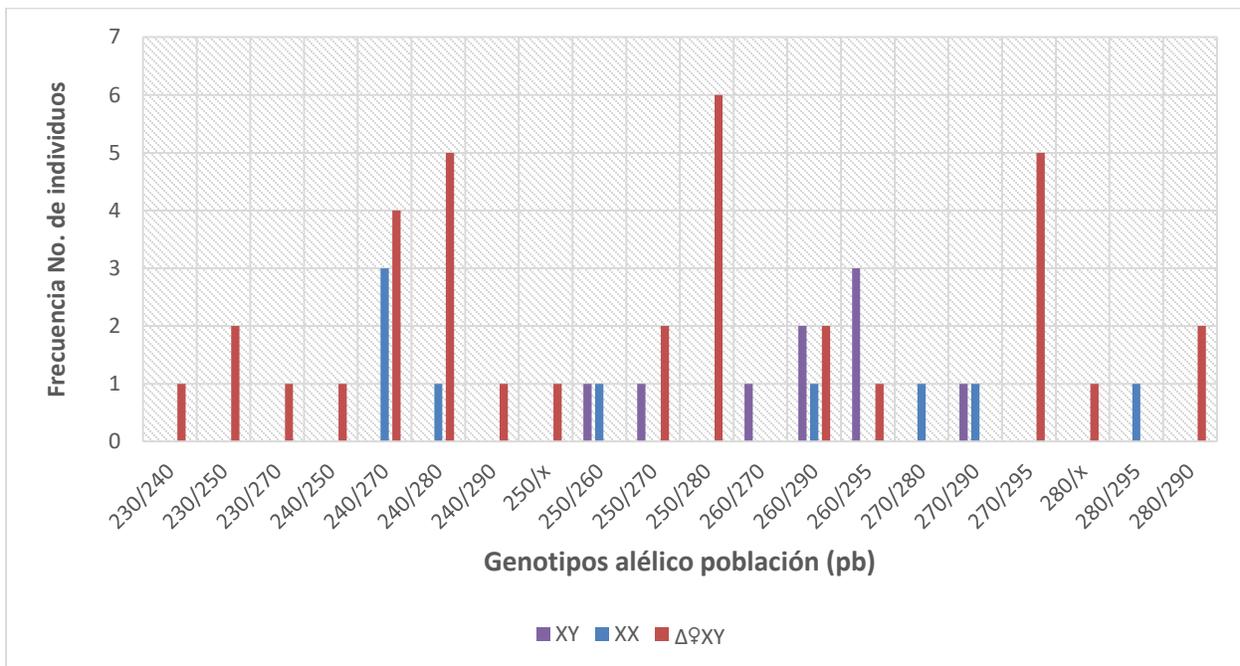
Figura 4-12. Frecuencias alélicas con el marcador microsatélite UNH898 discriminados por genotipos en *Oreochromis* sp.



XX: individuos hembras y XY: individuos machos sin tratamiento hormonal; Δ♀XY: individuos hembras con tratamiento hormonal.

Para las frecuencias de los genotipos alélicos (Figura 4-13), se encontraron 20 combinaciones alélicas compuestas por dos alelos o un alelo en toda la población. Siendo los genotipos 260/290 y 260/295 los más abundantes en machos, 240/270 en hembras y 250/280 – 240/280 – 270/295 en neohembras del GH.

Figura 4-13. Frecuencias de las combinaciones alélicas con el marcador microsatélite UNH898 presentes en los diferentes genotipos de *Oreochromis sp.*



XX: individuos hembras y XY: individuos machos sin tratamiento hormonal; Δ♀XY: individuos hembras con tratamiento hormonal posibles "Neohembras".

El genotipo de machos 260/290 y 260/295 representó un 8,5% del grupo de hembras con tratamiento hormonal, mientras que el genotipo de hembra 240/270 representó un 11,42% y el 80% de las hembras feminizadas presentaron otras combinaciones alélicas. Así mismo, los alelos 260 y 290-295 de machos estuvieron presentes en un 4,4% y 16,17% de los individuos del GH, mientras que los alelos 240 y 270 de hembras estuvieron en un 17,64% de los individuos del GH. El 61,8% de las hembras feminizadas del GH presentaron alelos diferentes. En el Anexo 6 se presenta las tablas de frecuencias para los alelos y genotipos encontrados.

4.8. Análisis de señales de FISH

Los resultados para el GC, mostraron que tanto en dispersiones cromosómicas de machos como de hembras presentan señales de hibridación (Tabla 4-4). Las regiones hibridadas se ubican en el brazo corto de un cromosoma subteloentrico, en condición homóloga (Figura 4-14). Se esperaba en primera instancia que la sonda específica con el alelo encontrado solo en machos no se uniera a las dispersiones cromosómicas de las hembras, y que las señales se encontraran en un par cromosómico.

Debido a éstos resultados negativos, los cultivos de los 19 individuos del GH no se procesaron para FISH.

Adicional a esto, en las fotografías procesadas de FISH se evidenció una alta acumulación de sonda (background), lo que dificulta la unión de varias copias de la secuencia marcada a la diana en los cromosomas afectando la intensidad de la señal. Para lo cual, se aplicó una técnica que disminuye el background descrita por Mandáková & Lysak (2016), que consistió en incubar la sonda a 37°C por diferentes periodos de tiempo (2 horas, 6 horas y 17 horas) para resuspender la sonda en el buffer de hibridación; ya que el tiempo que se requiere para resuspender la sonda depende de la cantidad inicial del precipitado de DNA y su concentración. De acuerdo con éstos autores la mayoría de sondas se disuelven bien en minutos y/o horas, sin embargo las sondas complejas que comprenden docenas o cientos de copias de la secuencia requieren una exposición más larga con temperatura

A pesar de que se probaron tres tiempos de exposición para la dilución de la sonda, no se encontró disminución en el background y en la mayoría de los casos ausencia de señales de hibridación (Figura 4-15).

Por otro lado, los datos de la cuantificación de la sonda específica por espectrofotometría arrojó una concentración de 13,6ng/μl y una relación 260/280 de 1,89 y 260/230 de -4,11; y para la cuantificación por fluorometría arrojó 8ng/μl. Así mismo, se obtuvo una concentración total de la sonda de 340ng y 200ng con los dos métodos de cuantificación empleados, respectivamente. La relación negativa 260/230 puede ser debido a que el blanco usado tiene una alta absorbancia en el ultravioleta lejano y no es el más adecuado

Tabla 4-4. Señales de hibridación y ubicación de las señales en individuos del GC de *Oreochromis* sp

Individuo	Sexo	No. Señales de hibridación	Cromosoma y posición	Genotipo
61	♀	1	23T	240/270
62	♀	1	23T	240/270
64	♀	0	-	240/280
68	♀	1	23T	270/280
70	♀	1	23T	240/270
79	♀	1	23T	260/290
12	♂	1	23T	260/295
66	♂	1	23 T	260/290
72	♂	0	23T	260/290
73	♂	1	23 T	270/290
74	♂	1	-	260/295
75	♂	1	23T	260/295

T = posición terminal

Figura 4-14. Dispersiones cromosómicas en metafase del macho No. 66 del GC de *Oreochromis* sp., mostrando las señales de hibridación con la sonda específica

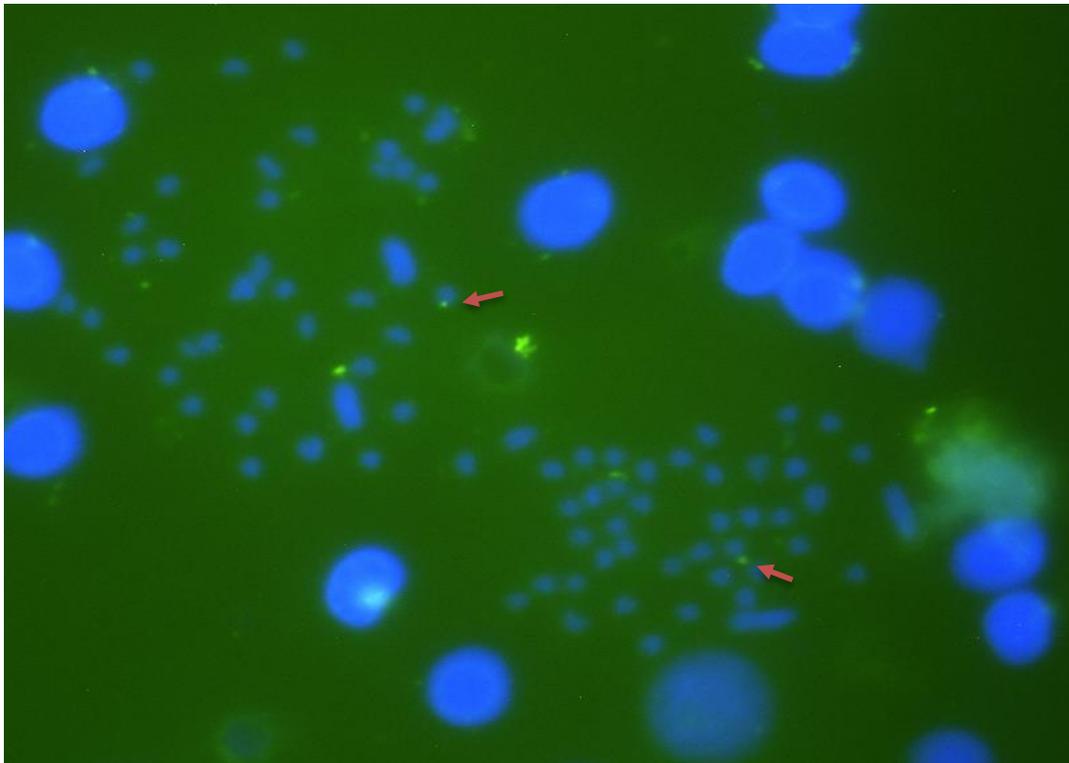
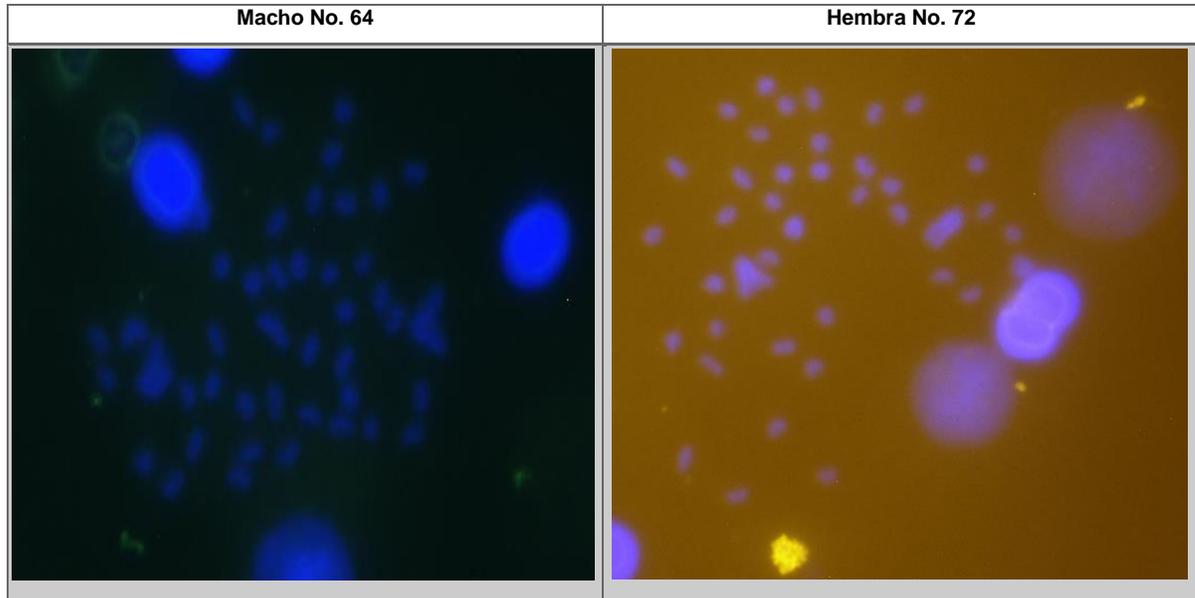


Figura 4-15. Dispersiones cromosómicas en metafase de dos individuos del GC de *Oreochromis* sp., mostrando ausencia de señales de hibridación con la sonda específica y background



5. DISCUSIÓN

5.1. Feminización Hormonal

Rosenstein & Hulata (1994) reportan un porcentaje de feminización mayor del 75% usando una dosis de 100mg/kg de E₂ (17β-estradiol) en *Oreochromis mossambicus*, *O. mossambicus* x *O. urolepis hornorum* y *Oreochromis aureus* durante 15-18 días y Abad *et al.* (2007) obtuvieron 75% de reversión usando una dosis de 100mg/kg de E₂ (17β-estradiol) en *Oreochromis aureus* durante 45 días. Estos resultados son superiores en un 10,7% respecto al porcentaje de feminización obtenido en este trabajo, teniendo en cuenta que se empleó el doble de la dosis recomendada de E₂. Esto pudo deberse al sistema de flujo continuo del lago donde se alojaron los alevines sometidos al tratamiento hormonal, pues Mair *et al.* (1997) sugirieron que en sistemas de recirculación donde los metabolitos se acumulan y no se pierden ayuda a aumentar el porcentaje de reversión, ya que más del 99% de la hormona administrada a través de la dieta se libera en el agua en menos de 24 horas en *Oreochromis mossambicus* y *O. mykiss* (Pandian & Sheela, 1995).

Por su parte, Alcántar Vázquez *et al.* (2015) reportan tasas de reversión más altas de 88% y 80.1% con una dosis de 160mg/Kg y 60mg/kg por 30 días de tratamiento con E₂ en tilapia nilótica. En cambio, las hormonas sintéticas EE (17-α-etinilestradiol) y DES (dietilsbestrol) en dosis de 100-200mg/Kg se obtienen porcentajes de reversión más altos 64-90% en menor tiempo.

Se ha documentado, que el tratamiento hormonal con estradiol no afecta la tasa de crecimiento de los peces, mientras que los andrógenos lo aceleran (Johnstone *et al.*, 1979; Piferrer, 2001).

Aunque las dosis altas de hormona estradiol natural o sintética afectan negativamente el crecimiento (Król, Poblócki, Bockenheimer, & Hliwa, 2014). Este fenómeno se observó en el crecimiento de los alevines sometidos al GC del presente trabajo.

Sin embargo, Rosenstein & Hulata (1994) reporta que al contrario de los andrógenos, los estrógenos influyen negativamente en el crecimiento de los peces. La exposición de larvas de tilapia nilotica a estrógenos tuvo un efecto duradero sobre la producción del factor I de crecimiento insulínico (IGF-I). Este factor, producido principalmente en el hígado, está bajo el control de la hormona del crecimiento y juega un rol central en el complejo sistema que regula el crecimiento (Shved et al., 2007).

En cuanto a la duración del tratamiento hormonal los reportes varían, ya que los autores obtienen el mismo porcentaje de reversión en diferentes periodos de tiempo, el límite del periodo de diferenciación sexual para cíclidos y ciprinodóntidos, donde es susceptible al efecto de los estrógenos, se presenta aproximadamente hasta el día 30 después de la eclosión. Sin embargo, se ha encontrado que estos límites del periodo de susceptibilidad pueden variar no sólo entre las especies sino también entre familias (Pandian & Sheela, 1995).

Del proceso de selección de hembras por inspección de la papila urogenital, se reporta un 5% de ocurrencia de peces atípicos o intersexo que presentaron algunas anomalías reportadas por Alcántar Vázquez, Rueda Curiel, Calzada Ruiz, Antonio Estrada, & Moreno de la Torre (2015): papila de hembra pero fenotipo de macho, papila similar a machos pero más corta, papila de hembra que expulsaba semen. Algunos autores han reportado la presencia de peces atípicos después del proceso de masculinización y feminización en algunas especies de tilapia (Calhoun & Shelton., 1983; Hopkins, Shelton, & Engle, 1979; Potts & Phelps., 1995). Jensen & Shelton (1979) observaron en tilapia aurea un 35% de peces atípicos después del proceso de feminización con hormonas naturales (Estradiol, Estrona y β -Estradiol) en los tratamientos con altas dosis.

5.2. Parámetros morfométricos del cariotipo de *Oreochromis* sp.

Se reporta un número cromosómico modal diploide $2n=44$ y modal haploide de $n = 22$ para tilapia roja (*Oreochromis* sp). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por algunos

autores, cuyo número cromosómico para tilapia nilotica y otras especies de tilapia corresponde a 44 (Harvey, Powell, Kennedy, McAndrew, & Penman, 2002; Martins, Oliveira, Wasko, & Wright, 2004 y Leonhardt Rodrigues, Caetano, Fenocchio, Filho, & Leonhardt, 2006). El cariotipo de la mayoría de especies del género *Oreochromis* tienen $2n=44$ cromosomas y es una característica típica de la familia *Cichlidae* del Viejo Mundo, mientras que los cíclidos del Nuevo Mundo presentan $2n=48$ cromosomas (Feldberg, Porto, & Bertollo, 2003; Klinkhardt et al., 1995) lo que evidencia un cariotipo ancestral con un número diploide ligeramente conservado debido a las pocas variaciones encontradas entre la familia.

En cuanto a la fórmula cariotípica, algunos autores recomiendan clasificar los cromosomas de la familia de los Cíclidos empleando una categoría de clasificación intermedia, debido a la gran cantidad de cromosomas monorrámeos (subtelocéntricos - acrocéntricos) que dificultan la medición. La categoría intermedia consiste en agrupar dos categorías independientes en una (msm: metacéntrico-submetacéntrico; sta: subtelocéntrico-acrocéntrico) (Lenin, Leonardo, & Del Valle, 2004; Thompson, 1979).

En el caso específico de la tilapia, reportes como Poletto *et al.* (2010) emplean la categoría intermedia y reportan en tres especies de tilapia: tilapia azul (*Oreochromis aureus*) y tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) que presentan una fórmula cariotípica en pares cromosómicos de $1m/sm + 21 st/t$; y tilapia mozambica (*Oreochromis mossambicus*) que presenta una fórmula cariotípica de $2m/sm + 20 st/t$ provenientes de Brasil y Estados Unidos. Si transformamos los resultados de éste trabajo en categoría intermedia para hacer las comparaciones, tenemos que los machos presentan una fórmula de $2m/sm + 20st/t$ y para hembras $1m/sm+21st/t$, que son consistentes con los reportes para otras especies de tilapia.

Sin embargo, algunos autores continúan clasificando los cromosomas en categorías independientes debido a que aportan información más detallada del conjunto cromosómico, en especial en la familia de los Cíclidos donde este conjunto cromosómico se compone macro cromosomas y micro cromosomas o cromosomas B (Feldberg & Bertollo, 1985; Feldberg, Porto, Alves, Mendonça, & Benzaquem, 2004; Martins, Portela, & Julio, 1995)

En el presente estudio, las diferencias entre machos y hembras del GC radican en la particularidad encontrada en los machos, ya que poseen 1 par submetacéntrico que las hembras no tienen. También se observó en las categorías independientes, que los machos poseen pares de cromosomas 16st y 4t mientras que en las hembras la relación es inversa 9st y 4t. El-serafy, Al-Zahaby, Zowail, Dawood, & Badway (1993) también reportan diferencias de la fórmula cariotípica entre machos y hembras de diferentes poblaciones en *Oreochromis niloticus*: los machos presentaron 7sm + 15st proveniente de Serow y 4sm+18st proveniente de las regiones de Kanater y Manzalla, mientras que las hembras presentaron 3sm+19st y 6sm+17st en las mismas regiones.

Supiwong, Tanomtong, & Supanuam (2013) reportan una fórmula cariotípica sin discriminación de sexo similar a las hembras de éste estudio, utilizando la clasificación independiente (1sm, 6st y 15t) en tilapia nilótica proveniente de Tailandia.

Por otro lado, en las fórmulas cariotípicas de los individuos del GH se presenta una particularidad, pues 4 (individuos No. 4, 6, 30 y 50) de 8 individuos tienen 2 pares de cromosomas submetacéntricos, que no están presentes en machos y hembras del GC. Además, el resto de su complemento cromosómico es muy similar a los machos. Mientras que, los individuos No. 17 y 33 presentan una fórmula cariotípica más cercana a los machos y el individuo No. 1 presenta una fórmula cariotípica igual a las hembras. El individuo No. 42 presenta una fórmula totalmente diferente a todos los individuos, pues presenta 9 pares submetacéntricos.

Por lo tanto, se podría decir que solo los individuos 17 y 33 se seleccionan como neohembras teniendo en cuenta la particularidad cromosómica encontrada en los machos, y el individuo No. 1 es un hembra a la que el tratamiento hormonal no afectó ya que desde la segregación genética sería hembra, por lo cual se descartaría. Sin embargo, no se puede afirmar que estas variaciones en la fórmula cariotípica obedecen a cambios estructurales entre los individuos sin confirmar con las técnicas de bandeado cromosómico.

En cuanto a los demás parámetros informativos por morfometría del cariotipo de tilapia roja, tenemos que el índice de asimetría (%TF) para todos los tratamientos fue menor al 50%, lo que evidencia un cariotipo asimétrico y un grado de evolución bajo de éstos peces

comparados con mamíferos y aves. El bajo grado de evolución se ve reflejado en la etapa temprana de diferenciación sexual cromosómica que presenta el género *Oreochromis*, y la conservación de sus números cromosómicos (Cnanni, 2013).

El índice de asimetría es uno de los parámetros más populares y ampliamente usados para analizar las especies por citotaxonomía, es decir la evolución de la especie (Peruzzi & Eroğlu, 2013). Esta mide la evolución de la especie en cuestión por el predominio de cromosomas con centrómeros terminales/subterminales (asimetría intracromosómica) y tamaño de cromosomas altamente heterogéneos (asimetría intercromosómica) (Levitsky, 1931).

Existen varios índices de asimetría, en éste estudio se empleó el índice %TF de Huziwara (1962), porque cuantifica el predominio de cromosomas subtelo-céntricos y telocéntricos que son característicos del complemento cromosómico de la tilapia.

El NF (número fundamental) es otro parámetro común del cariotipo, el cual permite medir la ocurrencia de cambios estructurales en el set cromosómico y por consiguiente modificaciones en su morfología sin variación en el número de cromosomas dentro de una misma especie o entre individuos. (Nirchio & Oliveira, 2014). Sin embargo, ésta puede variar dependiendo del criterio adoptado para su determinación, especialmente si la fórmula cariotípica contiene un gran número de cromosomas acrocéntricos o monorráneos (Lenin et al., 2004).

Algunos autores tienen en cuenta todos los brazos visibles en los cromosomas y otros consideran solo los brazos largos de los cromosomas subtelo-céntricos y acrocéntricos; además algunos parámetros han sido documentados como fuente de importante variación que afecta las comparaciones tales como los efectos de la colchicina sobre la constricción de los cromosomas, la acción de fijadores, el tamaño de los cromosomas al momento de ser fijados (estadio de división celular), por lo que se sugiere asignar un rango de número fundamental para la especie (Arias-rodriguez, Páramo-delgadillo, & Durán-gonzález, 2006; Claudio Oliveira & Nirchio, 2006).

De acuerdo a las sugerencias de los anteriores autores, se estableció un rango del NF = 46-64 para toda la población de tilapia roja. Estas variaciones especialmente en el GH, se

presentan por la variación a su vez, de la fórmula cariotípica; aunque se encuentra en mayor frecuencia $NF=50$.

En el GC, los machos presentan un número fundamental mayor que las hembras, porque los machos tienen 1 cromosoma submetacéntrico que añade a su número fundamental dos brazos más ($NF=48$). Supiwong *et al.*, (2013) reportan un número fundamental de $NF=62$ en tilapia nilótica, que se encuentra dentro del rango propuesto en este trabajo.

A partir del análisis del NF y las fórmulas cariotípicas, los resultados muestran que los individuos evaluados en éste trabajo, especialmente los peces sometidos a la feminización hormonal, poseen una alta variación cariotípica (polimorfismos). Para los machos y hembras de tilapia roja evaluados, sí existen diferencias evidentes, pero estos parámetros no sirven como base para identificar neohembras.

Por su parte, el parámetro tamaño de lote haploide detecta variaciones en el complemento cromosómico y relaciona la probable variación en el contenido de DNA. En éste trabajo, machos y hembras poseen la misma cantidad de DNA en estado haploide ($12\mu m$), es decir no presentan variación en su contenido. Mientras que los individuos del GH presentan pequeñas variaciones en el contenido de DNA que van desde $10-13\mu m$, siendo el tamaño $11\mu m$ el de mayor frecuencia (4 de 8 individuos).

5.3. Bandas CBG

Las bandas C son marcadores cromosómicos importantes por su universalidad, diversidad y variabilidad, que permiten identificar cromosomas homólogos, identificar patrones diferenciales de heterocromatina constitutiva entre individuos, poblaciones y/o especies (Claudio Oliveira & Nirchio, 2006).

Desafortunadamente, en éste trabajo el análisis entre tratamientos y aún entre individuos no arrojó ningún patrón específico de banda c que permitiera diferenciar los individuos. Sin embargo, se reporta por primera vez las características reveladas de bandeado c para la especie *Oreochromis* sp como son: bandas c positivas que cubre casi por completo el par cromosómico No. 1, bandas C positivas en la región intersticial del par cromosómico No. 7 y bandas c negativas en el par cromosómico No. 2.

Sumner, (1990) menciona que hay tipos de heterocromatina que son heterogéneas en su composición, por lo tanto no presentan coloración diferencial con la técnica usual de bandeado C, esta puede ser la razón de la ausencia de coloración en el par cromosómico No. 2 de tilapia roja.

Otro aspecto interesante, es el patrón de banda c positiva del par cromosómico No. 1 en tilapia roja obtenido en este estudio; debido a que los cromosomas sexuales se pueden identificar mediante la presencia de heterocromatina constitutiva por ser una característica general de los vertebrados (Andreatta, Almeida-toledo, Oliveira, & Filho, 1992; Hsu & Arrighi, 1971). De esta manera, el cromosoma Y o W en mamíferos, aves y reptiles están compuestos enteramente de heterocromatina constitutiva ricos en DNA satélite (Sing, Purdom, & Jones, 1976). De acuerdo a reportes de algunos autores éste par de cromosomas subtelocéntricos es el característico del género *Oreochromis*, por ser el par más grande del complemento cromosómico y se le ha atribuido como responsable de la determinación sexual en tilapia nilótica mediante la observación en meiosis (complejo sinaptonémico) y posterior confirmación empleando FISH, como también empleando secuencias SATA (Ferreira & Martins, 2008; Griffin et al., 2002). De acuerdo a lo anterior, y considerando las evidencias halladas en éste estudio, se podría confirmar que en el par cromosómico No. 1 de tilapia roja se pueden encontrar los sitios responsables de la determinación sexual en esta especie o podrían ser los cromosomas sexuales en esta especie; sin evidencia de patrones diferenciales en hembras y machos.

5.4. Bandas NOR

De acuerdo con Galetti, Foresti, Bertollo, & Moreira-Filho (1984) los estudios de las regiones organizadoras del nucléolo han revelado que su localización es específica para cada especie, en varios grupos de peces. En la familia de los Cíclidos africanos, era un marcador característico (ancestral y conservado) la presencia de un par de cromosomas portadores de NOR activos, sin embargo las sondas 18S de DNAr mostraron una organización genómica diferente de éstos genes (Feldberg et al., 2003; Poletto et al., 2010).

Al igual que en el presente trabajo, Supiwong *et al.* (2013) reporta el par de cromosomas metacéntrico No. 7 como portadores de NOR activos en tilapia nilótica. No se encontraron polimorfismos de éste par cromosómico portador de NOR entre machos y hembras del GC.

Existe variabilidad en los reportes del número de cromosomas portadores por la técnica Ag-NOR en algunas especies de tilapia: Leonhardt Rodrigues, Caetano, Fenocchio, Filho, & Leonhardt (2006); Torres & Leao (2002) reportan 2 pares de cromosomas portadores de NOR y Martins, Oliveira, Wasko, & Wright (2004) reportan 3 pares de cromosomas portadores de NOR, también confirmado con sondas 18s DNAr empleando FISH. Los NOR's pueden estar localizados en un solo par o distribuidos en varios cromosomas del complemento (Claudio Oliveira & Nirchio, 2006).

Sin embargo, éstas variaciones pueden presentarse con la técnica Ag-NOR, debido a que el nitrato de plata puede colorear otras estructuras asociadas con DNAr como heterocromatinas, histonas y núcleos cromosómicos que estuvieron activos en la interfase de la célula evaluada (Sumner, 1990), o por el contrario no abarcan la visualización total de los NOR por efecto de dominancia o recesividad de los sitios NOR inactivos.

No se encontraron reportes de NOR's en el cromosoma No.1 de tilapia roja en el presente trabajo a pesar de las incidencias observadas en el GC, por lo cual se atribuyen problemas en el proceso de tinción con nitrato de plata.

Se reportan la presencia de dos pares de cromosomas portadores de NOR activos en dos hembras feminizadas del GH de tilapia roja, encontrando polimorfismo entre tratamientos. Estas diferencias pueden deberse a características citogenéticas propias de los individuos analizados.

5.5. Bandas G-W y QFQ

El concepto de bandeo G y Q en mamíferos, consiste en revelar bandas estructurales (regiones relativamente ricas en AT) en los cromosomas, que contienen menos genes que las bandas R (Claudio Oliveira & Nirchio, 2006). En el caso de los peces, las dificultades encontradas en la aplicación de las técnicas de bandeo G y Q pueden estar relacionadas

a la composición del ADN y su compartimentalización (organización y compactación en bloques) (Medrano, Bernardi, Couturier, Dutrillaux, & Bernardi, 1988).

Otros autores (Ozouf-Costaz & Foresti, 1992) consideran que la dificultad radica en el pequeño y numeroso tamaño de los cromosomas que presentan la mayoría de peces, porque mayor es la dificultad de desnaturalización, las bandas aparecen difusas, no son repetibles o son resistentes por completo a los agentes químicos empleados en el caso de bandeo G.

Por lo tanto, se ha establecido que la mayoría de especies de peces, no presenta un patrón de bandas G, pero en aquellos casos donde la especie es susceptible a bandearse es aparentemente consistente (Claudio Oliveira & Nirchio, 2006) y la presencia de éstas bandas son atribuidas a un fenómeno de divergencia evolutiva en la especie con respecto a las que permiten bandearse (Burbano, 2002).

Para este trabajo, *Oreochromis* sp no presentó bandas G y Q claras que permitieran la visualización de patrones específicos entre tratamientos e individuos, solo bloques heterocromáticos grandes en los cromosomas pequeños (a excepción de un par) y en los cromosomas más grandes (par No. 1 y 2) se presentan bandas difusas y no son consistentes en todos los individuos. Se encuentran pocos reportes donde ha intentado llevar a cabo la técnica en el género *Oreochromis*, y en los trabajos que se han realizado no se presentaron resultados satisfactorios al igual que en el presente trabajo (Crosetti, Sola, Brunner, & Cataudella, 1988).

Sin embargo, se encontró que el par cromosómico No. 7 de tilapia roja presenta banda G negativa en el brazo q, o en algunos casos solo un cromosoma; no se encontró diferencias entre individuos de los tratamientos. En contraste con el bandeo Q, éste par cromosómico no se logró evidenciar de forma clara. La presencia de éstas bandas G negativas en el par cromosómico No. 7, pueden estar relacionadas con los genes DNAr ubicados en éste par confirmados por bandeo NOR en ésta especie.

De acuerdo a estos resultados, y los soportes anteriormente expuestos podríamos considerar la tilapia roja como especie no susceptible a bandeo G.

5.6. Identificación de alelos y genotipos en *Oreochromis* sp., con el marcador microsatélite asociado al sexo UNH898

Naranjo Meneses (2014) reportan el mismo número de alelos (con tamaños de 224, 227, 236, 245, 254, 264, 274 y 296 pb) encontrados en éste trabajo, para una población de *O. niloticus* proveniente de Ecuador. La mayoría de los alelos reportados en éste trabajo (con tamaños de 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 y 295 pb) para *Oreochromis* sp., pueden coincidir con los alelos reportados por éste autor en ± 5 pb, teniendo en cuenta que en los dos trabajos se empleó el mismo método de visualización en geles de poliacrilamida; cuya desventaja con fines comparativos es la variación de las corridas en el gel que depende del voltaje y tiempo empleado. Se reporta la aparición de un alelo diferente de 280pb en la población de *Oreochromis* sp.

En cuanto a los alelos con mayor frecuencia encontrados en individuos sin tratamiento hormonal, Naranjo Meneses (2014) reporta los alelos de tamaño 264 y 296pb para los machos y 274 en hembras de *O. niloticus* empleando el marcador UNH898. Estos reportes son similares a los encontrados en éste trabajo para el GC en tilapia roja (alelo 260, 290 y 295pb en machos; y 240 y 270pb en hembras).

Mientras que Eshel *et al.* (2011), reportaron que el alelo exclusivo de machos al que denominaron MAA tiene una longitud de 276pb y para hembras una longitud de 253, 274 y 276pb obtenidos mediante pruebas de segregación, de esta manera individuos que en su genotipo tenían el alelo 276 aún en condición heterocigoto, la proporción de machos obtenida en la F1 fue 95%, mientras que en individuos que tenían el alelo 276 en condición homocigota la proporción de machos obtenida fue de 100%. Cabe destacar que en éste estudio la técnica empleada para la genotipificación, electroforesis por capilaridad, es más precisa para obtener el tamaño de los alelos comparado con la visualización en geles de poliacrilamida.

En cuanto a las frecuencias de los genotipos alélicos, es decir las combinaciones entre los dos alelos presentes por cada individuo. Khan (2011) reporta un genotipo homocigoto 286/286 para el microsatélite UNH898 en hembras parentales de *O. niloticus* de una línea clonal. Naranjo *et al.* (2015) reportan un genotipo de 264/296 para individuos YY y XY, con presencia de tres alelos en los individuos heterogaméticos en algunos casos; y para hembras reportan otras combinaciones de alelos.

En el caso de éste estudio, los resultados son consistentes con Naranjo *et al.* (2015) para el genotipo 260/295, sin embargo se obtuvo otra combinación de 260/290. En hembras se identificó un genotipo recurrente de 240/270.

El porcentaje de genotipos especialmente de machos, encontrados en el grupo de hembras feminizadas con beta-estradiol, fue menor del 10% en una población de 35 individuos sometidos al tratamiento y para los alelos fue entre 4-16%; el mayor porcentaje se encontró en otras combinaciones alélicas. Se observa una población altamente polimórfica, aún entre individuos de los dos grupos. Estos resultados son muy bajos comparados con los reportados por Eshel *et al.* (2011) y Sun *et al.* (2014) de 97,4% y 96,8%, respectivamente, lo que indica que la población de éste estudio está compuesta en su mayoría de hembras genéticas, cuya hormona no afecto su diferenciación porque componían el 50% de la segregación para hembras. Este hecho se puede relacionar con dos eventos que disminuyeron los machos genéticos que debían feminizarse en el GH: 1) La mortalidad reportada después del proceso de feminización donde las larvas que murieron tenía parte del otro 50% restante de la segregación para machos, 2) El proceso de feminización no fue efectivo y puede ser menor del reportado.

De acuerdo a esto resultados, se reportan los individuos No. 26, 31 y 38 como posibles neohembras (hembras fenotípicas funcionales con genotipo de macho) y resto de los individuos como hembras genéticas.

Cabe mencionar, que las relaciones de dependencia entre el marcador y el sexo son muy altas debido al pequeño tamaño de muestra empleado en éste estudio, comparado con los reportes de algunos autores citados en el presente documento. Además, la técnica empleada para la visualización y cuantificación de los alelos no permite obtener datos

precisos, pues variaron aún en diferentes geles o réplicas de los mismo individuos. Según Wang *et al.*, (2009), la diferencia entre la técnica de electroforesis capilar y los geles de poliacrilamida tiene una diferencia de ± 10 pb, lo que deja a la subjetividad del investigador esa diferencia en pares de bases generando estimaciones incorrectas al momento de realizar comparaciones con otros estudios.

5.7. Señales de FISH

Las señales de FISH encontradas en el presente trabajo son consistentes con lo reportado por algunos autores que localizaron el microsatélite UNH898, en un par de cromosomas pequeños del set cromosómico en tilapia del nilo (Eshel *et al.*, 2011, 2012). De acuerdo con el mapa de ligamiento generado por Lee *et al.* (2005) para *Oreochromis* sp., en LG23, se ubicaron un total de 23 marcadores microsatélites para caracteres de interés como el sexo y color, entre los que se encuentra el microsatélite asociado al sexo UNH898.

La ubicación de las señales obtenidas en éste trabajo fue en la posición terminal de un cromosoma, en ninguna de las dispersiones se encontró en un par cromosómico. Sun *et al.*,(2014) ubicaron los marcadores SCARs (Sequence-Characterized Amplified Regions) 1-5 en el LG23, en especial el marcador No. 5 fue mapeado cerca del marcador UNH898 denominado como región determinante del sexo por Eshel *et al.* (2011, 2012); y cuyas señales se ubican en la posición terminal e intersticial de un par de cromosomas pequeños del complemento.

Cabe señalar que al igual que los marcadores microsatélites, los SCARs son un tipo de marcadores que amplifican secuencias ligadas a genes y frecuentemente co-segrega junto al gen de interés, debido a que la distancia genética entre la secuencia SCAR y la secuencia del gen por lo regular no sobrepasa los 5cM (Kelly, Gepts, Miklas, & Coyne, 2003). Mediante los dos tipos de marcadores, la detección de polimorfismos es alta y son marcadores codominantes.

Por otro lado, las señales de hibridación encontradas en las dispersiones cromosómicas de los machos No. 12, 66, 72 y 74, estuvieron relacionadas con el genotipo, debido a que en todos estos individuos se encontraba la combinación 260/290 o 260/295, particular en

los machos de *Oreochromis* sp del GC en el presente estudio, tan solo el individuo No. 73 presento un combinación diferente (270/290). Pero, las señales obtenidas en hembras no se pueden relacionar con el genotipo, debido a que solo la hembra No.79 presentó un genotipo 260/290, y las otras hembras presentaron genotipos con otras combinaciones alélicas diferentes de 260/290 y aun así, se evidenció hibridación. Por consiguiente, se puede corroborar que el genotipo 260/290 no es específico para machos, y por lo tanto no es un buen marcador para detectar neohembras en ésta población del GH en tilapia roja.

García Cegarra, (2010), Martins & Vicari (2012) y Claudio Oliveira & Nirchio (2006) reportan unos rangos para la concentración de la sonda empleada en protocolos de FISH en diferentes especies de peces de 100-200ng/μl, 10ng/μl y 80-125 ng/μl utilizando espectrofotometría, respectivamente. La concentración de la sonda obtenida en éste estudio fue más baja (13,6ng/μl) comparado con dos de los anteriores reportes, y similar al reporte de 10ng/μl.

Popescu & Hayes (2000) afirman que las sondas con una longitud menor a 1,5Kb marcadas con fluorocromos por el método de Nick translation generan una intensidad en la señal de hibridación muy baja para ser detectada, por lo tanto ésta dificultad se minimiza incorporando un hapteno empleando la técnica de amplificación enzimática o PCR. La gran ventaja de marcar secuencias con haptenos (marcación indirecta) a comparación de la marcación directa es la alta afinidad del ligando a la proteína detectora mediante receptores específicos, que minimiza los errores en la unión de las secuencias durante la hibridación (Fan, 2002). Sin embargo, el método de marcación con haptenos es muy dispendioso debido a las múltiples etapas posteriores a la hibridación conocidas como detección que determinan la correcta unión del ligando a la proteína.

Este hecho, también se podría relacionar con la hibridación encontrada en las dispersiones de las hembras, ya que la marcación directa puede ser desventajosa en la afinidad de la unión entre la sonda y la secuencia diana en los cromosomas, generando hibridaciones inespecíficas.

6. CONCLUSIONES

- El porcentaje de feminización en *Oreochromis* sp. en el Valle de Cauca-Colombia, bajo condiciones productivas (64,3%), se encontró por debajo de los registros en literatura. Sin embargo, aquellos fueron obtenidos bajo condiciones de laboratorio.
- Se reporta un número cromosómico modal diploide de $2n=44$ en tilapia roja (*Oreochromis* sp.), sin evidencia de dimorfismo sexual cromosómico.
- Se identificaron variaciones en la fórmula cariotípica para machos y hembras sin tratamiento hormonal y hembras feminizadas (neohembras), sin variación en el tamaño del genoma y sin evidencias de cambios estructurales mediante técnicas de bandeamiento.
- *Oreochromis* sp. no es susceptible a bandeo G-W y QFQ; a su vez el bandeo C no se evidenció diferencias entre las poblaciones estudiadas. Se confirmó el par de cromosomas metacéntricos No. 7 como portadores de NOR activos.
- El genotipo 260/295, según lo confirmado por la técnica FISH, no se mostró específico para machos. Por lo tanto no es un buen marcador para detectar neohembras de tilapia roja, bajo condiciones del Valle del Cauca.

7. RECOMENDACIONES

- Emplear más de un microsatélite ligado a la determinación del sexo en *Oreochromis* sp, debido al alto polimorfismo en familias e individuos. Como también, para realizar comparaciones y dependencias estadísticas entre el marcador y el genotipo.
- Verificar mediante pruebas de progenie el genotipo de los individuos, para contar con más herramientas de comparación y validar los nuevos métodos de detección de neohembras de tilapia roja.
- Emplear técnicas novedosas para determinar el tamaño de alelos y genotipos, empleando marcadores moleculares.

Anexo 1. Reporte de la asignación del código de microchip a numeración básica de ejemplares de tilapia roja distribuidos en los dos tratamientos.

No.	ID	Fecha de marcaje	TTO
1	00076B840C	27-feb-16	B-estradiol
2	00076B62A6	27-feb-16	B-estradiol
3	00076B765C	27-feb-16	B-estradiol
4	00076B7048	27-feb-16	B-estradiol
5	00076B5F24	27-feb-16	B-estradiol
6	00076B7B9D	may-16	B-estradiol
7	00075BC1A1	4-ago-16	B-estradiol
8	00076B6B0C	15-may-16	B-estradiol
9	00075BD5D9	15-may-16	B-estradiol
10	00076B7CD5	15-may-16	B-estradiol
11	00076B7FF4	15-may-16	B-estradiol
12	00076B5F98	4-ago-16	B-estradiol
13	00075BA52B	4-ago-16	B-estradiol
14	00076B7AD1	4-ago-16	B-estradiol
15	00075BCA71	4-ago-16	B-estradiol
16	00075BCDCD	4-ago-16	B-estradiol
17	00075B9681	4-ago-16	B-estradiol
18	00076B66FA	15-may-16	B-estradiol
19	00076B2060	15-may-16	B-estradiol
20	00076B5CE6	15-may-16	B-estradiol
21	00076AABD4	4-ago-16	B-estradiol
22	00075BA49D	4-ago-16	B-estradiol
23	00075BD4E7	15-may-16	B-estradiol
24	00076B6BD2	15-may-16	B-estradiol
25	00076B5FFB	15-may-16	B-estradiol
26	00075BD6EF	4-ago-16	B-estradiol
27	00075BA5A6	may-16	B-estradiol
28	00076B5F05	10-sep-16	B-estradiol
29	00076B76D2	10-sep-16	B-estradiol
30	00076B6141	10-sep-16	B-estradiol
31	000759F1EA	10-sep-16	B-estradiol
32	00075BD91D	10-sep-16	B-estradiol
33	00076B5B89	10-sep-16	B-estradiol
34	00074CBBC9	10-sep-16	B-estradiol
35	00075B90A9	10-sep-16	B-estradiol

36	00076B7B24	10-sep-16	B-estradiol
37	00076B6FD5	10-sep-16	B-estradiol
38	00075BA35F	10-sep-16	B-estradiol
39	00075BA0B5	10-sep-16	B-estradiol
40	00076B834A	10-sep-16	B-estradiol
41	00076B750D	10-sep-16	B-estradiol
42	00076B5CD4	10-sep-16	B-estradiol
43	000759E1F8	10-sep-16	B-estradiol
44	00076B70C8	10-sep-16	B-estradiol
45	00076B6003	10-sep-16	B-estradiol
46	00075BB04C	10-sep-16	B-estradiol
47	00076B7C81	10-sep-16	B-estradiol
48	00075BAC71	10-sep-16	B-estradiol
49	00076B65E8	10-sep-16	B-estradiol
50	00076B5A63	10-sep-16	B-estradiol
51	00076B7FBB	10-sep-16	B-estradiol
52	00076B576A	10-sep-16	B-estradiol
53	00076B81D3	10-sep-16	B-estradiol
54	00075B8B59	10-sep-16	B-estradiol
55	00075BA370	10-sep-16	B-estradiol
56	00076B6C80	10-sep-16	B-estradiol
57	00076B6001	10-sep-16	B-estradiol
58	00076B7525	10-sep-16	B-estradiol
59	00075BBFE8	10-sep-16	B-estradiol
60	00075BC783	10-sep-16	B-estradiol
61	00076B6DC5	2-nov-16	sin hormona
62	00075BD48A	2-nov-16	sin hormona
63	00075BA36A	2-nov-16	sin hormona
64	00076B7C00	2-nov-16	sin hormona
65	00076B743E	2-nov-16	sin hormona
66	00076B6DBF	2-nov-16	sin hormona
67	00076B81D2	2-nov-16	sin hormona
68	00075BD810	2-nov-16	sin hormona
69	00076B585B	2-nov-16	sin hormona
70	00076B7B3D	2-nov-16	sin hormona
71	00075BAA6B	2-nov-16	sin hormona
72	00075B8850	2-nov-16	sin hormona
73	00076B6DC3	2-nov-16	sin hormona
74	00076B6153	2-nov-16	sin hormona
75	00075BB0CF	2-nov-16	sin hormona
76	00076B8418	2-nov-16	sin hormona

77	00075BD126	2-nov-16	sin hormona
78	00076B1FE6	2-nov-16	sin hormona
79	00076B7DDF	2-nov-16	sin hormona
80	00076B7E50	2-nov-16	sin hormona

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN usando kit comercial Quiagen®

Paso	Descripción
1	Cortar 25-30mg de aleta dorsal en pequeñas piezas, cuidando de no dejar secar el tejido humedeciendo con etanol 90%,y pasarlo a un tubo eppendorf de 1,5ml
2	Adicionar 180 µl de buffer ATL
3	Agregar 20 µl de proteinasa K
4	Aplicar vortex corto a fondo
5	Incubar en temoblock a 56°C por 2 horas (hasta que la muestra quede disuelto los pequeños trozos de aleta y aplicar vortex ocasional por 15 segundos)
6	Adicionar 200 µl de buffer AL y mezclar a fondo por vortex
7	Adicionar 200 µl de etanol absoluto frío y mezclar a fondo por vortex
8	Pipetear la mezcla (incluyendo cualquier precipitado) a una columna DNeasy colocada en tubo de colección de 2ml
9	Centrifugar la columna por 1 minuto a 8000rpm y descartar el líquido.
10	Adicionar suavemente 500 µl de buffer AW1
12	Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm y descartar el líquido.
13	Adicionar 500 µl de buffer AW2
14	Centrifugar por 4 minuto a 132000 RPM y descartar el liquido
15	Transferir la columna a un tubo eppendorf de 1,5ml
16	Adicionar de 75 µl de buffer AE directamente en la membrana de la columna
17	Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente
18	Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm
19	Adicionar 4 µl de RNAsa A al tubo e incubar en termoblock a 37°C por 30 minutos
20	Almacenar a -20°C

Anexo 3. Datos promedio de Cuantificación espectrofotométrica para muestras de extracción de DNA

Tratamiento	Muestra #	Repetición	A260/A280	A260/A230	Concentración (ng/μl)
Beta estradiol	1	1	1,84	1,74	1147
		2	1,84	1,73	1150
	4	1	2,01	1,62	1243
		2	2	1,6	1253
	6	1	1,82	1,81	740
		2	1,82	1,83	743
	7	1	1,73	1,52	852
		2	1,74	1,5	854
	13	1	1,85	1,82	1172
		2	1,85	1,82	1179
	14	1	1,81	1,48	753
		2	1,8	1,46	753
	15	1	1,84	1,37	594
		2	1,84	1,35	593
	16	1	1,85	1,43	651
		2	1,84	1,43	649
	17	1	1,9	1,71	700
		2	1,9	1,72	700
	21	1	1,9	1,61	678
		2	1,89	1,61	677
	22	1	1,84	1,69	874
		2	1,84	1,71	916
	26	1	1,86	1,63	777,5
		2	1,87	1,64	779,74
	28	1	1,88	1,96	887
		2	1,88	1,95	884
	30	1	1,85	1,74	1032
		2	1,84	1,74	1038
	31	1	1,74	1,22	884
		2	1,73	1,22	891
	32	1	1,83	1,68	1205
		2	1,83	1,69	1218
	34	1	1,69	1,2	581
		2	1,69	1,19	580
38	1	1,81	1,74	726	

		2	1,82	1,73	728
	39	1	1,86	1,97	1070
		2	1,86	1,97	1070
	41	1	1,85	1,8	1135
		2	1,85	1,8	1144
	42	1	1,71	1,24	612
		2	1,7	1,25	612
	44	1	1,76	1,29	924
		2	1,76	1,3	928
	45	1	1,72	1,43	732
		2	1,72	1,4	732
	46	1	1,73	1,33	659
		2	1,73	1,32	660
	47	1	1,77	1,74	782
		2	1,76	1,72	780
	49	1	1,84	1,75	922
		2	1,84	1,73	923
	50	1	1,75	1,24	1060
		2	1,74	1,24	1062
	51	1	1,8	1,5	1014
		2	1,8	1,5	1004
	52	1	1,79	1,84	782
		2	1,78	1,85	780
	53	1	1,84	1,71	888
		2	1,84	1,69	894
	54	1	1,84	1,68	882
		2	1,84	1,68	892
	56	1	-	-	-
		2	-	-	-
	57	1	1,84	1,74	998
		2	1,83	1,74	989
	58	1	1,79	1,57	548
		2	1,8	1,56	548
	59	1	1,8	1,71	695
		2	1,8	1,71	692
Hembras	61	1	1,84	1,76	1053
		2	1,84	1,74	1053
	62	1	1,72	1,97	157
		2	1,72	1,94	158

	63	1	1,73	1,8	317
		2	1,74	1,79	318
	64	1	1,74	1,98	196
		2	1,74	1,99	196
	67	1	1,63	1,16	87
		2	1,62	1,15	88
	68	1	1,74	1,6	410
		2	1,74	1,61	411
	69	1	1,68	1,27	205
		2	1,67	1,26	206
	70	1	1,76	1,79	565
		2	1,76	1,82	564
	79	1	1,71	1,01	88
		2	1,69	1,02	89
Machos	66	1	1,7	1,38	125
		2	1,7	1,37	125
	71	1	1,86	1,85	1214
		2	1,85	1,84	1221
	72	1	1,66	1,19	70
		2	1,65	1,18	70
	73	1	1,71	1,31	177
		2	1,71	1,31	177
	74	1	1,84	1,75	1033
		2	1,84	1,75	1038
	75	1	1,72	1,53	357
		2	1,76	1,54	356
	76	1	1,61	1,08	68
		2	1,61	1,07	68
	80	1	1,84	1,75	1005
		2	1,85	1,74	995
	12	1	1,76	1,35	193
		2	1,77	1,36	193

Anexo 4. Protocolo FISH para cromosomas metafásicos de tilapia roja obtenidos por cultivo de linfocitos

DIA	No. Paso	Descripción
	Consideraciones Previas	Las láminas con los extendidos cromosómicos a utilizar en el protocolo deben ser frescas (no dejar más de un día a temperatura ambiente) o conservadas a -20°C por un tiempo máximo de 6 meses.
1	1	Sumergir láminas en un coplin con solución de 2XSSC y dejar 2 minutos.
	2	Dejar secar y sumergir las láminas en un coplin con etanol al 70% por 2min
	3	Sin secar sumergir las láminas en un coplin con etanol al 95% por 2min
	4	Sin secar sumergir las láminas en un coplin con etanol al 100% por 2min y dejar secar a temperatura ambiente.
	5	Sobre la región a hibridar, agregue 3-5µl de la sonda previamente desnaturalizada, coloque una laminilla y selle los bordes con pegante bóxer.
	6	Llevar las láminas a una placa calefactora precalentada a 80°C x 2minutos
	7	Coloque las láminas en cámara húmeda e incube a 37°C por 17 horas (overnight).
2	8	Una vez completado el tiempo de incubación retirar las láminas de la cámara húmeda y a su vez, retirar las laminillas quitando el pegamento bóxer alrededor.
	9	Sumergir las láminas en 0,4XSSC a 73°C por 2min
	10	Sin secar, sumergir las láminas en 2xSSC a temperatura ambiente por 30 segundos.
	11	Adicionar 10µl de contrastante DAPI y cubra con laminilla
	12	Transporte en cámara oscura hasta montar al microscopio de fluorescencia
	13	Montar las láminas en el microscopio de epifluorescencia, ubicar el campo deseado y fotodigitalizar las imágenes en el filtro para DAPI
	14	En el mismo campo mover el carrete con los filtros hasta ubicar el filtro para FITC y fotodigitalizar las imágenes.
	15	En el software Zen, superponer las dos imágenes para ubicar la señal de fluorescencia

Anexo 5. Datos morfométricos de los cariotipos

Tabla 1. Longitudes promedio (\pm D.E.) de 16 cariotipos procedentes de cuatro machos y análisis del complemento cromosómico diploide de tilapia roja.

Par cromosómico	Promedio longitud p en μ m	DE	Promedio longitud q en μ m	DE	q+p	r	ic	Clasificación
1	2,922	0,866	0,417	0,13	3,339	7,01	12	ST
2	1,181	0,345	0,289	0,10	1,470	4,09	20	ST
3	0,703	0,151	0,529	0,11	1,232	1,33	43	M
4	0,610	0,089	0,291	0,14	0,901	2,10	32	SM
5	0,641	0,109	0,196	0,08	0,838	3,26	23	ST
6	0,632	0,122	0,178	0,08	0,811	3,55	22	ST
7	0,684	0,116	0,198	0,11	0,882	3,45	22	ST
8	0,719	0,124	0,176	0,08	0,895	4,09	20	ST
9	0,727	0,134	0,158	0,08	0,885	4,59	18	ST
10	0,745	0,118	0,192	0,08	0,938	3,87	21	ST
11	0,777	0,141	0,178	0,08	0,955	4,35	19	ST
12	0,782	0,119	0,155	0,07	0,937	5,04	17	ST
13	0,799	0,130	0,164	0,10	0,963	4,87	17	ST
14	0,812	0,114	0,131	0,05	0,942	6,20	14	ST
15	0,849	0,134	0,166	0,06	1,015	5,11	16	ST
16	0,857	0,133	0,170	0,08	1,028	5,03	17	ST
17	0,876	0,127	0,167	0,10	1,043	5,25	16	ST
18	0,896	0,145	0,124	0,08	1,020	7,26	12	T
19	0,935	0,140	0,143	0,10	1,078	6,55	13	ST
20	0,939	0,165	0,118	0,08	1,058	7,94	11	T
21	1,010	0,185	0,135	0,11	1,145	7,49	12	T
22	1,049	0,195	0,144	0,14	1,192	7,29	12	T
	20,145		4,420		24,565			

Tabla 2. Longitudes promedio (\pm D.E.) de 12 cariotipos procedentes de tres hembras y análisis del complemento cromosómico diploide de tilapia roja.

Par cromosómico	Promedio longitud p en μm	DE	Promedio longitud q en μm	DE	q+p	r	ic	Clasificación
1	2,877	0,532	0,497	0,08	3,374	5,78	15	ST
2	1,225	0,202	0,381	0,09	1,606	3,22	24	ST
3	0,706	0,096	0,555	0,07	1,261	1,27	44	M
4	0,611	0,087	0,120	0,07	0,732	5,08	16	ST
5	0,643	0,085	0,104	0,04	0,747	6,18	14	ST
6	0,668	0,090	0,140	0,08	0,809	4,76	17	ST
7	0,694	0,074	0,162	0,07	0,856	4,27	19	ST
8	0,694	0,084	0,097	0,04	0,790	7,19	12	T
9	0,726	0,074	0,134	0,08	0,859	5,42	16	ST
10	0,737	0,073	0,132	0,05	0,869	5,57	15	ST
11	0,769	0,089	0,107	0,05	0,876	7,20	12	T
12	0,771	0,088	0,085	0,05	0,856	9,07	10	T
13	0,779	0,073	0,108	0,06	0,887	7,21	12	T
14	0,775	0,086	0,082	0,04	0,857	9,48	10	T
15	0,810	0,083	0,101	0,06	0,911	8,04	11	T
16	0,828	0,097	0,126	0,07	0,954	6,56	13	ST
17	0,852	0,096	0,101	0,05	0,953	8,40	11	T
18	0,876	0,086	0,114	0,05	0,990	7,70	12	T
19	0,888	0,103	0,078	0,06	0,966	11,43	8	T
20	0,915	0,098	0,103	0,04	1,018	8,93	10	T
21	0,952	0,105	0,076	0,07	1,028	12,49	7	T
22	0,989	0,100	0,079	0,06	1,068	12,48	7	T
	19,784		3,482		23,266			

Tabla 3. Longitudes promedio (\pm D.E.) de 8 cariotipos procedentes de 2 neohembras y análisis del complemento cromosómico diploide de tilapia roja.

Par cromosómico	$\Delta\varphi 1$								$\Delta\varphi 4$							
	Promedio longitud p en μm	DE	Promedio longitud q en μm	DE	q+p	r	ic	Clasificación	Promedio longitud p en μm	DE	Promedio longitud q en μm	DE	q+p	r	ic	Clasificación
1	2,725	0,526	0,473	0,043	3,198	5,8	15	ST	2,545	0,385	0,499	0,068	3,044	5,1	16	ST
2	1,245	0,273	0,444	0,129	1,689	2,8	26	ST	1,025	0,158	0,409	0,067	1,434	2,5	29	SM
3	0,691	0,128	0,559	0,069	1,250	1,2	45	M	0,615	0,072	0,540	0,061	1,156	1,1	47	M
4	0,611	0,087	0,163	0,064	0,774	3,8	21	ST	0,506	0,100	0,129	0,065	0,635	3,9	20	ST
5	0,636	0,056	0,149	0,050	0,784	4,3	19	ST	0,558	0,097	0,117	0,063	0,675	4,8	17	ST
6	0,679	0,105	0,139	0,052	0,818	4,9	17	ST	0,595	0,085	0,112	0,034	0,707	5,3	16	ST
7	0,684	0,083	0,147	0,033	0,831	4,7	18	ST	0,618	0,091	0,224	0,156	0,842	2,8	27	SM
8	0,712	0,100	0,162	0,105	0,874	4,4	19	T	0,629	0,079	0,180	0,061	0,809	3,5	22	ST
9	0,739	0,093	0,130	0,060	0,869	5,7	15	ST	0,636	0,069	0,124	0,060	0,760	5,1	16	ST
10	0,747	0,099	0,098	0,047	0,845	7,6	12	T	0,669	0,098	0,119	0,057	0,788	5,6	15	ST
11	0,772	0,102	0,162	0,038	0,934	4,8	17	ST	0,677	0,072	0,119	0,038	0,796	5,7	15	ST
12	0,793	0,114	0,112	0,044	0,905	7,1	12	T	0,695	0,092	0,105	0,033	0,800	6,7	13	ST
13	0,792	0,102	0,093	0,045	0,885	8,5	11	T	0,726	0,076	0,135	0,054	0,862	5,4	16	ST
14	0,799	0,098	0,086	0,027	0,885	9,3	10	T	0,732	0,133	0,148	0,087	0,880	4,9	17	ST
15	0,812	0,096	0,112	0,075	0,924	7,2	12	T	0,736	0,094	0,082	0,068	0,817	9,0	10	T
16	0,845	0,120	0,073	0,013	0,918	11,6	8	T	0,758	0,095	0,141	0,069	0,898	5,4	16	ST
17	0,886	0,121	0,065	0,049	0,951	13,7	7	T	0,787	0,085	0,081	0,052	0,868	9,7	9	T
18	0,873	0,117	0,083	0,054	0,955	10,5	9	T	0,781	0,098	0,061	0,048	0,843	12,7	7	T
19	0,882	0,119	0,069	0,049	0,951	12,9	7	T	0,794	0,079	0,056	0,067	0,850	14,2	7	T
20	0,917	0,118	0,082	0,016	0,999	11,2	8	T	0,839	0,072	0,110	0,056	0,949	7,6	12	T
21	0,919	0,106	0,022	0,039	0,941	40,9	2	T	0,884	0,075	0,043	0,050	0,926	20,6	5	T
22	0,973	0,110	0,042	0,025	1,015	23,0	4	T	0,915	0,065	0,089	0,029	1,003	10,3	9	T
	19,732		3,464		23,195				17,718		3,624		21,342			

Tabla 4. Longitudes promedio (\pm D.E.) de 8 cariotipos procedentes de 2 neohembras y análisis del complemento cromosómico diploide de tilapia roja.

Par cromosómico	$\Delta\varphi 6$								$\Delta\varphi 17$							
	Promedio longitud p en μm	DE	Promedio longitud q en μm	DE	q+p	r	ic	Clasificación	Promedio longitud p en μm	DE	Promedio longitud q en μm	DE	q+p	r	ic	Clasificación
1	2,900	0,345	0,381	0,056	3,281	7,6	12	T	3,178	0,598	0,460	0,094	3,638	6,9	13	ST
2	1,201	0,126	0,450	0,055	1,651	2,7	27	SM	1,373	0,178	0,353	0,061	1,726	3,9	20	ST
3	0,685	0,084	0,585	0,094	1,270	1,2	46	M	0,842	0,118	0,559	0,139	1,401	1,5	40	M
4	0,554	0,039	0,225	0,073	0,779	2,5	29	SM	0,672	0,065	0,262	0,151	0,934	2,6	28	SM
5	0,590	0,021	0,112	0,030	0,703	5,3	16	ST	0,679	0,077	0,133	0,060	0,812	5,1	16	ST
6	0,634	0,024	0,189	0,045	0,823	3,4	23	ST	0,700	0,106	0,109	0,022	0,810	6,4	14	ST
7	0,628	0,017	0,179	0,098	0,808	3,5	22	ST	0,783	0,115	0,190	0,145	0,973	4,1	20	ST
8	0,654	0,020	0,146	0,065	0,800	4,5	18	ST	0,783	0,085	0,099	0,028	0,882	7,9	11	T
9	0,667	0,021	0,133	0,081	0,800	5,0	17	ST	0,809	0,093	0,205	0,136	1,014	3,9	20	ST
10	0,687	0,033	0,198	0,091	0,885	3,5	22	ST	0,831	0,086	0,177	0,104	1,009	4,7	18	ST
11	0,670	0,022	0,135	0,056	0,805	5,0	17	ST	0,861	0,094	0,153	0,074	1,013	5,6	15	ST
12	0,699	0,030	0,130	0,039	0,830	5,4	16	ST	0,870	0,100	0,130	0,047	1,000	6,7	13	ST
13	0,701	0,030	0,068	0,048	0,769	10,2	9	T	0,909	0,112	0,190	0,146	1,099	4,8	17	ST
14	0,719	0,029	0,073	0,052	0,792	9,8	9	T	0,921	0,128	0,154	0,063	1,075	6,0	14	ST
15	0,748	0,025	0,158	0,063	0,907	4,7	17	ST	0,918	0,115	0,111	0,067	1,029	8,3	11	T
16	0,742	0,018	0,116	0,044	0,859	6,4	14	ST	0,974	0,125	0,198	0,118	1,172	4,9	17	ST
17	0,765	0,025	0,166	0,064	0,931	4,6	18	ST	0,974	0,139	0,138	0,057	1,111	7,1	12	ST
18	0,802	0,053	0,168	0,067	0,970	4,8	17	ST	1,008	0,115	0,137	0,030	1,144	7,4	12	ST
19	0,804	0,048	0,053	0,055	0,857	15,1	6	T	1,044	0,159	0,086	0,058	1,130	12,1	8	T
20	0,844	0,030	0,108	0,082	0,953	7,8	11	T	1,049	0,178	0,046	0,050	1,094	23,0	4	T
21	0,870	0,059	0,135	0,053	1,004	6,5	13	ST	1,153	0,160	0,200	0,160	1,353	5,8	15	ST
22	0,948	0,105	0,109	0,119	1,057	8,7	10	T	1,216	0,138	0,136	0,202	1,352	8,9	10	T
	18,513		4,019		22,531				22,547		4,226		26,77			

Tabla 5. Longitudes promedio (\pm D.E.) de 8 cariotipos procedentes de 2 neohembras y análisis del complemento cromosómico diploide de tilapia roja.

Par cromosómico	$\Delta\varphi$ 30								$\Delta\varphi$ 33							
	Promedio longitud p en μm	DE	Promedio longitud q en μm	DE	q+p	r	ic	Clasificación	Promedio longitud p en μm	DE	Promedio longitud q en μm	DE	q+p	r	ic	Clasificación
1	2,786	0,245	0,508	0,060	3,295	5,5	15	ST	2,435	0,409	0,466	0,060	2,901	5,2	16	ST
2	1,117	0,101	0,470	0,056	1,587	2,4	30	SM	1,231	0,115	0,351	0,061	1,582	3,5	22	ST
3	0,625	0,083	0,505	0,066	1,130	1,2	45	M	0,671	0,119	0,558	0,045	1,229	1,2	45	M
4	0,521	0,025	0,130	0,056	0,651	4,0	20	ST	0,530	0,025	0,195	0,092	0,725	2,7	27	SM
5	0,555	0,044	0,151	0,081	0,706	3,7	21	ST	0,587	0,057	0,187	0,085	0,774	3,1	24	ST
6	0,639	0,040	0,224	0,069	0,862	2,9	26	ST	0,611	0,042	0,112	0,086	0,723	5,4	16	ST
7	0,647	0,023	0,169	0,022	0,816	3,8	21	ST	0,639	0,060	0,164	0,064	0,802	3,9	20	ST
8	0,656	0,057	0,137	0,019	0,793	4,8	17	T	0,641	0,058	0,101	0,044	0,742	6,3	14	ST
9	0,655	0,035	0,092	0,014	0,747	7,1	12	T	0,657	0,075	0,097	0,054	0,754	6,8	13	ST
10	0,678	0,042	0,133	0,101	0,810	5,1	16	ST	0,644	0,048	0,071	0,021	0,715	9,1	10	T
11	0,708	0,053	0,169	0,105	0,876	4,2	19	ST	0,674	0,091	0,116	0,094	0,790	5,8	15	ST
12	0,705	0,042	0,162	0,083	0,868	4,3	19	ST	0,704	0,091	0,103	0,092	0,807	6,8	13	ST
13	0,709	0,034	0,113	0,016	0,823	6,3	14	ST	0,726	0,079	0,135	0,055	0,861	5,4	16	ST
14	0,724	0,061	0,112	0,033	0,836	6,5	13	ST	0,730	0,077	0,134	0,034	0,864	5,5	15	ST
15	0,735	0,051	0,135	0,105	0,870	5,5	15	ST	0,743	0,099	0,155	0,057	0,898	4,8	17	ST
16	0,784	0,060	0,163	0,073	0,947	4,8	17	ST	0,742	0,098	0,090	0,048	0,832	8,2	11	T
17	0,794	0,062	0,174	0,033	0,968	4,6	18	ST	0,774	0,097	0,072	0,049	0,846	10,8	9	T
18	0,789	0,053	0,072	0,049	0,861	10,9	8	T	0,785	0,078	0,087	0,044	0,872	9,0	10	T
19	0,804	0,080	0,148	0,096	0,952	5,5	16	ST	0,807	0,080	0,108	0,065	0,915	7,5	12	T
20	0,837	0,093	0,095	0,046	0,932	8,9	10	T	0,821	0,083	0,142	0,096	0,963	5,8	15	ST
21	0,755	0,291	0,069	0,069	0,824	10,9	8	T	0,825	0,096	0,094	0,069	0,919	8,8	10	T
22	0,945	0,122	0,084	0,096	1,029	11,3	8	T	0,915	0,110	0,089	0,065	1,004	10,2	9	T
	18,168		4,016		22,183				17,9		3,6		21,5			

Tabla 6. Longitudes promedio (\pm D.E.) de 8 cariotipos procedentes de 2 neohembras y análisis del complemento cromosómico diploide de tilapia roja.

Par cromosómico	$\Delta\varphi$ 42								$\Delta\varphi$ 50							
	Promedio longitud p en μ m	DE	Promedio longitud q en μ m	DE	q+p	r	ic	Clasificación	Promedio longitud p en μ m	DE	Promedio longitud q en μ m	DE	q+p	r	ic	Clasificación
1	3,310	0,229	0,521	0,062	3,831	6,4	14	ST	2,497	0,302	0,428	0,050	2,925	5,8	15	ST
2	1,221	0,120	0,453	0,028	1,674	2,7	27	ST	0,896	0,171	0,345	0,054	1,241	2,6	28	SM
3	0,693	0,048	0,584	0,048	1,277	1,2	46	M	0,522	0,036	0,442	0,026	0,964	1,2	46	M
4	0,583	0,096	0,221	0,046	0,805	2,6	28	SM	0,525	0,040	0,116	0,046	0,641	4,5	18	ST
5	0,631	0,090	0,287	0,018	0,918	2,2	31	SM	0,542	0,048	0,158	0,133	0,700	3,4	23	ST
6	0,625	0,099	0,241	0,049	0,866	2,6	28	SM	0,562	0,045	0,159	0,082	0,721	3,5	22	ST
7	0,668	0,081	0,247	0,052	0,915	2,7	27	SM	0,599	0,046	0,210	0,040	0,809	2,8	26	SM
8	0,668	0,110	0,226	0,067	0,894	3,0	25	SM	0,584	0,040	0,147	0,037	0,731	4,0	20	ST
9	0,712	0,080	0,301	0,086	1,013	2,4	30	SM	0,603	0,045	0,138	0,059	0,741	4,4	19	ST
10	0,702	0,082	0,272	0,051	0,974	2,6	28	SM	0,615	0,052	0,122	0,039	0,737	5,1	17	ST
11	0,756	0,089	0,311	0,046	1,067	2,4	29	SM	0,633	0,046	0,120	0,014	0,753	5,3	16	ST
12	0,770	0,079	0,250	0,056	1,020	3,1	25	ST	0,639	0,057	0,185	0,095	0,824	3,4	22	ST
13	0,746	0,071	0,235	0,063	0,981	3,2	24	ST	0,664	0,057	0,144	0,056	0,808	4,6	18	ST
14	0,800	0,057	0,272	0,029	1,071	2,9	25	SM	0,677	0,047	0,133	0,059	0,810	5,1	16	ST
15	0,806	0,051	0,166	0,108	0,972	4,9	17	ST	0,695	0,049	0,079	0,062	0,774	8,8	10	T
16	0,808	0,056	0,169	0,115	0,976	4,8	17	ST	0,711	0,054	0,184	0,078	0,894	3,9	21	ST
17	0,829	0,075	0,154	0,110	0,983	5,4	16	ST	0,712	0,072	0,149	0,056	0,860	4,8	17	ST
18	0,868	0,031	0,216	0,128	1,083	4,0	20	ST	0,721	0,064	0,120	0,042	0,841	6,0	14	ST
19	0,885	0,065	0,247	0,072	1,132	3,6	22	ST	0,726	0,054	0,089	0,028	0,815	8,2	11	T
20	0,913	0,049	0,223	0,048	1,136	4,1	20	ST	0,751	0,068	0,149	0,061	0,900	5,1	17	ST
21	0,935	0,092	0,217	0,085	1,152	4,3	19	ST	0,748	0,069	0,104	0,028	0,852	7,2	12	T
22	0,994	0,084	0,203	0,129	1,197	4,9	17	ST	0,810	0,076	0,021	0,037	0,832	38,0	3	T
	19,922		6,016		25,938				16,4		3,7		20,2			

Anexo 6. Tablas de frecuencia para alelos y genotipos

Alelos de la población total	
Alelos	Frecuencia
230	4
240	16
250	15
260	12
270	20
280	17
290	10
295	10
Total	104

Alelos Población	Frecuencia de Individuos		
	XY	XX	$\Delta\varphi XY$
230	0	0	4
240	0	4	12
250	2	1	12
260	7	2	3
270	3	5	12
280	0	3	14
290	3	2	5
295	3	1	6
Subtotal	18	18	68
Total	104		

Genotipos de la población total	
Genotipo alélico	Frecuencia
230/240	1
230/250	2
230/270	1
240/250	1
240/270	7
240/280	6
240/290	1
250/x	1
250/260	2
250/270	3
250/280	6
260/270	1
260/290	5
260/295	4
270/280	1
270/290	2
270/295	5
280/x	1
280/295	1
280/290	2
Total	53

Genotipo alélico	Frecuencia de Individuos		
	XY	XX	$\Delta\varphi XY$
230/240	0	0	1
230/250	0	0	2
230/270	0	0	1
240/250	0	0	1
240/270	0	3	4
240/280	0	1	5
240/290	0	0	1
250/x	0	0	1
250/260	1	1	0
250/270	1	0	2
250/280	0	0	6
260/270	1	0	0
260/290	2	1	2
260/295	3	0	1
270/280	0	1	0
270/290	1	1	0
270/295	0	0	5
280/x	0	0	1
280/295	0	1	0
280/290	0	0	2
Subtotal	9	9	35
Total	53		

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abucay, J. S., & Mair, G. C. (2004). Methods of identifying males with yy genotype in. *Department of Agriculture, DA-BFAR (Philippines) and the American Tilapia Association.*, 104-109.
- Alcaldia de Ginebra, V. del C. (2017). Sitio Oficial del Municipio de Ginebra, Valle del Cauca, Colombia. Recuperado 25 de enero de 2017, a partir de http://www.ginebra-valle.gov.co/informacion_general.shtml
- Alcantar-Vazquez, J. P., De la torre, R. M., Calzada-Ruiz, D., & Carolina, E.-A. (2014). Production of YY-male of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) from atypical fish. *Latin American Journal Aquatic Research*, 42(3), 644-648. <https://doi.org/103856/vol42-issue3-fulltext-21>
- Alcántar Vázquez, J. P., Rueda Curiel, P., Calzada Ruiz, D., Antonio Estrada, C., & Moreno de la Torre, R. (2015). Feminization of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) by estradiol-17 β . Effects on growth, gonadal development and body composition. *Hidrobiológica*, 25(2), 275-283.
- Andreato, A. A., Almeida-toledo, L. F. De, Oliveira, C., & Filho, S. D. A. T. (1992). Chromosome Studies in Hypoptopomatinae (Pisces , Siluriformes , Loricariidae): I . XX / XY Sex Chromosome Heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia*, 57, 369-372. <https://doi.org/10.1508/cytologia.57.369>
- Arias-rodriguez, L., Páramo-delgadillo, S., & Durán-gonzález, A. D. L. (2006). Caraterización citogenética del pez tropical de agua dulce *Parachromis managuensis* (Pisces : Cichlidae). *Revista de biología Tropical*, 54, 35-42.
- 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 - A Molecular and Integrative Physiology*, 153(1), 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.018>
- Baroiller, J. F., & Jalabert, B. (1989). Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapia. *Aquat. Living Res*, 2, 105-116.
- Beardmore, J. ., Mair, G. ., & Lewis, R. . (2001). Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197(1-4), 283-301. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00590-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00590-7)
- Bickmore, W. A. (2001). Karyotype Analysis and Chromosome Banding. En *Enciclopedia of Life Sciencies* (pp. 1-7).
- Burbano, C. (2002). Citogenetica aplicada Peces. En *Fundamentos De Acuicultura Continental*. (pp. 85-102). Inpa.

- Calhoun, W. E., & Shelton, W. L. (1983). Sex ratios of progeny from mass spawnings of sex-reversed broodstock of *Tilapia nilotica*. *Aquaculture*, 33, 365-371.
- Camacho, J. (1999). *Caracterización citogenética y relaciones biogeográficas en poblaciones colombianas de Pseudoplatystoma fasciatum y Pseudoplatystoma tigrinum (Pisces: Siluriformes: Pimelodidae)*. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.
- Campos-Ramos, R., Harvey, S., Masabanda, J., Carrasco, L., Griffin, D., McAndrew, B., ... Penman, D. (2002). Identification of putative sex chromosomes in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, through synaptonemal complex and FISH analysis. *Genetica*, 111, 143–153.
- Carleton, K. L., Streelman, J. T., Lee, B. Y., Garnhart, N., Kidd, M., & Kocher, T. D. (2002). Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Animal Genetics*, 33(2), 140-144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2002.00817.x>
- 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, 207-218.
- Castillo Campo, L. F. (2006). *Tilapia roja*.
- Castillo Campo, L. F. (2011). *TILAPIA ROJA 2011 : UNA EVOLUCION DE 29 AÑOS, DE LA INCERTIDUMBRE AL EXITO*.
- Chalopin, D., Volff, J.-N., Galiana, D., Anderson, J. L., & Scharf, M. (2015). Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 23(3), 545-60. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9490-8>
- Cioffi, M. B., Camacho, J. P. M., & Bertollo, L. A. C. (2011). Repetitive DNAs and differentiation of sex chromosomes in neotropical fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, 132(3), 188-194. <https://doi.org/10.1159/000321571>
- Cnaani, A., & Kocher, T. (2008). Sex-linked markers and microsatellite locus duplication in the cichlid species *Oreochromis tanganicae*. *Biol Lett*, 4, 700–703.
- Cnanni, A. (2013). The Tilapia's chromosomes influencing sex determination. *Cytogenetic and Genome Research*, 141, 195-205.
- Crosetti, D., Sola, L., Brunner, P., & Cataudella, S. (1988). Cytogenetical characterization of *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* and their hybrid. In *The Second Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand and International Center for Living Aquatic Resources M.*
- Duarte, K. M. R., Silva, F. M. S. M., & Meirelles, C. F. (2002). Resíduos de anabolizantes na produção animal: importância e métodos de detecção. *Cienc. Rur., Santa Maria*, 23(4), 731-737.

- Dunham, R. A., Majumdar, K., Hallerman, E., Bartley, D., Mair, G., Hulata, G., ... Hoerstgen-Schwark, G. (2001). Review of the status of aquaculture genetics. En R. P. Subasinghe, P. Bueno, M. J. Phillips, C. Hough, S. E. McGladdery, & J. R. Arthur (Eds.), *Aquaculture in The Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium* (p. 137-166.). Bangkok, Thailand: NACA, Bangkok and FAO, Rome.
- El-serafy, S. C., Al-Zahaby, E. S., Zowail, M. E. M., Dawood, W., & Badway, E. A. A. (1993). Comparative cytogenetic studies on two *Tilapia* sp. From different localities. *Fac . Sci . Zagazig univ.*, 14(2), 449 – 471.
- 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*). *Genes/Genomes/Genetics*, 2(1), 35-42. <https://doi.org/10.1534/g3.111.001545>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02128.x>
- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Gonzales Rodriguez, F. A. (2005). *La cadena de la Piscicultura en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de trabajo No. 72.*
- Fan, Y. (2002). *Molecular Cytogenetics: Protocol and Applications* (Vol. 204).
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Contribucion a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos.*
- FEDEACUA, AUNAP, & MINAGRICULTURA. (2015). *Plan de Negocios Sectorial de la Piscicultura de Colombia.* Recuperado a partir de <https://www.ptp.com.co/documentos/Plan de Negocio Piscicola Final 2015.pdf>
- Feldberg, E., & Bertollo, L. A. C. (1985). Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, 38. <https://doi.org/10.1080/00087114.1985.10797749>
- Feldberg, E., Porto, J. I. R., Alves, M. N., Mendonça, M. N. C., & Benzaquem, D. C. (2004). B chromosomes in Amazonian cichlid species. *Cytogenet Genome Res*, 106. <https://doi.org/10.1159/000079287>
- Feldberg, E., Porto, J. I. R., & Bertollo, L. A. C. (2003). Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. En A. L. Val & B. G. Kapoor (Eds.), *Fish Adaptation* (pp. 285-308). Science Publishers, Enfield.
- Ferreira, I. a., & Martins, C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA

- sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, 39(4), 411-418. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.02.010>
- Foresti, F., Oliveira, C., Galetti, P. M., & Almeida-Toledo, L. F. (1993). Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia *Oreochromis niloticus* Pisces, Cichlidae. *Genome*, 36, 1124–1128.
- Galetti, P. M., Aguilar, C. T., & Molina, W. F. (2000). An overview on marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia*, 420. <https://doi.org/10.1023/A:1003977418900>
- Galetti, P. M., Foresti, F., Bertollo, L. A. C., & Moreira-Filho, O. (1984). Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing regions. *Caryologia*, 37, 401-406.
- Gall, J. G. (2016). The origin of in situ hybridization - A personal history. *Methods*, 98, 4-9. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.11.026>
- García Cegarra, A. M. (2010). Localización cromosómica de clones Bac y su aplicación en el mapeo físico de genes de interés para la acuicultura de *Solea senegalensis*, 11510.
- Griffin, D. K., Harvey, S. C., Campos-Ramos, R., Ayling, L.-J., Bromage, N. R., Masabanda, J. S., & Penman, D. J. (2002). Early origins of the X and Y chromosomes: Lessons from tilapia. *Cytogenetic and Genome Research*, 99(1-4), 157-163. <https://doi.org/10.1159/000071588>
- Guerrero, R. D., & Shelton, W. L. (1974). An aceto-carmine squash technique for sexing juvenile fishes. *The Progressive Fish-Culturist*, 36, 56.
- Guerrero III, R. D. (1975). Use of Androgens for the Production of All-Male *Tilapia aurea* (Steindachner). *Transactions of the American Fisheries Society*, 104(2), 342-348. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1975\)104<342](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1975)104<342)
- Harvey, S. C., Boonphakdee, C., Campos-Ramos, R., Ezaz, M. T., Griffin, D. K., Bromage, N. R., & Penman, D. J. (2003). Analysis of repetitive DNA sequences in the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*. *Cytogenetic and Genome Research*, 101(3-4), 314-319. <https://doi.org/10.1159/000074355>
- Harvey, S. C., Powell, S. F., Kennedy, D. D., McAndrew, B. J., & Penman, D. J. (2002). Karyotype analysis of *Oreochromis mortimeri* (Trewavas) and *Sarotherodon melanotheron* (Ruppell). *Aquaculture Research*, 33(5), 339-342. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00678.x>
- He, A., Luo, Y., & Yang, H. (2015). Complete mitochondrial DNA sequences of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Blue tilapia (*Oreochromis aureus*): genome characterization and phylogeny applications. *Molecular Biology Reports*, 38(3), 2015-2021. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0324-7>

- Hopkins, K. D., Shelton, W. ., & Engle, C. R. (1979). Estrogen sex-reversal of *Tilapia Aurea*. *Aquaculture*, 18, 263-268.
- Hsu, T. C., & Arrighi, F. G. (1971). Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. *Chromosoma*, 34, 243-253.
- Huziwaru, Y. (1962). Karyotype Analysis in Some Genera of Compositae . VIII . Further Studies on the Chromosomes of *Aster*. *American Journal of Botany*, 49(2), 116-119. Recuperado a partir de <http://www.jstor.org/stable/2439026>
- IDEAM, I. de H. M. y E. A. (2015). Boletín Climatológico Años 2015 -2106. Recuperado 27 de julio de 2017, a partir de http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/climatologico-mensual/-/document_library_display/xYvIPc4uxk1Y/view/299660?_110_INSTANCE_xYvIPc4uxk1Y_redirect=http%3A%2F%2Fwww.ideam.gov.co%2Fweb%2Ftiempo-y-clima%2Fclimatologico-mensual%3Fp_id%3D110_INSTANCE_x
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D., Sakai, F., Paul-Prasanth, B Nakamura, M., & Naghama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol. Reprod.*, 78, 333-341.
- Jensen, G. L., & Shelton, W. L. (1979). Effects of estrogens on *Tilapia aurea*: Implications for production of monosex genetic male tilapia. *Aquaculture*, 16(3), 233-242. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(79\)90111-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(79)90111-X)
- Kelly, J. D., Gepts, P., Miklas, P. ., & Coyne, D. P. (2003). Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research*, 82, 135-154.
- Khan, M. G. Q. (2011). *Marker-assisted selection in enhancing genetically male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) production*. University of Stirling.
- Klinkhardt, M., Tesche, M., & Greven, H. (1995). *Database of fish chromosomes*. Magdeburg: Westarp Wissenschaften.
- Kocher, T. D., Lee, W., Sobolewska, H., Penman, D., & McAndrew, B. (1998). A Genetic Linkage Map of a Cichlid Fish , the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 148(3), 1225-32.
- Król, J., Pobłocki, W., Bockenheimer, T., & Hliwa, P. (2014). Effect of diethylstilbestrol (DES) and 17 β -estradiol (E2) on growth, survival and histological structure of the internal organs in juvenile European catfish *Silurus glanis* (L.). *Aquaculture International*, 22(1), 53-62. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9664-3>
- Lee, B.-Y., Coutanceau, J.-P., Ozouf-Costaz, C., D'Cotta, H., Baroiller, J.-F., & Kocher, T. D. (2011). Genetic and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 13(3), 557-62.

<https://doi.org/10.1007/s10126-010-9326-7>

- Lee, B.-Y., Lee, W.-J., Streebman, 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), 237-44. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035022>
- Lee, B.-Y., 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.01035.x>
- Lenin, A., Leonardo, I., & Del Valle, P. G. (2004). Los Cromosomas Mitóticos y Meióticos de la Tenguaca *Petenia splendida* (GÜNTHER, 1862) (PISCES: CICHLIDAE). *Revista de biología Tropical*, 56(June), 895-907.
- Leonhardt, J. H. (1997). *EFEITO DA REVERSÃO SEXUAL EM TILÁPIA DO NILO*, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757).
- Leonhardt Rodrigues, M. C., Caetano, L. G., Fenocchio, A., Filho, M. C., & Leonhardt, J. H. (2006). Caracterização cariotípica de um estoque de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, da Universidade Estadual de Londrina, mediante diversas técnicas de bandamento cromossômico. *Revista Semina: Ciências Agrárias Londrina*, 27(4), 679-684.
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52, 201-220.
- Levitsky, G. (1931). The karyotype in systematics. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*, 27, 220-240.
- Lopez-escudero, C., Alvarez Arcila, A., & Botero Aguirre, M. (2013). Supermales production: determination of CY sexual genotype in neofemales of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by molecular test. En *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* (p. 337).
- Lopez Garcia, V. J. (2012). *ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE DOS ESPECIES DE PARGO* *Lutjanus guttatus* y *Lutjanus argentiventris*, DEL PACIFICO COLOMBIANO, MEDIANTE TECNICAS MOLECULARES. Recuperado a partir de <http://www.bdigital.unal.edu.co/12695/>
- M, Von-Hessberg, C., Quintero-Grajales, A., & Restrepo-Murillo, M. A. (2012). *Monografía de protocolos para obtener poblaciones monosexo de tilapia nilótica (Oreochromis niloticus, TREW.1983)* (Vol. 16).
- Mair, G. C., Abucay, J. S., Skibinski, D. O. F., Abella, T. A., & Beardmore, J. a. (1997). Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all- male tilapia *Oreochromis niloticus* L. Freshwater Aquaculture Center, Central Luzon State University, Nueva. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 54(2), 396-404.

- Mair, G. C., Scott, a. G., Penman, D. J., Skibinski, D. O. F., & Beardmore, J. a. (1991). Sex determination in the genus *Oreochromis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 82(2), 153-160. <https://doi.org/10.1007/BF00226206>
- Majumdar, K. C., & McAndrew, B. J. (1986a). Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera, *Tilapia*, *Sarotherodon*, and *Oreochromis* of the tribe Tilapiini (Pisces, Cichlidae). *Genetica*, 68(3), 175-188. <https://doi.org/10.1007/BF02424441>
- Majumdar, K. C., & McAndrew, B. J. (1986b). Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera, *Tilapia*, *Sarotherodon*, and *Oreochromis* of the tribe Tilapiini (Pisces, Cichlidae). *Genetica*, 68. <https://doi.org/10.1007/BF02424441>
- Mandáková, T., & Lysak, M. A. (2016). Painting of Arabidopsis Chromosomes with Chromosome-Specific BAC Clones. *Current Protocols in Plant Biology*, 1, 359-371.
- Martins, C., Oliveira, C., Wasko, A. P., & Wright, J. M. (2004). Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - A review. *Aquaculture*, 231(1-4), 37-49. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.017>
- Martins, C., & Vicari, M. R. (2012). Hibridização in situ em cromossomos de peixes. En M. Guerra (Ed.), *Citogenética Molecular:Protocolos comentados* (p. 132). Cubo.
- Martins, I. C., Portela, A. L. B., & Julio, H. F. (1995). Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces, Perciformes) from the Paraná River. *Cytologia*, 60. <https://doi.org/10.1508/cytologia.60.223>
- Medrano, L., Bernardi, G., Couturier, J., Dutrillaux, B., & Bernardi, G. (1988). Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromosoma*, 96(2), 178-183. <https://doi.org/10.1007/BF00331050>
- Merino, M. C., Bonilla, S. P., & Bages, F. (2013). *Diagnóstico del estado de la Acuicultura en Colombia*.
- Muller-Belecke, A., & Horstgen-Schwark, G. (1995). Sex determination in *Oreochromis niloticus* sex ratios in homozygous gynogenetic progeny. *Aquaculture*, 137(1-4), 107. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(96\)83541-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(96)83541-1)
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction,. *Methods in Enzymology Academic Press*, 155, 335-350.
- Nanda, I., Feichtinger, W., Schmid, M., Schroder, J. H., Zischler, H., & J.T., E. (1990). Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in Guppy fish. *J. Mol. Evol.*, 30, 456-462.
- Naranjo, G., Ortiz, D. R., Chávez, M. A., Manjunatha, B., Tirado, J. O., Muñoz, D., ...

- Naranjo, G. (2015). Optimization of detection of sexual genotype through microsatellites in populations of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from the breeding pools, *7*(10), 536-542.
- Naranjo Meneses, G. A. (2014). *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*. Universidad de las Fuerzas Armadas.
- NCBI. (2017). National Center for Biotechnology Information. Recuperado 22 de junio de 2017, a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=498166>
- Nirchio, M., & Oliveira, C. (2014). Artículo de revisión agrobiología Citogenética como herramienta taxonómica en Peces. *Saber, Universidad de Oriente; Venezuela*, *26*(4), 361-372.
- Ocalewicz, K., Mota-Velasco, J. C., Campos-Ramos, R., & Penman, D. J. (2009). FISH and DAPI staining of the synaptonemal complex of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) allow orientation of the unpaired region of bivalent 1 observed during early pachytene. *Chromosome research*, *17*(6), 773-82. <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9071-9>
- Oliveira, C., Foresti, F., & Hilsdorf, A. W. S. (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry*, *35*, 81-100. <https://doi.org/DOI 10.1007/s10695-008-9250-1>
- Oliveira, C., & Nirchio, M. (2006). *Citogenética de Peces*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2999.7209>
- Oliveira, C., & Wright, J. M. (1998). Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, *6*(3), 205-211. <https://doi.org/10.1023/A:1009211701829>
- Ozouf-Costaz, C., & Foresti, F. (1992). Fish cytogenetic research: advances, applications and perspectives. *Netherlands Journal of Zoology*, *42*, 277-290.
- Palaiokostas, C., Bekaert, M., Khan, M. G., Taggart, J. B., Gharbi, K., McAndrew, B. J., & Penman, D. J. (2015). A novel sex-determining QTL in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *BMC Genomics*, *16*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1383-x>
- Pandian, T. J., & Sheela, S. G. (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, *138*(1-4), 1-22. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01075-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01075-0)
- Peruzzi, L., & Eroğlu, H. E. (2013). Karyotype asymmetry: Again, how to measure and what to measure? *Comparative Cytogenetics*, *7*(1), 1-9. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v7i1.4431>
- Pinton, A., Ducos, A., Séguéla, A., Berland, H. M., Darré, R., Darré, A., & Yerle, M. (1998).

Characterization of reciprocal translocations in pigs using dual-colour chromosome painting and primed in situ DNA labelling. *Chromosome Research*, 6(5), 361-366.

- Poletto, A. B., Ferreira, I. A., Cabral-de-Mello, D. C., Nakajima, R. T., Mazzuchelli, J., Ribeiro, H. B., ... Martins, C. (2010). Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics*, 11(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-50>
- Popescu, P., & Hayes, H. (2000). *Techniques in animal cytogenetics*. Springer Science & Business Media.
- Potts, A. D., & Phelps., R. P. (1995). Use of diethylstilbestrol and ethynylestradiol to feminize Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in an outdoor environment. *Journal of Applied Ichthyology*, 11, 111-117.
- Saavedra, M. (2006). *Manejo del cultivo de tilapia*. Managua, Nicaragua.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Tercera Edición*.
- Sarasquitez, M. del C., González, M. L., & Muñoz-Cueto, A. (1999). *Patología, fisiología y biotoxicología en especies acuáticas*. (C. S. de I. Científicas, Ed.).
- Shirak, A., Palti, Y., Cnaani, A., Korol, A., & Hulata, G. (2002). Association between loci with deleterious alleles and distorted sex ratios in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*). *J Hered*, 93, 270–276.
- Shirak, A., Seroussi, E., Cnaani, A., Howe, A. E., Domokhovsky, R., Zilberman, N., ... Ron, M. (2006). Amh and Dmrta2 genes map to tilapia (*Oreochromis* spp.) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination. *Genetics*, 174(3), 1573-1581. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.059030>
- Shved, N., Berishvili, G., D'Cotta, H., Baroiller, J., Segner, H., Eppler, E., & Reinecke, M. (2007). Ethynylestradiol differentially interferes with IGF-I in liver and extrahepatic sites during development of male and female bony fish. *J Endocrinol*, 195, 513–523.
- Silva, A. (2001). *Caracterización citogenética de bocachico Prochilodus reticulatus de la cuenca del río Magdalena*. Tesis de Biólogo. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Sing, L., Purdom, I. F., & Jones, K. W. (1976). Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. *Chromosome*, 59, 43-62.
- Sumner, A. T. (1990). *Chromosome banding*. Unwin Hyman.
- Sun, Y., Jiang, D., Zeng, S., Hu, C., Ye, K., Yang, C., ... Wang, D. (2014). Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 433, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.035>

- Supiwong, W., Tanomtong, A., & Supanuam, P. (2013). Chromosomal Characteristic of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Mitotic and Meiotic Cell Division by T-Lymphocyte Cell Culture, *78*(1), 9-14. <https://doi.org/10.1508/cytologia.78.9>
- Thompson, K. W. (1979). Cytotaxonomy of 41 species of Neotropical Cichlidae. *Copeia*, *4*. <https://doi.org/10.2307/1443877>
- Torres, A. R., & Leao, A. G. (2002). Chromosomal analysis in a fish stock of Tilapia (Pisces: Perciformes: Cichlidae). *Estudos de Biologia, Curitiba*, *24*(49), 39-42.
- Usgame, D., Usgame, G., & Valverde, C. (2008). *Agenda productiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de la tilapia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.*
- Varadaraj, K., & Pandian, T. J. (1989). First report on production of supermale tilapia by integrating endocrine sex reversal with gynogenetic technique. *Curr. Sci.*, *58*, 434-441.
- Vernetti, C. M. M. V., Rodrigues, M. D. N., Gutierrez, Perez, H. J., Calabuig, Perez, C., ... Moreira, H. L. M. (2013). Genes involved in sex determination and the influence of temperature during the sexual differentiation process in fish: A review. *African Journal of Biotechnology*, *12*(17), 2129-2146. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1155>
- Wang, X., Rinehart, T. A., Wadl, P. A., Spiers, J. M., Windham, M. T., Trigiano, R. N., & Pathology, P. (2009). A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. *Journal of Biotechnology*, *8*(11), 2432-2436.
- Waters, J., & Wolff, D. J. (2000). The Principles of Clinical Cytogenetics. *Journal of medical genetics*, *37*(5), 399. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.5.399>
- Yang, Y., Zhang, Z., Lin, K., Wei, Y., Huang, E., Gao, A., ... Wei, J. (1980). Use of three line combination for production of genetic all-male tilapia mossambica. *Acta Scientica Sinica*, *7*, 241-246.
- Ziegler, C. G., Lamatsch, D. K., Steinlein, C., Engel, W., Scharl, M., & Schmid, M. (2003). The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Research*, *11*, 23-35.

