



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR Y DEL EXON I DEL GEN DE
MIOSTATINA ASOCIADO AL CRECIMIENTO MUSCULAR EN DOS
VARIETADES DE TRUCHA ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*, WALBAUM
1792) DE LA REGIÓN JUNÍN – HUANCAYO

Línea de investigación:

GENÉTICA, BIOQUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

Tesis para optar por el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Chuan Garcia, Ricardo José

Asesor:

Scotto Espinoza, Carlos Jesús

ORCID: 0000-0003-1592-0419

Jurado:

Iannacone Oliver, José Alberto

López Bulnes, Jorge Luis

Rodrigo Rojas, María Elena

Lima - Perú

2022

Referencia:

Chuan, R. (2021) Secuenciamiento y análisis del promotor y del exon I del gen de miostatina asociado al crecimiento muscular en dos variedades de trucha arcoiris (*oncorhynchus mykiss*, walbaum 1792) de la region Junin - Huancayo [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/6578>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR Y DEL EXON I
DEL GEN DE MIOSTATINA ASOCIADO AL CRECIMIENTO MUSCULAR
EN DOS VARIEDADES DE TRUCHA ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS
MYKISS*, WALBAUM 1792) DE LA REGIÓN JUNÍN – HUANCAYO**

Línea de Investigación:

GENÉTICA, BIOQUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Chuan Garcia, Ricardo José

Asesor:

Scotto Espinoza, Carlos Jesús

ORCID: 0000-0003-1592-0419

Jurados:

Iannacone Oliver, José Alberto

López Bulnes, Jorge Luis

Rodrigo Rojas, María Elena

Lima-Perú

2022

Índice

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Descripción y Formulación del Problema	5
1.2 Antecedentes.....	6
1.3 Objetivos.....	10
1.3.1 Objetivo General.....	10
1.3.2 Objetivos Específicos.....	10
1.4 Justificación.....	11
1.5 Hipótesis.....	13
1.5.1 Hipótesis nulas	13
1.5.2 Hipótesis alternativas	13
II MARCO TEÓRICO	14
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación	14
2.2 Gen de miostatina.....	14
2.3 Edición molecular del gen de Miostatina.....	14
III MÉTODO.....	16
3.1 Tipo de investigación	16
3.2 Ámbito temporal y espacial	16
3.2.1 Ámbito temporal	16
3.2.2 Ámbito espacial	16
3.3 Variables.....	17
3.3.1 Variable independiente	17
3.3.2 Variable dependiente.....	17
3.4 Población y muestra.....	17
3.4.1 Población	17
3.4.2 Muestra.....	17
3.5 Instrumentos.....	18
3.5.1 Materiales de Bioseguridad	18
3.5.2 Material Biológico.....	18
3.5.3 Materiales de laboratorio	18
3.5.4 Reactivos.....	18
3.5.5 Equipos	19
3.6 Procedimientos	19
3.6.1 Diseño de Primers	19

3.6.2	<i>Técnica de recolección de datos</i>	20
3.6.3	<i>Toma de muestra de tejido.</i>	20
3.6.4	<i>Extracción de ADN de tejido mediante gSYNC DNA Extraction Kit – GENEaid.</i> ...	20
3.6.5	<i>Determinación de la calidad y concentración de ADN</i>	21
3.6.6	<i>Amplificación mediante PCR</i>	22
3.6.7	<i>Servicio de Secuenciamiento</i>	23
3.7	<i>Análisis de datos</i>	23
3.8	Consideraciones éticas.....	24
IV	RESULTADOS	25
4.1	Extracción de ADN, Cuantificación y Calidad de ADN.....	25
4.2	<i>PCR punto final</i>	26
4.3	Análisis de Secuenciamiento Sanger.....	30
V	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
VI	CONCLUSIONES	54
VII	RECOMENDACIONES	56
VIII	REFERENCIAS	57
IX	ANEXOS	65

RESUMEN

La investigación realizada en este estudio se relaciona directamente a la producción acuícola, la cual está representada en el Perú por la trucha, los langostinos, la concha de abanico, entre otros, los cuales destacan principalmente por el aporte proteico que se encuentra en el músculo. El mejoramiento genético es una opción infalible que pretende mejorar las condiciones físicas de la especie según sea el objetivo del estudio, lo que se refiere a incrementar la masa muscular (silenciamiento de Miostatina) de la especie acuícola Trucha arcoíris y su variante albina o dorada, mediante el uso de técnicas moleculares como el silenciamiento de genes reguladores al crecimiento, sin tener que incurrir en la transgénesis, triploidización o en el uso de hormonas exógenas, para lo cual primero debemos analizar el gen responsable de inhibir a la hormona del crecimiento generada por el propio organismo (Miostatina). Para lo cual, se realizó la extracción de ADN en el Laboratorio de Mejoramiento Genético y Reproducción Animal de dos especímenes de trucha (*Oncorhynchus mykiss*), una en variedad normal y la otra en su variedad albina. El alineamiento de las secuencias obtenidas producto del secuenciamiento, evidenció que ambas variedades de trucha poseían el mismo gen que codifica la Miostatina, dando así resultados esperados en la investigación, recalcando que el gen de miostatina es un gen conservado en los vertebrados, y siendo este un gen de interés comercial puesto que la proteína regula negativamente al crecimiento muscular, su inhibición tiene gran interés comercial, así como científico dentro del sector acuícola, dando pie a programas de mejoramiento genético animal.

Palabras clave: Trucha arcoíris, miostatina, acuicultura, promotor, exón.

ABSTRACT

The research conducted in this study is related to aquaculture production, which is represented in Peru by trout, prawns, scallops, among others, which stand out for the protein content found in the muscle. Genetic improvement is an infallible option that aims to improve the physical conditions of the species depending on the objective of the study, which refers to increasing muscle mass (myostatin silencing) of the aquaculture species Rainbow trout and its albino or golden variant, through the use of molecular techniques such as the silencing of growth regulatory genes, without having to incur in transgenesis, triploidization or the use of exogenous hormones, for which we must first analyze the gene responsible for inhibiting the growth hormone generated by the body itself (Myostatin). For which, the DNA extraction was carried out in the Genetic Improvement and Animal Reproduction Laboratory of two specimens of trout (*Oncorhynchus mykiss*), one in normal variety and the other in its albino variety. The alignment of the sequences obtained as a result of the sequencing, showed that both varieties of trout had the same gene that encodes Myostatin, thus giving expected results in the investigation, emphasizing that the myostatin gene is a conserved gene in vertebrates, and this being a gene of commercial interest since the protein negatively regulates muscle growth, its inhibition has great commercial and scientific interest within the aquaculture sector, giving rise to animal genetic improvement programs.

Keywords: Rainbow trout, myostatin, aquaculture, promoter, exon.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad que se ha desarrollado en Perú durante los últimos años, siendo los peces de agua dulce, principales en los grupos de cultivo. Los cultivos acuícolas tienen una gran fuente proteica animal y valor nutricional el cual se determinará por el tipo de sistema o tecnificación de los cultivos, para lo cual se requiere la obtención de una mayor cantidad de materia prima, comercializadas dentro de las propias localidades, generando así un impulso económico favorable para la implementación de nuevas tecnologías (Mendoza, 2011).

1.1 Descripción y Formulación del Problema

En Perú, el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI, 2016) nos indica que la producción acuícola está estructurada principalmente por la trucha, langostinos y concha de abanico con el 53%, 28.7% y 12 % respectivamente, este sector va en crecimiento ya que genera empleos en sectores rurales, pero es de alto costo con relación a la compra de alimento balanceado, para lo cual se destina el 60% del presupuesto, por lo cual se plantea buscar alternativas para volver más rentable el producto y mejorar la actividad económica. En el 2019 las importaciones de trucha peruana se incrementaron en 152.5% al mercado asiático a diferencia de años anteriores, esto se da principalmente por dificultades que actualmente presenta el sector pesquero japonés, asimismo cabe resaltar que el efecto del COVID-19 ha manifestado una incidencia sobre la demanda y oferta de trucha (Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo [PROMPERÚ], 2020).

El presente estudio busca, analizar las modificaciones que se puedan encontrar al secuenciar parte de la región promotora y del exón 1 del gen de miostatina en dos truchas diferentes, la trucha dorada y la trucha arcoíris silvestre, para así dar pie a posibles estudios de mejoramiento genético.

1.2 Antecedentes

La miostatina (GDF8) pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β , muy importante para la regulación, desarrollo y funcionamiento del músculo esquelético donde se expresa exclusivamente inhibiendo el crecimiento y la diferenciación celular (Hanset et al., 1982). La deficiencia del gen de miostatina ocasiona hipertrofia muscular debido a una combinación y aumento de un mayor número de fibras en diferentes especies (humanos, vacas, ratón, ovino, y perro), sin consecuencias adversas (McPherron et al., 1997).

En esta superfamilia, se han desarrollado estrategias efectivas para bloquear la vía de señalización de Miostatina, realizando terapias para diversas enfermedades de desgaste muscular como distrofia muscular, sarcopenia, así como en pacientes con largos confinamientos en cama. En efecto, los inhibidores de Miostatina han demostrado una gran promesa para aumentar significativamente el crecimiento muscular en modelos animales (Xu et al., 2013).

Actualmente, la miostatina se caracteriza en ratones como un regulador negativo del crecimiento muscular esquelético (McPherron et al. 1997), en ganado de doble musculatura por la hipertrofia (aumento en el diámetro de fibras) y/o hiperplasia (aumento en el número de fibras) del músculo esquelético extremo (Kambadur et al., 1997). A su vez se puede observar que en una delección del gen de miostatina, el crecimiento de la masa muscular es inevitable, observándose resultados similares de incremento de la masa muscular en perros y ovinos, por ello considerando la importancia en el control del crecimiento del músculo, la miostatina presenta un locus de gran interés para el mejoramiento genético puesto que puede desarrollar la misma función biológica en animales de granja, siendo una aplicación con gran potencial en la producción de animales, para lo cual solo se requiere el secuenciamiento génico según la especie de interés (McPherron et al., 1997).

Asimismo, se podrían realizar diversas aplicaciones y así disponer de futuras herramientas biotecnológicas en diversas especies de interés comercial (Nadjar-Boger, & Funkenstein, 2011), considerando la caracterizado reciente de la secuencia y patrón de expresión de la miostatina en varias especies de peces de importancia comercial según lo menciona Maccatrozzo (citado por Radaelli et al., 2003). Puesto que existen muchas similitudes entre las secuencias nucleotídicas de vertebrados y mucho más si pertenecen a la misma familia, lo cual sugiere que la estructura y función de cada uno está muy conservada entre los vertebrados (Ansai & Kinoshita, 2014).

Científicamente se ha reportado el aislamiento y caracterización molecular de la secuencia de ADN de miostatina a partir del músculo esquelético en peces de importancia comercial como: Tilapia (*Oreochromis mossambicus*), Basa (*Morone chrysops*) (Rodgers et al., 2001), Paco (*Piaractus mesopotamicus*) (Gutierrez de Paula et al., 2014), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Østbye et al. 2001), Trucha (*Onchorynchus mykiss*) (Rescan, Jutel & Rallièrre, 2001), Carpa común (*Cyprinus carpio* L.) (Sun et al., 2012) Bagre de Canal (*Ictalurus punctatus*) (Khalil et al. 2017), de igual manera en especies marinas de importancia comercial como Lenguado (*Paralichthys adspersus*) (Delgado et al., 2008) e incluso en peces modelo de laboratorio como: Medaka (*Oryzias latipes*) (Sawatari et al., 2010) y pez Cebra (*Danio rerio*) (Xu et al., 2007; Acosta et al., 2005).

La ictiofauna peruana es muy diversa ya que cuenta con diversas especies nativas reconocidas estimada en 1300 especies y 1064 registradas, distribuida de manera totalmente diferenciada: 1) Drenaje al Océano Pacífico mediante los ríos de la zona costera. 2) La cuenca endorreica del Lago Titicaca y 3) El sistema amazónico peruano, con subcuencas importantes: Ucayali, Marañón, Madre de Dios y entre otros, reportándose aproximadamente el 4% de especies en ríos que drenan al Pacífico a lo largo de la Costa peruana (Ortega, 2012).

Treviño (como se citó en Ortega, 2012) menciona que la diversidad de los ríos de la Sierra está estrechamente relacionada con la altitud y la temperatura, además de la pendiente y velocidad de la corriente, por lo cual los peces han desarrollado especiales adaptaciones ya que también se puede observar el endemismo en las diversas cuencas hidrográficas, considerándose que sobre los 1000 m.s.n.m ya se han registrado aproximadamente 80 especies, siendo en su mayoría de los géneros *Orestias*, *Astroblepus* y *Trichomycterus*, añadiéndose pocas especies de pequeños carácidos de los géneros *Ceratobranchia*, *Acrobrycon*, *Bryconamericus*, *Hemibrycon* y *Creagrutus*. Cabe resaltar que en el lago Titicaca (4000 m.s.n.m.) es el ecosistema alto andino más diverso para peces de agua dulce, principalmente del género *Orestias* (más de 30 especies), algunas especies de este género, especialmente las más grandes y con mayor importancia comercial, están seriamente amenazadas y probablemente en peligro de extinción. Por otro lado, la Amazonia Peruana presenta más de 800 especies registradas incluyendo a los órdenes Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes y Perciformes, además de ello existe en este momento reportes de loricáridos para los géneros *Ancistrus* y *Chaetostoma*, en las vertientes orientales de la Selva Alta (1000 m.s.n.m.).

En Perú se promulgó la Ley de Promoción y Desarrollo de la Acuicultura (Ley N° 27460), en el Decreto 001-2010 [Ministerio de Producción]. Por lo cual se aprobó el Plan Nacional de Desarrollo Acuícola hasta el año 2021 para el desarrollo sostenible de la acuicultura en el Perú, donde define como acuicultura a las actividades tecnológicas direccionadas al cultivo de especies acuáticas en ambientes acuáticos naturales o artificiales de manera controlada, incluyendo actividades de siembra y repoblamiento o resiembra, además del procesamiento primario de los productos provenientes de dicha actividad para efectos de la Ley (Ministerio de Producción [PRODUCE], 2015).

Oncorhynchus mykiss, perteneciente al orden Salmoniformes de la familia Salmonidae del género *Oncorhynchus*, conocida comúnmente como trucha arcoíris, se caracteriza por ser

de cuerpo alargado, y ágil de coloración azul a verde oliva sobre una banda rosada a lo largo de la línea lateral y plateada por debajo de ella, aunque esta pigmentación puede variar según el hábitat, tamaño, edad y condición sexual color plateado y con motas de distintos colores. Vive en ríos y lagos de aguas frías y limpias. Se alimenta de preferencia de peces pequeños, crustáceos y larvas de insectos, es nativa desde Alaska hasta México, fue introducida por primera vez en 1874 en los diferentes continentes excepto Antártida con fines recreativos y el desarrollo de la acuicultura, ya que es de crecimiento rápido y además de ser tolerante a diferentes ambientes ($T^{\circ} 0$ a $27^{\circ}C$), cabe resaltar que pueden ser iniciados en la alimentación con una dieta artificial como es el caso de los alevines grandes. Posee un ciclo de vida anádromo (vivir en océanos, desovar en ríos sobre todo muy oxigenado con temperaturas de $9-14^{\circ}C$), pueden alcanzar de 7 a 10 kg en un periodo de 3 años, a diferencia de las de agua dulce que llegan a 4.5 kg en el mismo tiempo, en su reproducción las hembras pueden producir hasta 2 000 huevos/kg de peso corporal, desovando solo una vez en primavera, aunque en algunos casos de crianza selectiva pueden madurar más temprano y desovar anualmente, además en la manipulación genética de los cromosomas sexuales en embrión esta produce hembras triploide estériles evitando rasgos como la mandíbula ganchuda que no es muy agradable lo cual garantiza que al ser introducidos no se reproduzcan. La acuicultura de esta especie se ha desarrollado por muchos tiempos y eficientemente empleando un manejo adecuado y definido avalando eficientemente la producción y comercialización. Sin embargo, el aumento de la producción debe ser constantemente estudiada para evolucionar en la industria (FAO, 2022). En Perú se ha alcanzado 93.4 TM , especialmente por la producción de las zonas altoandina donde su producción y comercialización se da de manera empírica, considerando que en Apurímac se cuenta con 12 500 recursos hídricos especialmente en la producción de truchas, permitiendo una producción de 104 TM, cabe resaltar que no siempre el éxito es de garantía a pesar de tener las condiciones ambientales favorables para el cultivo de la trucha, sino que

también la oferta y demanda hacia el producto que se ven relacionadas directamente con las políticas públicas que fomentan esta actividad (PRODUCE, 2015).

El Ministerio de la Producción (como se citó en Rainuzzo, 2020) menciona que el departamento de Puno lideró como primer productor de trucha arco iris a nivel nacional durante el periodo del 2009- 2018, con un total de 284,019 t, seguido de Junín (21,855 t) y Huancavelica (20,563 t), representando el 92.7% del volumen nacional considerando un crecimiento anualmente.

Por ende, con todo lo mencionado anteriormente se puede determinar que la actividad dirigida a la obtención de conocimientos es de suma importancia para poder determinar el desarrollo sustentable de la acuicultura, sobre todo para determinar la biología y ecología de nuevas especies para el cultivo, lo cual contribuye al desarrollo de la biotecnología en esta actividad, según sea el enfoque del estudio (nutrición, patología y genética), además del reforzamiento y perfeccionamiento de técnicas de cultivo existentes para poder implementar nuevas herramientas y tecnología para el desarrollo de la acuicultura en el país.

1.3 Objetivos

1.3.1 *Objetivo General.*

- Identificar, secuenciar y analizar molecularmente el promotor y el exón 1 del gen de la Miostatina de dos variedades de la trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) de la región Junín – Huancayo.

1.3.2 *Objetivos Específicos.*

- Identificar y secuenciar una parte del promotor del gen de miostatina en la trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) y su variedad albina o dorada.

- Identificar y secuenciar una parte del exón 1 del gen de miostatina en la trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) y su variedad albina o dorada.
- Analizar la variabilidad de las secuencias amplificadas del promotor y del exón 1 del gen de miostatina en la trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) y su variedad albina o dorada.
- Determinar la capacidad de amplificación de los primers diseñados para el promotor y el exón 1 del gen de Miostatina en la trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) y su variedad albina o dorada.

1.4 Justificación

La acuicultura dulceacuícola en el Perú es una actividad que contribuye con la mitigación de la pobreza y la seguridad alimentaria. Sin embargo, las comunidades que desarrollan acuicultura dulceacuícola se enfrentan con una serie de problemas graves como: agotamiento de los recursos hidrobiológicos por sobreexplotación, carencia de programas de mejora genética, contaminación producto de la degradación ambiental por la alteración de los hábitats acuáticos producto de las actividades antrópicas como la deforestación y explotación minera ilegal a lo largo de las áreas amazónicas y altoandinas, introducción de especies exóticas que afectan a la ictiofauna endémica, construcción de centrales hidroeléctricas que afectan el ciclo reproductivo por la migración de los peces, la baja productividad de las especies utilizadas, la falta de identificación y conocimiento de genes asociados a características productivas entre otros problemas, cabe resaltar que la acuicultura intensiva se centra en especies que tienen una mayor ganancia de peso entre ellas tenemos a la Trucha y la Tilapia (80% y 10% respectivamente). El resto de la demanda es obtenida por la pesca masiva

extractiva sin control de otras especies ictícolas afectando su tasa poblacional al no estar integradas como candidatas dentro de una actividad productiva (PRODUCE, 2015).

El gen de la miostatina es un regulador negativo de la masa muscular esquelética en cualquier especie animal. Asimismo, la inactivación por mutaciones naturales o inducidas del gen de la miostatina induce un fenotipo hipermuscular por la proliferación de células musculares en los animales vertebrados que incluye a los peces, duplicando la musculatura por lo cual hay una ganancia de peso, siendo esto un beneficio ya que su valor comercial aumenta lo cual permite lograr animales con mayor carcasa y peso individual (McPherron et al., 1997).

En el presente estudio se realizará el secuenciamiento del gen de miostatina en *Oncorhynchus mykiss* (Trucha de río) principal especie cultivada de la ictiofauna peruana, esto permitirá obtener un banco génico o genoteca donde se analizará y determinará las variaciones nucleotídicas que se dan por mutaciones funcionales y así evaluar su efecto en esta especie. Igualmente, se desarrollará *in silico* el análisis genético comparativo entre las diferentes especies colectadas implementando genotecas de miostatina determinantes para la investigación preliminar dentro de un potencial programa de mejora genética con la aplicación de la posible aplicación de la técnica de edición de genes *Crispr Cas9*, permitiendo así el silenciamiento de la miostatina en especies de peces candidatos nativos e introducidos continentales en el Perú (Varszhney et al., 2015), siendo útil como herramienta de mejora genética y/o biotecnológica, puesto que permitiría elevar la producción y/o productividad (peso) en poco tiempo de los peces ya cultivados en piscigranjas, garantizando el creciente consumo por la demanda cárnica ictícola en las diferentes regiones del país. De esta manera, permitirá una mejor toma de decisiones con el uso de técnicas biotecnológicas promisorias enmarcado dentro de la política acuícola peruana trazada como meta al año 2030.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis nulas

- No se podrá secuenciar el promotor y el exón 1 del gen de la Miostatina en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).
- El secuenciamiento nucleotídico del promotor y del exón 1 del gen de Miostatina en los individuos analizados de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de la región Junín - Huancayo no presentan polimorfismo genético molecular.

1.5.2 Hipótesis alternativas

- Se podrá secuenciar el promotor y el exón 1 del gen de la Miostatina en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).
- El secuenciamiento nucleotídico del promotor y del exón 1 del gen de Miostatina en los individuos analizados de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de la región Junín – Huancayo, al menos uno presenta polimorfismo genético molecular.

II MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

La Miostatina es una proteína que juega un papel esencial en la regulación, desarrollo y funcionamiento del músculo esquelético donde se expresa exclusivamente inhibiendo el crecimiento y la diferenciación, siendo el principal factor que reduce el número de mioblastos en las divisiones de diferenciación terminal así como en el grado de alargamiento de las fibras (Xu et al., 2003), en ratones se expresa durante la embriogénesis de las células del miotomo de las somitas y continúa funcionando en ratones adultos, ello demuestra que esta proteína participa en la regulación homeostática posnatal suprimiendo el crecimiento muscular (Rodgers et al., 2001).

2.2 Gen de miostatina

McPherron en 1997 identificó el gen de la Miostatina en mutaciones en ganado vacuno, como un evento biológico conocido como doble musculatura o hipertrofia muscular (Luc et al. 1997), esta mejora en el ganado se originó debido al incremento en el número de células (Hiperplasia), como también en el tamaño de estas (Hipertrofia), dando como resultado miofibras más grandes y pesadas (Rodgers et al., 2007).

2.3 Edición molecular del gen de Miostatina

El método clásico utilizado hace una década, para la modificación genética era la recombinación homóloga ampliamente utilizado en embriones, siendo las células madre de línea germinal las que generaban animales knockout o knockin (Thomas, & Capecchi, 1987) siendo la desventaja en la mayoría de los casos el tiempo para generar un animal modificado genéticamente.

Otro enfoque alternativo, era utilizar oligonucleótidos antisentido y ARN de interferencia, sin embargo, estos planteamientos reducen sólo transitoriamente la expresión génica, y el efecto suele ser incompleto ya que puede afectar a otros genes de manera involuntaria. Actualmente, la edición de genes o edición del genoma, ha permitido que los investigadores tengan una mejor precisión e introducir de manera eficiente una variedad de alteraciones genéticas en células de animales (Bono et al., 2015), el sistema CRISPR-Cas9 derivada de la bacteria *Streptococcus pyogenes* se ha convertido en una revolucionaria herramienta para la edición específica del genoma (Edición de genes) y poder así controlar de la expresión génica (Haselkorn et al., 2018), a la fecha se observan estudios de peces modificados genéticamente con esta nueva herramienta, ya es el caso de, *Ictalurus punctatus*, pez gato (Elaswad, et al. 2018; Khalil, et al. 2007), *Salmo salar*, salmón del atlántico (Edvardsen, et al. 2014), *Lutjanus guttatus*, pargo flamenco (Torres, 2018) entre otros.

III MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

Esta investigación según su propósito es de tipo aplicada tecnológica puesto que se pretende utilizar técnicas moleculares de vanguardia, además de ello por la profundidad del objeto de estudio se puede decir que es una investigación exploratoria ya que se requiere investigar información específica en la variedad albina de la especie en estudio, por los datos investigados podemos mencionar que es una investigación de tipo cualitativa ya que se buscará información principalmente sobre el gen de Miostatina presente en la especie estudiada y su variedad albina. De esta manera, por la manipulación de variables también se podría decir que es una investigación experimental ya que se pretende analizar la secuencia nucleotídica del promotor y exón 1 del gen de Miostatina en la especie acuícola de agua dulce de mayor comercialización en el país la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su variedad albina. Por último, según su inferencia esta investigación es hipotética – deductiva ya que según los resultados obtenidos se podrá corroborar la hipótesis mediante la observación y experimentación desarrollada.

3.2 Ámbito temporal y espacial

3.2.1 *Ámbito temporal*

Se evaluó el secuenciamiento del gen de Miostatina en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el periodo desde el mes de junio del 2021 hasta el mes de junio del 2022.

3.2.2 *Ámbito espacial*

Se evaluó el secuenciamiento del gen de Miostatina en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su variedad albina obtenido en el laboratorio de Mejora Genética y Reproducción

Animal de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la UNFV.

3.3 Variables

3.3.1 Variable independiente

Variabilidad genética de la secuencia nucleotídica del promotor y del exón 1 del gen de Miostatina en la población de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y de la variedad albina procedentes de la zona de Junín – Huancayo.

3.3.2 Variable dependiente

Secuencias nucleotídicas del promotor y exón 1 del gen de Miostatina de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y de la variedad albina procedentes de la zona de Junín-Huancayo.

3.4 Población y muestra

3.4.1 Población

Se trabajó con cuatro muestras de tejido de las aletas caudales de especímenes en estadio adulto de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su variedad albina criadas en la piscigranja Acuatroun SAC de la región de Junín.

3.4.2 Muestra

Dos especímenes en estadio adulto de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y dos especímenes en estadio adulto trucha arcoíris de la variedad albina.

3.5 Instrumentos

3.5.1 *Materiales de Bioseguridad*

- Guardapolvo.
- Guantes quirúrgicos talla L - R&G.
- Mascarilla quirúrgica 3 pliegues - R&G.
- Cofia - R&G.

3.5.2 *Material Biológico*

✓ Especímenes adultos de trucha Arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) y su variedad albina.

3.5.3 *Materiales de laboratorio*

- ✓ Bisturí estéril N° 23 Surgical Blades.
- ✓ Tubo de fondo cónico de 50 ml.
- ✓ Tubo eppendorf de 2.0, 1.5, 0.2 ml

3.5.4 *Reactivos*

- ✓ Agua grado molecular BioRad de 500ml.
- ✓ Kid gSYNC DNA – extraction KIT- GENEaid.
- ✓ Etanol absoluto alisado Merck.
- ✓ Agarosa -Clever Scientific CSL- AG 500.
- ✓ Buffer carga – Blue Juice Gel Loading (10x).
- ✓ Red Safe TM Nucleic Acid Staining.
- ✓ Marcador Generuler DNA Ladder (100pb).
- ✓ Marcador Lambda HIND III – Thermo Scientific™
- ✓ Agente intercalante ECO-READY to use (2 000x)

- ✓ 2Xpcr (i-STARMAX GH) – Master Mix – Intron

3.5.5 Equipos

- ✓ Vortex Mixer - WIZARD. Velp Scientific
- ✓ Centrifuga - Eppendorf
- ✓ Incubadora
- ✓ Cámara Electroforética horizontal
- ✓ Espectrofotómetro - Implen®
- ✓ Termociclador punto final (Marca SimpliAmp. Life technologies)
- ✓ Cabina de Flujo Laminar

3.6 Procedimientos

3.6.1 Diseño de Primers

1. El diseño de Primers se realizó con base a la secuencia del gen de Miostatina 1a, de *Oncorhynchus mykiss*, descargado de la plataforma virtual Gen Bank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con codificación DQ136028, en el software virtual primer3 plus (<https://www.primer3plus.com>).

2. Los primers propios obtenidos bajo las condiciones y tamaño deseados, se encuentran descritos en la tabla1, teniendo así primers con una temperatura de anillamiento no muy diferente entre los pares de primers.

Tabla 1*Diseño de primers propios*

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Long. pb	TM	%GC
Miost-Prom-1F (1A)	AAGGCAGCGATAGCATTGGT	20	63,1	50
Miost-Prom-1R (1A)	AACCTCTGCGGTTTAAGCGA	20	62,8	50
Miost-Prom-2F (1B)	TGTGCTTTCGCTTAAACCGC	20	62,6	50
Miost-Prom-2R (1B)	TTGGGGTGTCTGATTGCGA	20	62,9	50
Miost-Prom-5F (3C)	TTCGCAAATCAGACACCCCA	20	62,9	50
Miost-Prom-5R (3C)	ATTTCCCCCTTGAGGCACC	20	63,4	55
Miost-Exon1-F	GCAACTCTGTAGTCCGCCTT	20	62,9	55
Miost-Exon1-R	AGGCACACATACGCAATCCA	20	63	50

3.6.2 Técnica de recolección de datos

Se obtuvieron especímenes en estadio adulto de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su variedad albina (dorada) cultivadas en la piscigranja Acuatroun SAC de la región Junín.

3.6.3 Toma de muestra de tejido.

La muestra de tejido será separada del pez con ayuda de una hoja de bisturí estéril y se colocará en un tubo de 2ml con agua libre de nucleasas.

3.6.4 Extracción de ADN de tejido mediante gSYNC DNA Extraction Kit – GENEaid.

1. Se colocó 100 ul de la muestra previamente homogenizada en un tubo de 1,5 ml con 200 ul de buffer GT y 20 ul Proteínasa K. Se continuo con una agitación en el vortex para luego colocar los tubos a incubación a 60 °C durante 40 minutos a agitación continua de 80 RPM.

2. Terminada la incubación se procedió a adicionar 200ul de buffer GTB y se incubó por 20 minutos a 60° con una agitación continua de 80 rpm, una vez finalizada la

incubación se adicionó 5 ul de Solución Rnase A (10mg/ml) y se agitó vigorosamente por 10 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

3. Al finalizar la incubación, se añadió 200 ul de etanol absoluto alisado y agitó por 10 segundos. Luego esta mezcla fue colocada en la columna GS evitando agregar precipitados. A continuación, se centrifugó 1 minutos a 14 000 RPM y se descartó el tubo colector.

4. Se colocó un nuevo tubo colector y se agregará 400 ul de buffer W1 para luego proceder a centrifugar 30 segundos a 14 000 RPM. Para luego reemplazar el tubo colector por uno nuevo, agregándose 600 ul de buffer de lavado para centrifugar nuevamente en las mismas condiciones. Adicionalmente se volvió a reemplazar nuevamente el tubo colector y centrifugó durante 3 minutos a 14000 RPM para secar la columna GS.

5. Finalmente, la columna fue colocada en el tubo definitivo de 1,5 ml y el ADN fue diluido con 60 ul de buffer de elución precalentado a 60 °C, para lo cual se centrifugó durante 30 segundos a 14000 rpm.

3.6.5 Determinación de la calidad y concentración de ADN

Una vez obtenida el ADN, se evaluó la calidad de manera cualitativa a través de un gel de agarosa de la marca Cleaver Scientific CSL-AG500 (1%) para ello se tomó 1 ul del ADN y se adicionó 2 ul de buffer carga (Blue Juice Gel Loading 3X). Se utilizó 10ul de RedSafe™ Nucleid Acid Staining como agente de tinción. Se tomó como referencia el marcador ThermoScientific™ Lambda DNA/HindIII Marker. Las muestras fueron llevadas a electroforesis a 90 voltios por 60 minutos, posteriormente se reveló el gel a través de un fotodocumentador, permitiendo así que la imagen digitalizada prevalega la integridad del ADN.

La concentración de ADN en ng/ μ L, fue realizada a través de un espectrofotómetro (Implen®) donde se determinó la concentración y la integridad del ADN a través de las relaciones A260/280 (calidad de ADN puro), A260/230 (grado de contaminación).

De la data obtenida de la cuantificación por espectrofotometría, se realizó una dilución final a 10 ng/ μ L, la cual fue corroborada por un nuevo cálculo espectrofotométrico (Marca Implen®).

3.6.6 Amplificación mediante PCR

Para la amplificación del gen de Miostatina mediante la PCR (Reacción de Cadena de la Polimerasa) se utilizó los primers o cebadores, diseñados con el software Primer 3 (Untergasser et al. 2012) (ver Tabla 1). Además de ello se describió los reactivos usados en el Marter Mix para la amplificación del gen de Miostatina (Tabla 2) así como las condiciones de ciclado para las muestras en evaluación (ver Tabla 3).

Tabla 2

*Primers utilizados para cada PCR en 2 muestras de *Oncorhynchus mykiss*.*

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Temperatura de Hibridación
Miost-Prom-1	AAGGCAGCGATAGCATTGGT	AACCTCTGCGGTTTAAGCGA	66.1
Miost-Prom-2	TGTGCTTTCGCTTAAACCGC	TTGGGGTGTCTGATTTGCGA	65.8
Miost-Prom-5	TTCGCAAATCAGACACCCCA	ATTTTCCCCCTTGAGGCACC	66.1
Miost-Exon-1	GCAACTCTGTAGTCCGCCTT	AGGCACACATACGCAATCCA	66.1

Tabla 3

*Preparación del máster mix para la Amplificación del gen de Miostatina en *Oncorhynchus mykiss*.*

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen x Muestra
2x PCR (i-STARMAX GH) Master Mix – iNTRON	2X	1X	5 µl
Agua PCR	-	-	2 µl
Primer F	10µM	0.5µM	1 µl
Primer R	10µM	0.5µM	1 µl
AND			1 µl
Volumen Final			10 µl

Evaluación del amplicón

Una vez obtenido el producto de PCR, este fue evaluado en un gel de agarosa Cleaver Scientific CSL-AG 500 (2%) usando 2 ul del amplificado más 2 ul de buffer carga (Blue Juice Gel Loading 3X), para lo cual se utilizó 10ul del Agente intercalante Eco-Ready to use (20000x), por lo cual se tomó como referencia el marcador Generuler DNA Ladder de 100 pb.

3.6.7 Servicio de Secuenciamiento

Las muestras purificadas junto con una solución de los primers fueron enviadas al extranjero mediante una empresa nacional que brinda dicho servicio. Los resultados del Secuenciamiento fueron enviados por vía correo electrónico por la empresa Macrogen para su posterior análisis in sílico.

3.7 Análisis de datos

Mediante el software de CLC Genomics Workbench (versión 3.6.5) (https://en.freedownloadmanager.org/userschoice/Clc_Genomics_Workbench_V3.6.5_Win.h

tm), se alineó, editó y determinó la diversidad nucleotídica de las secuencias de Miostatina en las especies en estudio.

3.8 Consideraciones éticas

El manejo de los especímenes y los procedimientos aplicados en los mismos dentro del laboratorio se realizó teniendo en cuenta los siguientes principios básicos: evitar el sufrimiento innecesario de los animales, evitar riesgos del manipulador y fomentar la aplicación de la regla de las 3R (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) (OIE, 2011). Dichas consideraciones han sido aprobadas para la experimentación con animales, de tal forma que se ocasione el mínimo dolor durante la experimentación en los peces. Por lo tanto, los especímenes adultos de trucha arcoíris adquiridos fueron sacrificados en condiciones no violentas, ya que estuvieron inducidos mediante la regulación de temperatura a un estado inconsciente para su posterior procedimiento según indicaba la metodología descrita anteriormente.

IV RESULTADOS

4.1 Extracción de ADN, Cuantificación y Calidad de ADN

Se realizó la extracción de ADN en el laboratorio de Mejoramiento Genético y Reproducción Animal, de dos especímenes de trucha, una en variedad normal y otra albina, siendo estas las únicas diferentes encontradas en la localidad de Huancayo. Los valores de cuantificación se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4

PCR convencional- Condiciones del ciclado.

Paso	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Denaturación Inicial	2 min.	95°C	5 μ l
Denaturación	10 seg.	95°C	2 μ l
Alineamiento	30 seg.	*	1 μ l
Extensión	30 seg.	72°C	1 μ l
Extensión final	45 seg	72°C	1 μ l
Conservación	∞	4°C	10 μ l

* = La temperatura de alineamiento depende del Tm del set de primers usados para la PCR.

Tabla 5

Valores de Concentración de ADN obtenidos por espectrofotometría y fluorometría.

N°	NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA	
			ADN [ng/ μ L]	A260/A280
1	Trucha silvestre	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	38.518	1.709
2	Trucha dorada (albina)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	33.088	1.723

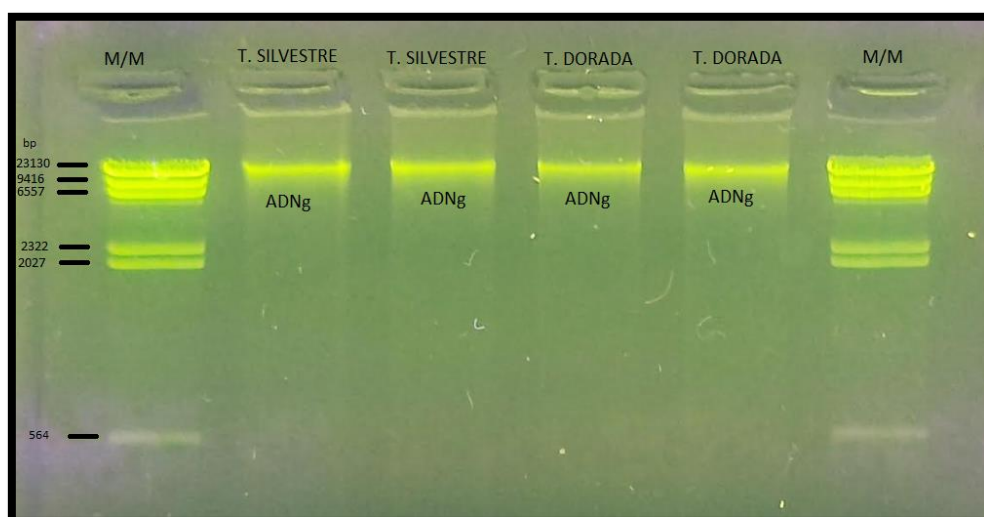
La data de cuantificación de ADN luego de la extracción con el *gSYNC DNA Extraction Kit – GENEaid*, muestran un valor de 38.518 ng/ μ L y 33.088 ng/ μ L, para trucha común y

trucha albina, respectivamente. El parámetro de absorbancia A260/A280, indica el valor de pureza de ADN, siendo su rango de calidad, valores entre 1.8 – 2.0; en nuestro procesamiento se obtuvo 1.709 y 1.723, para trucha común y trucha albina, respectivamente.

El análisis cualitativo de la calidad de ADN se realizó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando un marcador *Thermo Scientific™ Lambda DNA/HindIII Marker* que detecta fragmentos de 564 bp a 23,130 bp, para evidenciar la presencia de ADN genómico de alto peso molecular, como se observa en la figura 1.

Figura 1

Gel de electroforesis al 1% por encima de 23130 bp



Nota. Se visualiza bandas por encima de los 23130 bp que corresponde a ADN genómico (ADNg) de alto peso molecular. (M/M=Marcador Molecular).

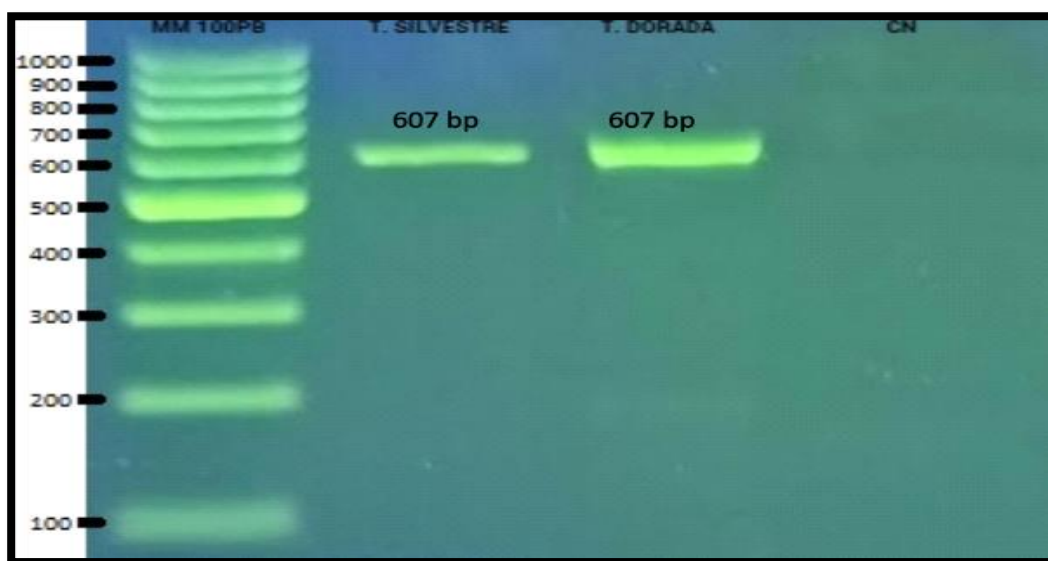
4.2 PCR punto final

Posteriormente, se realizó la amplificación del gen de la Miostatina, a través de una PCR convencional utilizándose el set de primers descritos en la tabla 1 y las condiciones de la tabla 3.

A continuación, se observa la amplificación de un fragmento de 607 bp para Trucha silvestre (común) y Trucha dorada (albina), utilizando el set de primers MIOST-Prom-1F y MIOST-Prom-1R para el promotor del gen de la Miostatina, según la figura 2.

Figura 2

Gel de electroforesis al 2% para amplicón de 607 bp.

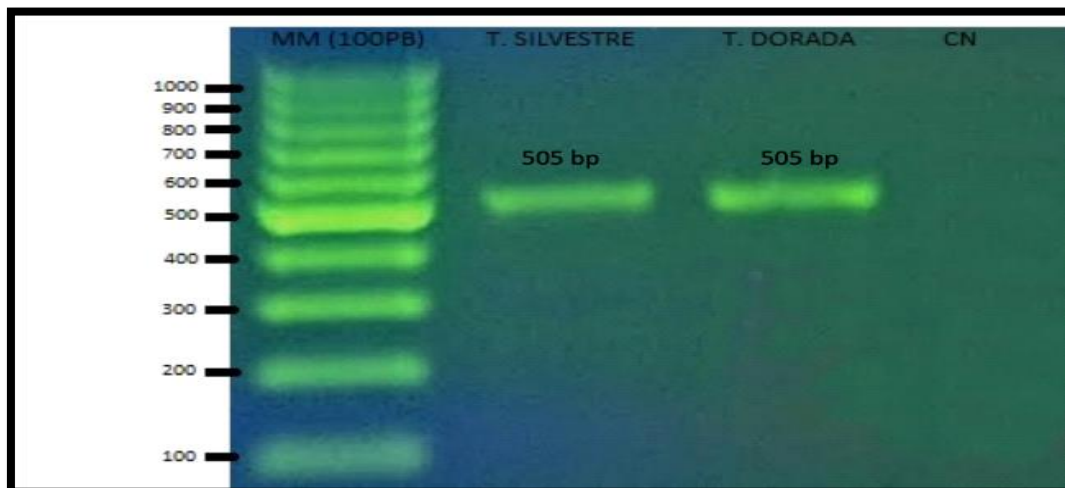


Nota. Se visualiza un amplicón de 607 bp, que corresponde al fragmento 1 del promotor de la Miostatina, Carril 1= Trucha Silvestre (común), Carril 2= Trucha Dorada (albina), CN= Control Negativo y M/M=Marcador Molecular de 100 bp.

Se realizó una PCR para la amplificación de un fragmento de 505 bp en la Trucha silvestre (común) y Trucha dorada (albina), utilizando el set de primers MIOST-Prom-2F y MIOST-Prom-2R para el promotor del gen de la Miostatina, según la figura 3.

Figura 3

Gel de electroforesis al 2% para amplicón de 505 bp.

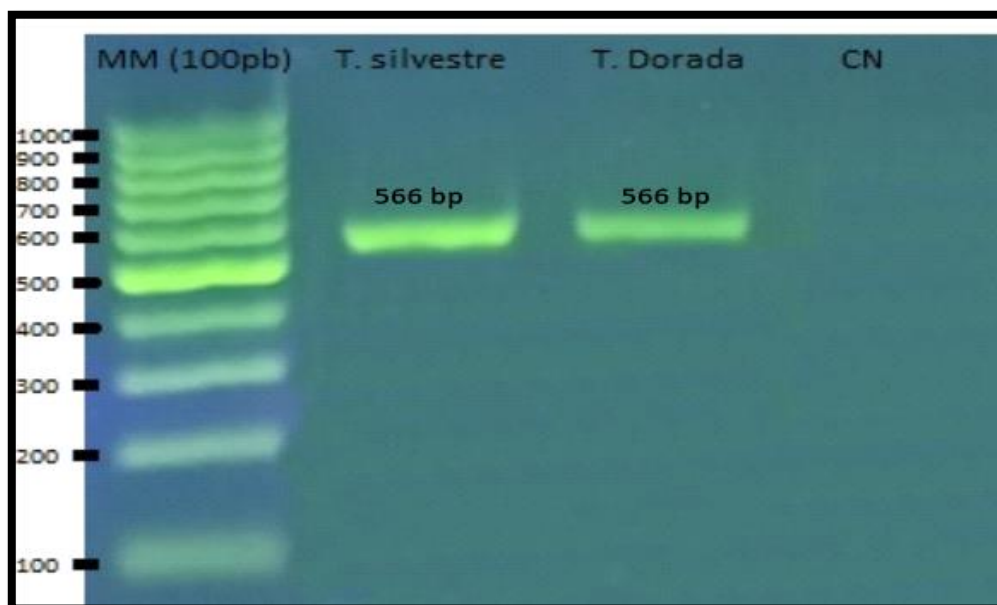


Nota. Se visualiza un amplicón de 505 bp, que corresponde al fragmento 2 del promotor de la Miostatina, Carril 1= Trucha Silvestre (común), Carril 2= Trucha Dorada (albina), CN= Control Negativo y M/M=Marcador Molecular de 100 bp.

Posteriormente, se realizó una PCR para la amplificación de un fragmento de 566 bp en la Trucha silvestre (común) y Trucha dorada (albina), utilizando el set de primers MIOST-Prom-5F y MIOST-Prom-5R, para el promotor del gen de la Miostatina, según la figura 4.

Figura 4

Gel de electroforesis al 2% para amplicón de 566 bp

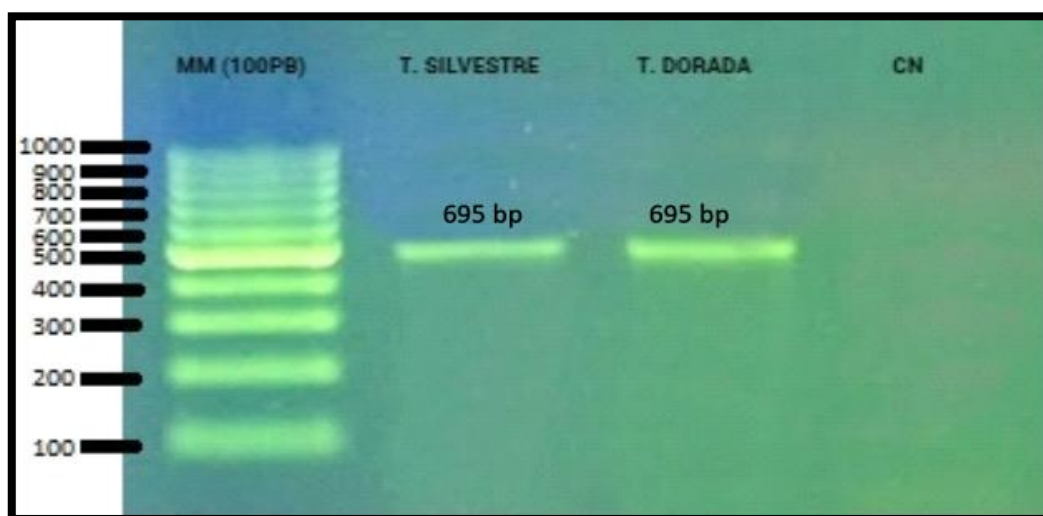


Nota. Se visualiza un amplicón de 566 bp, que corresponde al fragmento 5 del promotor de la Miostatina, Carril 1= Trucha Silvestre (común), Carril 2= Trucha Dorada (albina), CN= Control Negativo y M/M=Marcador Molecular de 100 bp.

Finalmente, se realizó una amplificación por PCR de un fragmento de 695 bp en la Trucha silvestre (común) y Trucha dorada (albina), utilizando el set de primers MIOST-EXON-1F y MIOST- EXON -1R, que corresponde al Exón 1 del gen de la Miostatina, según la figura 5.

Figura 5

Gel de electroforesis al 2% para amplicón de 695 bp



Nota. Se visualiza un amplicón de 695 bp, que corresponde al exón 1 del gen de la Miostatina, Carril 1= Trucha Silvestre (común), Carril 2= Trucha Dorada (albina), CN= Control Negativo y M/M=Marcador Molecular de 100 bp.

4.3 Análisis de Secuenciamiento Sanger

Por otro lado, se procedió a obtener la secuencia de referencia para realizar el ensamblaje de los fragmentos y analizarlos posterior al secuenciamiento. Para ello se utilizó la herramienta *Primer Blast* del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se analizó cada set de primers descrito en la Tabla 1, y se utilizó una base de datos *nr* (no redundantes) para la comparación de las secuencias, se observa que los primers tienen dos lugares de anclaje en el mismo gen, además, obteniéndose como resultado final las secuencias de referencia mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5

Secuencias de referencia para cada set de primers usando la herramienta

Primer BLAST.

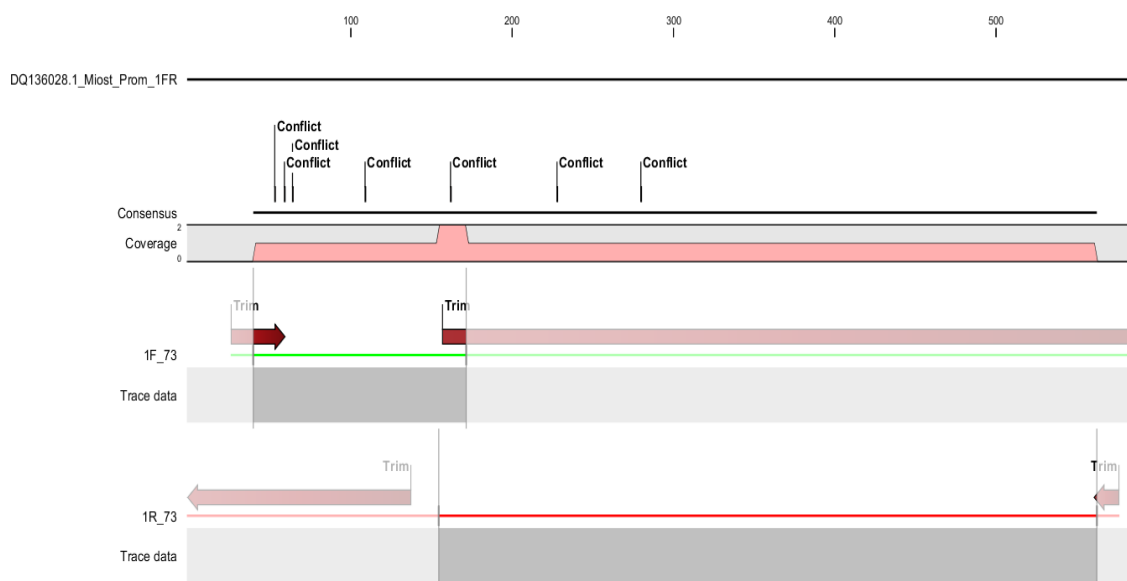
PRIMER	Secuencia	pb	Secuencia de Referencia	Nombre de la Secuencia	Start	End
Miost-Prom-1F (1A)	AAGGCAGCGAT AGCATTGGT	20	DQ136028.1	<i>Oncorhynchus mykiss myostatin 1a gene, promoter region and complete cds</i>	152	758
Miost-Prom-1R (1A)	AACCTCTGCGG TTAAGCGA	20				
Miost-Prom-2F (2B)	TGTGCTTTCGC TTAAACCGC	20	DQ136028.1	<i>Oncorhynchus mykiss myostatin 1a gene, promoter region and complete cds</i>	732	1236
Miost-Prom-2R (2B)	TTGGGGTGTCT GATTTGCGA	20				
Miost-Prom-5F (3c)	TTCGCAAATCA GACACCCCA	20	DQ136028.1	<i>Oncorhynchus mykiss myostatin 1a gene, promoter region and complete cds</i>	1151	1781
Miost-Prom-5R (3c)	ATTTTCCCCCT TGAGGCACC	20				
Miost-Exon1-F	GCAACTCTGTA GTCCGCCTT	20	DQ136028.1	<i>Oncorhynchus mykiss myostatin 1a gene, promoter region and complete cds</i>	2201	2896
Miost-Exon1-R	AGGCACACATA CGCAATCCA	20				

Luego se realizó el ensamblaje mediante el uso de las lecturas Forward y Reverse y sus secuencias de referencia obtenidas. Para ellos se usó el programa CLC Genomics Workbench v3.6.5(https://en.freedownloadmanager.org/userschoice/Clc_Genomics_Workbench_V3.6.5_Win.html). Este programa es un paquete completo para el análisis y la visualización de datos y es compatible con todos los flujos de trabajo típicos de la NGS y Sanger. Además, incluye todas las herramientas de análisis de secuencias de CLC Main Workbench.

En primer lugar, realizamos el Trimado (Trim) de las lecturas o recorte de calidad de las bases, anotando las regiones de baja calidad. Luego se realiza el ensamblaje de las secuencias obtenidas, en el ensamblado se observa anotaciones marcadas como conflictos (“Conflict”). Las cuales denotan cambios de una base nitrogenada entre las lecturas y la secuencia de referencia (Figura 6).

Figura 6

Alineamiento de Secuencias. 1F y 1R-Trucha normal 1ª (PRIMER PROM 1A).



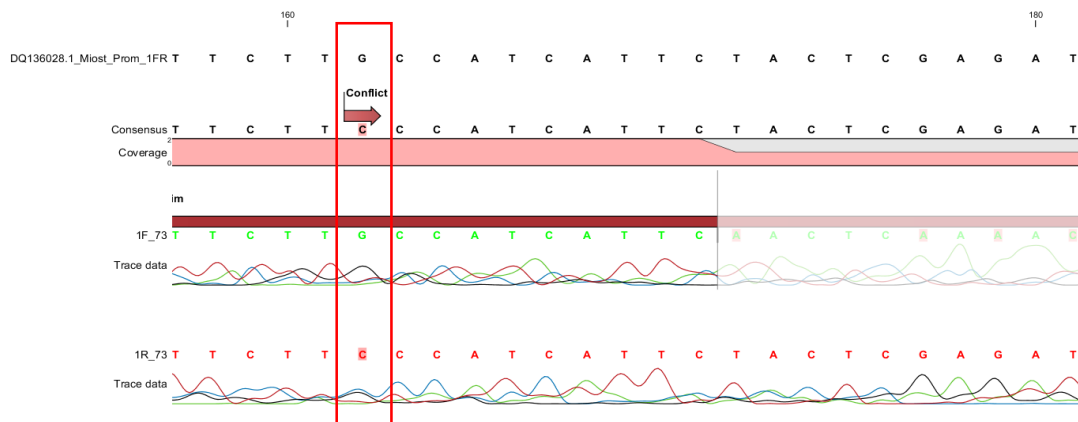
Nota. Recorte de secuencias (Trimado), objetivo de mejorar la calidad de la secuencia obtenida dentro de los parámetros que pide el programa CLC Genomics Workbench, además se observan cambios de una base nitrogenada denotado como Conflict.

El siguiente paso es corregir dichos conflictos para identificar la base precisa en la secuencia Consenso (Consensus) y así poder mejorar el análisis del ensamblado con la referencia, para cada uno de los sets de primers, como se observa para el caso de los primers MIOST-Prom-1F y MIOST-Prom-1R para trucha normal (Figura 6).

En el caso de los primers MIOST-Prom-1F y MIOST-Prom-1R, se obtuvieron los siguientes resultados para la Trucha albina (Figura 7).

Figura 7

Alineamiento de Secuencias. 1F y 1R-Trucha albina 1ª (PRIMER PROM 1A)



Nota. Se observa un Conflicto, un cambio de base en la secuencia consenso de tipo Transversión (C por G), se procedió a corregir usando las herramientas del programa CLC Genomics Workbench.

En el caso de los primers MIOST-Prom-2F y MIOST-Prom-2R, se obtuvieron los siguientes resultados para la Trucha dorada (albina) (Figura 8).

Figura 8

Alineamiento de secuencias. 2F y 2R – Trucha albina 1ª (PRIMER PROM 2B).



Nota. Se observa la presencia de Conflictos, cambios de base en la secuencia consenso de Trucha dorada (albina) respecto a la secuencia de referencia, se procedió a corregir usando las herramientas del programa CLC Genomics Workbench.

Respecto a los primers MIOST-Prom-2F y MIOST-Prom-2R, se obtuvieron los siguientes resultados para la Trucha silvestre (normal) (Figura 9).

Figura 9

Alineamiento de Secuencias. 2F y 2R – Trucha normal 1ª (PRIMER PROM 2B)



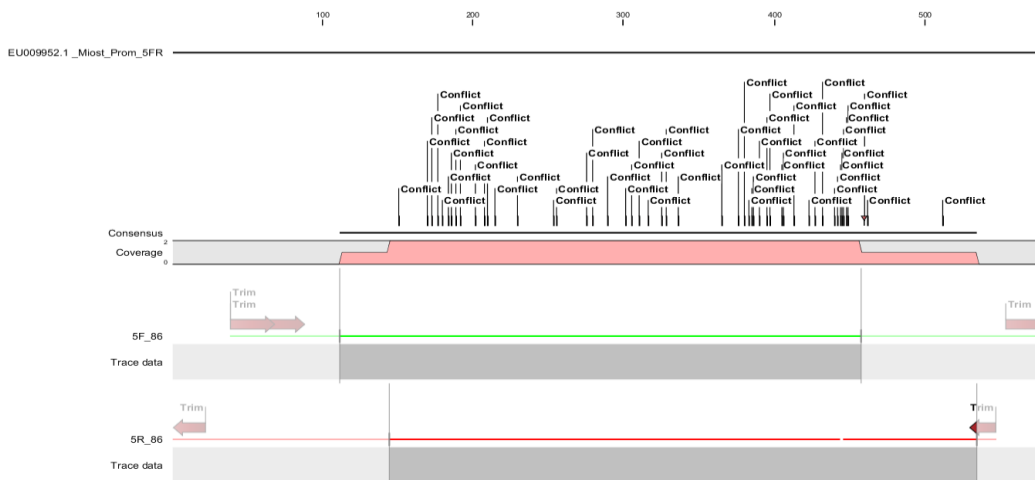
Nota. Se observa la presencia de Conflictos, cambios de base en la secuencia consenso de Trucha silvestre (normal) respecto a la secuencia de referencia, se procedió a corregir usando las herramientas del programa CLC Genomics Workbench.

Para los primers MIOST-Prom-5F y MIOST-Prom-5R, se obtuvieron los siguientes resultados para la Trucha dorada (albina) (Figura 10) y para trucha silvestre (común) (Figura 11), respectivamente.

Figura 10

Alineamiento de Secuencias. 5F Y 5R – Trucha albina 3C (PRIMER PROM

3C)

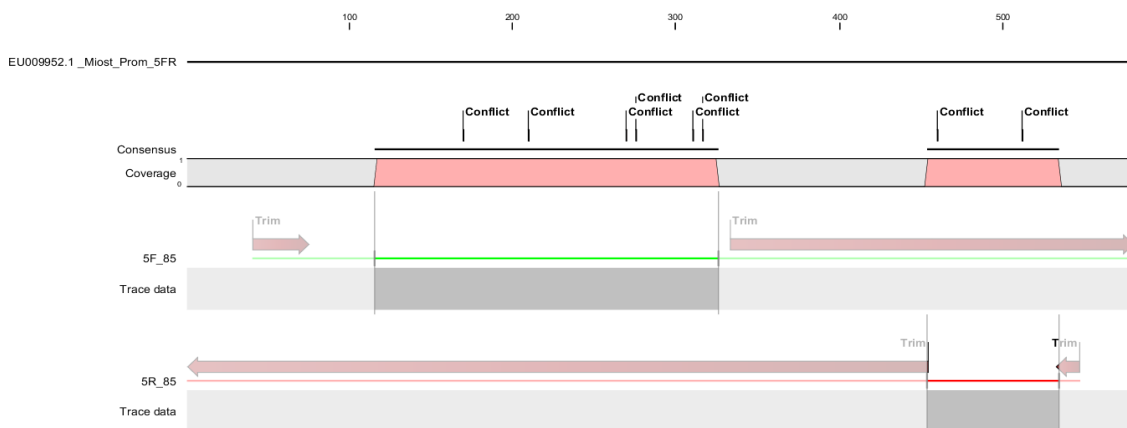


Nota. Se observa la presencia de Conflictos, cambios de base en la secuencia consenso de Trucha dorada (albina) respecto a la secuencia de referencia, se procedió a corregir usando las herramientas del programa CLC Genomics Workbench.

Figura 11

Alineamiento de Secuencias. 5F Y 5R – Trucha normal 3C (PRIMER PROM

3C)



Nota. Se observa la presencia de Conflictos, cambios de base en la secuencia consenso de Trucha silvestre (común) respecto a la secuencia de referencia, se procedió a corregir usando las herramientas del programa CLC Genomics Workbench.

Para los primers MIOST-Exon-1F y MIOST-Exon-1R, se obtuvieron los siguientes resultados para la Trucha dorada (albina) (Figura 12) y para trucha silvestre (común) (Figura 13), respectivamente.

Figura 12

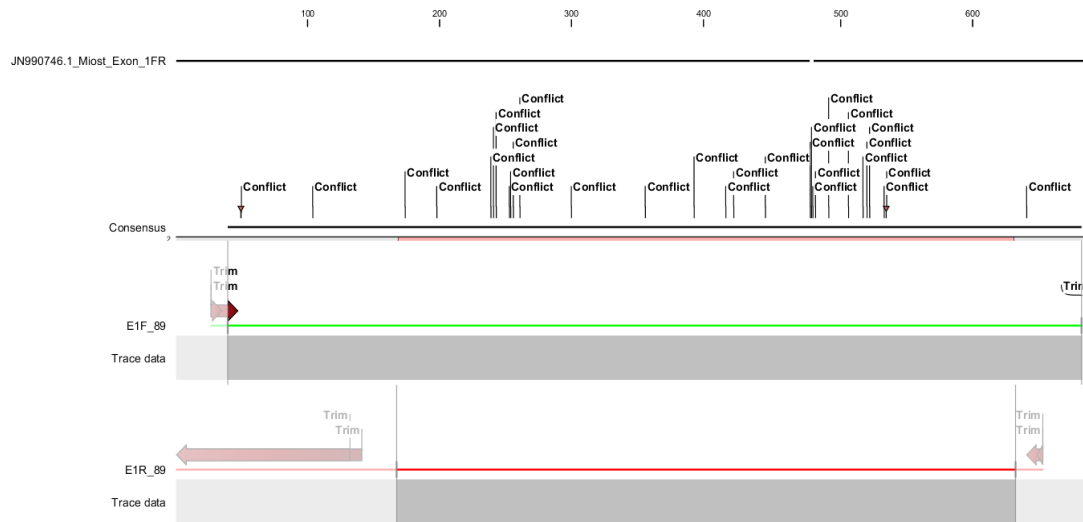
Alineamiento de Secuencias. EIF y EIR – Trucha albina (PRIMER PROM EXON)



Nota. Se observa la presencia de Conflictos, cambios de base en la secuencia consenso de Trucha dorada (albina) respecto a la secuencia de referencia, se procedió a corregir usando las herramientas del programa CLC Genomics Workbench.

Figura 13

Alineamiento de Secuencias. Primers EIF y EIR – Trucha Normal (PRIMER PROM – EXON)



Nota. Se observa la presencia de Conflictos, cambios de base en la secuencia consenso de Trucha silvestre (común) respecto a la secuencia de referencia, se procedió a corregir usando las herramientas del programa CLC Genomics Workbench.

Una vez resueltos los sitios de conflicto, al final se obtuvo las siguientes secuencias de consenso, para cada región

> Consensus_PROM_1A_trucha_normal

```

ATGTGCACTACGTTACCAAAGTGGGCACCATAACCACATTGTGCAGTAATTT
AACTAAATGCTAAATCGATTTAAGGTCTTAAAGCCATGAATAGTCATACCTGGAT
GACTACACCTTCTTGCCATCATTCTACTCGAGATTGTCCATAGGTCATCGTTGAA
ATTGTTGCCTGTTTGACTACACTTTATAATGGCGGCTGTAGCTTGTAGGACGTAAT
TATATTTTTAAAACACTCTCAACAGCAATTAGTAGCTGTGTCGACTATGTCGTGG
+AGGTAAATTGTGCGCATAACAATCAGGATACTGATACTTGTACAATATCACCCCTC
TTGTGGCATGCTTGACTTCTCAGTGATTTATTACAATGTTTAAAGTAAGGAATAT
ATTCAGTTGTTGCTATAAACTAATGCCATAGATTATAATCCTGTCTCCCAGGCCTT

```


TGCTGGAAGTGTACCCCGTGCAGCTTCCCTGTGTCTAAATTTTAGGCTACTACT
GAGTCTGCCAAGGGGTCTGGACCATTATG

> Consensus_PROM_2B_trucha_albina

CATATGTGCTCGGATATATTTCAAACCAATTGTTGTCAGTTAAAAAAAAA
ATATATATATGACGAGTTCGTTCTTGACGAATGCGTAAATCTGTAAACTCATGG
AGGAGTGTGCGTAAACTGTATAGTCCATAAGTGTAATTAGTTAAAGTCGTTTA
GTATGTTTTCTTTCACATAAGGGATATAGTCTCAAATTCATAATGATAATAGGC
TATAAACCATGACATGACTCGTGACCAAGTCATTGTGTCATGCCATCCATATTG
CTGCGTAAATGTACATAATTTAGACGATTTGATTGACTTTCATTAGAACCTATA
TGTTACTTTTCATCTGTAAATGAAAATAATATTTTCATAACCTGTGTGTAATGTTGC
AACTGTAGTTGTCGATAAGCCGCACGATG

> Consensus_PROM_2B_trucha_normal

CATCCATATTGCTGCGTAAATGTACATAATTTAGACGATTTGATTGACTT
TCATTAGAACCTATATGTTACTTTTCATCTGTAAATGAAAATAATATTTTCATAACC
TGTGTGTAATGTTGCAACTGTAGTTGTCGATAAGCCGCACGATG

> Consensus_PROM_3C_trucha_albina

AATGGTATCTATCCTATAGCCTATTGATTAATACATTTTGCCTTTGGAAAG
TAGGTTTGGAGACATGTAGGTCTACTTCATGTAGCCTATAGGTCTACATAGACTA
AATATTGGTTCCTGTCATATTTGTAAATAATTGACCTTACATTTTCAAGAGAGATT
CAAAAAAATAGGCAAGCTGATCATATAACTAACTGATTGTAAAAGAAGTGGTCA
TAACTCAGATTAATTTGATCCCTGTAGCTTTGATGGGATGCAGGGGCGGACTGGC
CATCTGGCATTCCCGACAAATGTCTGAAGGGTTGGTAAATTCTTTGCCTAGAGGG
CCTGTCTAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGCAAATGATAATTATCTGGCTAA
TAATGGTGGCCTCAATTAATAAAATGGGCTGGTGTGGGG

> Consensus_PROM_3C_trucha_normal

GTATCTATCCTATAGCCTATTGATTAATACATTTTGCCTTTGGAAAGTAGG
 TTTGGAGACATGTAGGTCTACTCCATGTAGCCTATAGGTCTACATAGACTAAATA
 TTGGTTCCTGTCATATTTGTAAATAATTGACCTTACATTTTCAAGAGAGATTCATA
 AAGATAGGCAAGCTGATCATATAACTAACTGATTGTAAAGAAGTGGTCATAACT
 CAGATTAATTTGATCCCTGTAGCTTTGATGGGATGCAGGGGCGGACTGACCATCT
 GGCATTCCCTGGCAAATGTCAGAAGGGTTGGTAAATTCTTTGCCTAGAGGGCCTGT
 CTAACTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGCAAATGATAATTATCTGGCTAATAA
 TGGTGGCCTCAATTAATAAAATGGGCTGGTGTGGGG

> Consensus_PROM_EXON_trucha_albina

TTTGGGATTCCATTTTTATAGCAAACCTCCGCACCTTAGATAATGCATCTGA
 CGCAGGTTCTGATTTATCTCAGTTTCATGGTTGCTTTCGGTCCAGTGGGTCTTGGT
 GATCAAACCGCGCACCACCAGCCCCCTGCCACGGATGACGGCGAGCAGTGCTCA
 ACATGCGAGGTCCGACAGCAGATCAAAAACATGAGATTACACGCCATCAAGTCC
 CAAATTCTTAGCAAACCTGCGACTCAAGCAAGCTCCCAATATCAGCAGAGATGTT
 GTCAAGCAGCTCCTGCCTAAGGCACCACCTTTGCAGCAACTTCTTGACCAGTACG
 ATGTTCTTGGAGATGACAATAAGGATGGACTTATGGAAGAAGATGATGAACATG
 CCATCACAGAAACAATCATGACAATGGCCACTGAACGTAAGTTTGACAGACTAT
 TATTCAATGTAACCTAACTATACAGTGAGTGTACAAAACGTTAGGACAACCTGTTT
 TTTCCATGACTAGACTGACCAGGTGAATCCAGGTGAAAGCTATGATCCCTTATTG
 ATGTCACTTGTTGAATCAACTTCAACCCGTGTAGATGAAGGGGAGGAGACAGGT
 TAAATAATAATTTTAAGCCTTGAGACAATTGAGACATGGATTGCGTA

> Consensus_PROM_EXON_trucha_normal

TTTGGGATTCCATTTTTATAGCAAACCTCCGCACCTTAGATAATGCATCTGA
 CGCAGGTTCTGATTTATCTCAGTTTCATGGTTGCTTTCGGTCCAGTGGGTCTTGGT

GATCAAACCGCGCACCACCAGCCCCCTGCCACGGATGACGGCGAGCAGTGCTCA
ACATGCGAGGTCCGACAGCAGATCAAAAACATGAGATTACACGCCATCAAGTCC
CAAATTCTTAGCAAACCTGCGACTCAAGCAAGCTCCCAATATCAGCAGAGATGTT
GTCAAGCAGCTCCTGCCTAAGGCACCACCTTTGCAGCAACTTCTTGACCAGTACG
ATGTTCTTGGAGATGACAATAAGGATGGACTTATGGAAGAAGATGATGAACATG
CCATCACAGAAACAATCATGACAATGGCCACTGAACGTAAGTTTGACAGACTAT
TATTC AATGTA ACTA ACTATA CAGTGAGTGTACAAAACGTTAGGACAACCTGTTT
TTTCCATGACTAGACTGACCAGGTGAATCCAGGTGAAAGCTATGATCCCTTATTG
ATGTC ACTTGT TGAATCAACTTCAACCCGTGTAGATGAAGGGGAGGAGACAGGT
TAAATAATAATTTTTAAGCCTTGAGACAATTGAGACATGGATTGCGTATG

Una vez obtenidas las secuencias consenso se procedió a utilizar el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para el análisis de la similitud (Altschul et al., 1997; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con secuencias de aminoácidos para el gen de la Miostatina ya existentes en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), en el sitio de internet <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, obteniéndose lo observado en las figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20.

Figura 14*Consensus_PROM_1A_trucha_normal***Oncorhynchus mykiss myostatin 1a gene, promoter region and complete cds**Sequence ID: [DQ136028.1](#) Length: 5470 Number of Matches: 1[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)Range 1: 193 to 713 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
952 bits(515)	0.0	519/521(99%)	0/521(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGTGCACTACGTTACCAAAC	TGGGCACCATACCACATTGTGCAGTAATTTAACTAAATG	60	
Sbjct 193	ATGTGCACTACGTTACCAAAC	TGGGCACCATACCACATTGTGCAGTAATTTAACTAAATG	252	
Query 61	CTAAATCGATTTAAGGCTTAAAGCCATGAATAGTCATACCTGGATGACTACACCTTCTT	120		
Sbjct 253	CTAAATCAATTTAAGGCTTAAAGCCATGAATAGTCATACCTGGATGACTACACCTTCTT	312		
Query 121	GCCATCATTCTACTCGAGATTGTCCATAGGTCATCGTTGAAATTGTTGCCTGTTTGACTA	180		
Sbjct 313	GCCATCATTCTACTCGAGATTGTCCATAGGTCATCGTTGAAATTGTTGCCTGTTTGACTA	372		
Query 181	CAC TTTATAATGGCGGCTGTAGCTTGTAGGACGTAATTATATTTTTAAAACACTCTCAAC	240		
Sbjct 373	CAC TTTCTAATGGCGGCTGTAGCTTGTAGGACGTAATTATATTTTTAAAACACTCTCAAC	432		
Query 241	AGCAATTAGTAGCTGTGTCGACTATGTCGTGGAGGTAATTTGTGCGCATACAATCAGGAT	300		
Sbjct 433	AGCAATTAGTAGCTGTGTCGACTATGTCGTGGAGGTAATTTGTGCGCATACAATCAGGAT	492		
Query 301	ACTGATACTTGTACAATATCACCCCTCTTGTGGCATGCTTGACTTCTCAGTGATTTATTAC	360		
Sbjct 493	ACTGATACTTGTACAATATCACCCCTCTTGTGGCATGCTTGACTTCTCAGTGATTTATTAC	552		
Query 361	AATGTTTAAAGTAAGGAATATATTCAGTTGTTGCTATAAACTAATGCCATAGATTATAAT	420		
Sbjct 553	AATGTTTAAAGTAAGGAATATATTCAGTTGTTGCTATAAACTAATGCCATAGATTATAAT	612		
Query 421	CCTGTCCTCCAGGCCTTTGCTGGAAGTGTACCCCGTGCAGCTTCCCTGTGTCTAAATTT	480		
Sbjct 613	CCTGTCCTCCAGGCCTTTGCTGGAAGTGTACCCCGTGCAGCTTCCCTGTGTCTAAATTT	672		
Query 481	TAGGCTACTACTGAGTCTGCCAAGGGGTCTGGACCATTATG	521		
Sbjct 673	TAGGCTACTACTGAGTCTGCCAAGGGGTCTGGACCATTATG	713		

Figura 15

Consensus_PROM_2B_trucha_albina

Oncorhynchus mykiss myostatin 1a gene, promoter region and complete cds

Sequence ID: [DQ136028.1](#) Length: 5470 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 780 to 1189 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
752 bits(407)	0.0	409/410(99%)	0/410(0%)	Plus/Plus
Query 1	CATATGTGCTCGGATATATTTCAAACCAATTGTTGTCAGTTaaaaaaaaTATATATAT	60		
Sbjct 780	CATATGTGCTCGGATATATTTCAAACCAATTGTTGTCAGCTAAAAAAAAATATATATAT	839		
Query 61	GACGAGTTCGTTCTTGACGAATGCGTAAATCTGTAAAACATGGAGGAGTGTGCGTAAA	120		
Sbjct 840	GACGAGTTCGTTCTTGACGAATGCGTAAATCTGTAAAACATGGAGGAGTGTGCGTAAA	899		
Query 121	ACTGTATAGTCCATAAGTGTAATTAGTTAAAGTCGTTTAGTATGTTTTCTTTCACATAA	180		
Sbjct 900	ACTGTATAGTCCATAAGTGTAATTAGTTAAAGTCGTTTAGTATGTTTTCTTTCACATAA	959		
Query 181	GGGATATAGTCTCAAATTCATAATGATAATAGGCATAAACCATTGACATGACTCGTGA	240		
Sbjct 960	GGGATATAGTCTCAAATTCATAATGATAATAGGCATAAACCATTGACATGACTCGTGA	1019		
Query 241	CCAAGTCATTGTGTCATGCCATCCATATTGCTGCGTAAAATGTACATAATTTAGACGATT	300		
Sbjct 1020	CCAAGTCATTGTGTCATGCCATCCATATTGCTGCGTAAAATGTACATAATTTAGACGATT	1079		
Query 301	TGATTGACTTTTCATTAGAACCCTATATGTTACTTTTCATCTGTAATGAAAATAATATTTTC	360		
Sbjct 1080	TGATTGACTTTTCATTAGAACCCTATATGTTACTTTTCATCTGTAATGAAAATAATATTTTC	1139		
Query 361	ATAACCTGTGTGAATGTTGCAACTGTAGTTGTCGATAAGCCGCACGATG	410		
Sbjct 1140	ATAACCTGTGTGAATGTTGCAACTGTAGTTGTCGATAAGCCGCACGATG	1189		

Figura 16*Consensus_PROM_2B_trucha_normal***Oncorhynchus mykiss myostatin 1a gene, promoter region and complete cds**Sequence ID: [DQ136028.1](#) Length: 5470 Number of Matches: 1[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)Range 1: 1039 to 1189 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
279 bits(151)	4e-71	151/151(100%)	0/151(0%)	Plus/Plus
Query 1	CATCCATATTGCTGCGTAAAATGTACATAATTTAGACGATTTGATTGACTTTCATTAGAA	60		
Sbjct 1039	CATCCATATTGCTGCGTAAAATGTACATAATTTAGACGATTTGATTGACTTTCATTAGAA	1098		
Query 61	CCTATATGTTACTTTTCATCTGTAATGAAAAATAATTTTCATAACCTGTGTGTAATGTT	120		
Sbjct 1099	CCTATATGTTACTTTTCATCTGTAATGAAAAATAATTTTCATAACCTGTGTGTAATGTT	1158		
Query 121	GCAACTGTAGTTGTCGATAAGCCGCACGATG	151		
Sbjct 1159	GCAACTGTAGTTGTCGATAAGCCGCACGATG	1189		

Figura 17*Consensus_PROM_3C_trucha_albina***Oncorhynchus mykiss myostatin 1a gene, promoter region and complete cds**Sequence ID: [DQ136028.1](#) Length: 5470 Number of Matches: 1[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)Range 1: 1314 to 1735 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
747 bits(404)	0.0	417/423(99%)	1/423(0%)	Plus/Plus
Query 1	AATGGTATCTATCCTATAGCCTATTGATTAATACATTTTGCCTTTGGAAAAGTAGGTTTGG	60		
Sbjct 1314	AATGGTATCTATCCTATAGCCTATTGATTAATACATTTTGCCTTTGGAGAGTAGGTTTGG	1373		
Query 61	AGACATGTAGGTCTACTTTCATGTAGCCTATAGGTCTACATAGACTAAATATTGGTTCCTG	120		
Sbjct 1374	AGACATGTAGGTCTACTTTCATGTAGCCTATAGGTCTACATAGACTAAATATTGGTTCCTG	1433		
Query 121	TCATATTTGTAATAAATTGACCTTACATTTTCAAGAGAGATTCaaaaaaTAGGCAAGCT	180		
Sbjct 1434	TCATATTTGTAATAAATTGACCTTACATTTTCAAGAGAGATTCAGAAAGATAGGCAAGCT	1493		
Query 181	GATCATATAACTAACTGATTGTAAAAGAAGTGGTCATAACTCAGATTAATTTGATCCCTG	240		
Sbjct 1494	GATCATATAACTAACTGATTGTAAAAGAAGTGGTCATAACTCAGATTAATTTGATCCCTG	1553		
Query 241	TAGCTTTGATGGGATGCAGGGCGGACTGGCCATCTGGCATTCCCGACAATGTCTGAAG	300		
Sbjct 1554	TAGCTTTGATGGGATGCAGGGCGGACTGGCCATCTGGCATTCCCGACAATGTCTGAAG	1613		
Query 301	GGTTGGTAAATTCCTTGCCTAGAGGGCCTGTCTAACTttttttttttttttttttttttGC	360		
Sbjct 1614	GGTTGGTAAATTCCTTGCCTAGAGGGCCTGTCTAACTTTTTTTATTTATT-TTTTTTTGC	1672		
Query 361	GCAAAATGATAATTATCTGGCTAATAATGGTGGCCTCAATTAATAAAATGGGCTGGTGTG	420		
Sbjct 1673	GCAAAATGATAATTATCTGGCTAATAATGGTGGCCTCAATTAATAAAATGGGCTGGTGTG	1732		
Query 421	GGG 423			
Sbjct 1733	GGG 1735			

Figura 18*Consensus_PROM_3C_trucha_normal***Oncorhynchus tshawytscha isolate 05Bonn-04-07 myostatin 1a gene, promoter region and complete cds**Sequence ID: [EU009953.1](#) Length: 5506 Number of Matches: 1[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)Range 1: 1266 to 1684 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
743 bits(402)	0.0	413/419(99%)	0/419(0%)	Plus/Plus
Query 1		GTATCTATCCTATAGCCTATTGATTAATACATTTTGCCTTTGGAAAGTAGGTTTGGAGAC		60
Sbjct 1266		GTATCTATCCTATAGCCTATTGATTAATACATTTTGCCTTTGGAAAGTAGGTTTGGAGAC		1325
Query 61		ATGTAGGCTACTCCATGTAGCCTATAGGCTACATAGACTAAATATTGGTTCCTGTCAT		120
Sbjct 1326		ATGTAGGCTACTCCATGTAGCCTATAGGCTACATAGACTAAATATTGGTTCCTGTCAT		1385
Query 121		ATTTGTAATAATTGACCTTACATTTTCAAGAGAGATTCATAAAGATAGGCAAGCTGATC		180
Sbjct 1386		ATTTGTAATAATTGACCTTACATTTTCAAGAGAGATTCAGAAAGATAGGCAAGCTGATC		1445
Query 181		ATATAACTAACTGATTGTAAGAAGTGGTCATAACTCAGATTAATTTGATCCCTGTAGCT		240
Sbjct 1446		ATATAACTAACTGATCGTAAAGAAGTGGTCATAACTCAGATTAATTTGATCCCTGTAGCT		1505
Query 241		TTGATGGGATGCAGGGCGGACTGACCATCTGGCATTCTGGCAAATGTCAGAAGGGTTG		300
Sbjct 1506		TTGATGGGATGCAGGGCGGACTGACCATCTGGCATTCTGGCAAATGTCAGAAGGGTTG		1565
Query 301		GTAAATTCCTTTCCTAGAGGGCCTGTCTAACTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAA		360
Sbjct 1566		GTAAATTCCTTTCCTAGAGGGCCTGTCTAACTTCTTTTTTTTTTCTTTTTTTTGGCCAA		1625
Query 361		AATGATAATTATCTGGCTAATAATGGTGGCCTCAATTAATAAAATGGGCTGGTGTGGGG		419
Sbjct 1626		AATGATAATTATCTGGCTAATAATGGTGGCCTCAATKAATAAAATGGGCTGGTGTGGGG		1684

Figura 19

Consensus_PROM_EXON_trucha_albina

Oncorhynchus mykiss myostatin 1a gene, promoter region and complete cds

Sequence ID: [DQ136028.1](#) Length: 5470 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 2244 to 2887 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1184 bits(641)	0.0	643/644(99%)	0/644(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTTGGGATTCCATTTTTATAGCAAACCTCCGCACCTTAGATAAATGCATCTGACGCAGGTTCT	60		
Sbjct 2244	TTTGGGATTCAATTTTTATAGCAAACCTCCGCACCTTAGATAAATGCATCTGACGCAGGTTCT	2303		
Query 61	TGATTTATCTCAGTTTCATGGTTGCTTTTCGGTCCAGTGGGTCTTGGTGATCAAACCGCGC	120		
Sbjct 2304	TGATTTATCTCAGTTTCATGGTTGCTTTTCGGTCCAGTGGGTCTTGGTGATCAAACCGCGC	2363		
Query 121	ACCACCAGCCCCCTGCCACGGATGACGGCGAGCAGTGCTCAACATGCGAGGTCCGACAGC	180		
Sbjct 2364	ACCACCAGCCCCCTGCCACGGATGACGGCGAGCAGTGCTCAACATGCGAGGTCCGACAGC	2423		
Query 181	AGATCAAAAACATGAGATTACACGCCATCAAGTCCCAAATTCCTTAGCAAACCTGCGACTCA	240		
Sbjct 2424	AGATCAAAAACATGAGATTACACGCCATCAAGTCCCAAATTCCTTAGCAAACCTGCGACTCA	2483		
Query 241	AGCAAGCTCCCAATATCAGCAGAGATGTTGTCAAGCAGCTCCTGCCTAAGGCACCACCTT	300		
Sbjct 2484	AGCAAGCTCCCAATATCAGCAGAGATGTTGTCAAGCAGCTCCTGCCTAAGGCACCACCTT	2543		
Query 301	TGCAGCAACTTCTTGACCAGTACGATGTTCTTGGAGATGACAATAAGGATGGACTTATGG	360		
Sbjct 2544	TGCAGCAACTTCTTGACCAGTACGATGTTCTTGGAGATGACAATAAGGATGGACTTATGG	2603		
Query 361	AAGAAGATGATGAACATGCCATCACAGAAACAATCATGACAATGGCCACTGAACGTAAGT	420		
Sbjct 2604	AAGAAGATGATGAACATGCCATCACAGAAACAATCATGACAATGGCCACTGAACGTAAGT	2663		
Query 421	TTGACAGACTATTATTCAATGTAACATACTATACAGTGAGTGACAAAACGTTAGGACAA	480		
Sbjct 2664	TTGACAGACTATTATTCAATGTAACATACTATACAGTGAGTGACAAAACGTTAGGACAA	2723		
Query 481	CCTGTTTTTCCATGACTAGACTGACCAGGTGAATCCAGGTGAAAGCTATGATCCCTTAT	540		
Sbjct 2724	CCTGTTTTTCCATGACTAGACTGACCAGGTGAATCCAGGTGAAAGCTATGATCCCTTAT	2783		
Query 541	TGATGTCACCTGTTGAATCAACTTCAACCCGTGTAGATGAAGGGGAGGAGACAGGTAAA	600		
Sbjct 2784	TGATGTCACCTGTTGAATCAACTTCAACCCGTGTAGATGAAGGGGAGGAGACAGGTAAA	2843		
Query 601	TAATAATTTTTAAGCCTTGAGACAATTGAGACATGGATTGCGTA	644		
Sbjct 2844	TAATAATTTTTAAGCCTTGAGACAATTGAGACATGGATTGCGTA	2887		

Figura 20*Consensus_PROM_EXON_trucha_normal***Oncorhynchus mykiss myostatin 1a gene, promoter region and complete cds**Sequence ID: [DQ136028.1](#) Length: 5470 Number of Matches: 1[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)Range 1: 2244 to 2889 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1188 bits(643)	0.0	645/646(99%)	0/646(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTTGGGATTCCATTTTTATAGCAAACCTCCGCACCTTAGATAATGCATCTGACGCAGGTTTC			60
Sbjct 2244	TTTGGGATTCAATTTTTATAGCAAACCTCCGCACCTTAGATAATGCATCTGACGCAGGTTTC			2303
Query 61	TGATTTATCTCAGTTTCATGTTGCTTTTCGGTCCAGTGGGTCTTGGTGATCAAACCGCGC			120
Sbjct 2304	TGATTTATCTCAGTTTCATGTTGCTTTTCGGTCCAGTGGGTCTTGGTGATCAAACCGCGC			2363
Query 121	ACCACCAGCCCCCTGCCACGGATGACGGCGAGCAGTGC TCAACATGCGAGGTCGACAGC			180
Sbjct 2364	ACCACCAGCCCCCTGCCACGGATGACGGCGAGCAGTGC TCAACATGCGAGGTCGACAGC			2423
Query 181	AGATCAAAAACATGAGATTACACGCCATCAAGTCCCAAATTCCTAGCAAACCTGCGACTCA			240
Sbjct 2424	AGATCAAAAACATGAGATTACACGCCATCAAGTCCCAAATTCCTAGCAAACCTGCGACTCA			2483
Query 241	AGCAAGCTCCCAATATCAGCAGAGATGTTGTCAAGCAGCTCCTGCCTAAGGCACACCTT			300
Sbjct 2484	AGCAAGCTCCCAATATCAGCAGAGATGTTGTCAAGCAGCTCCTGCCTAAGGCACACCTT			2543
Query 301	TGCAGCAACTTCTTGACCAGTACGATGTTCTTGAGATGACAATAAGGATGGACTTATGG			360
Sbjct 2544	TGCAGCAACTTCTTGACCAGTACGATGTTCTTGAGATGACAATAAGGATGGACTTATGG			2603
Query 361	AAGAAGATGATGAACATGCCATCACAGAAACAATCATGACAATGGCCACTGAACGTAAGT			420
Sbjct 2604	AAGAAGATGATGAACATGCCATCACAGAAACAATCATGACAATGGCCACTGAACGTAAGT			2663
Query 421	TTGACAGACTATTATTCAATGTAACCTAACTATACAGTGAGTGACAAAACGTTAGGACAA			480
Sbjct 2664	TTGACAGACTATTATTCAATGTAACCTAACTATACAGTGAGTGACAAAACGTTAGGACAA			2723
Query 481	CCTGTTTTTCCATGACTAGACTGACCAGGTGAATCCAGGTGAAAGCTATGATCCCTTAT			540
Sbjct 2724	CCTGTTTTTCCATGACTAGACTGACCAGGTGAATCCAGGTGAAAGCTATGATCCCTTAT			2783
Query 541	TGATGTCACCTTGTGAATCAACTTCAACCCGTGTAGATGAAGGGGAGGAGACAGGTTAAA			600
Sbjct 2784	TGATGTCACCTTGTGAATCAACTTCAACCCGTGTAGATGAAGGGGAGGAGACAGGTTAAA			2843
Query 601	TAATAATTTTTAAGCCTTGAGACAATTGAGACATGGATTGCGTATG			646
Sbjct 2844	TAATAATTTTTAAGCCTTGAGACAATTGAGACATGGATTGCGTATG			2889

Finalmente, se realizó un alineamiento de las secuencias consenso, para cada uno de los sets de primers para ambos organismos Trucha silvestre (común) y trucha albina (dorada), en las figuras 21, 22 y 23, respectivamente.

Figura 21

Alineamiento de la secuencia consenso_PROM_2B_trucha_albina

(dorada)_vs_ Trucha silvestre (normal).

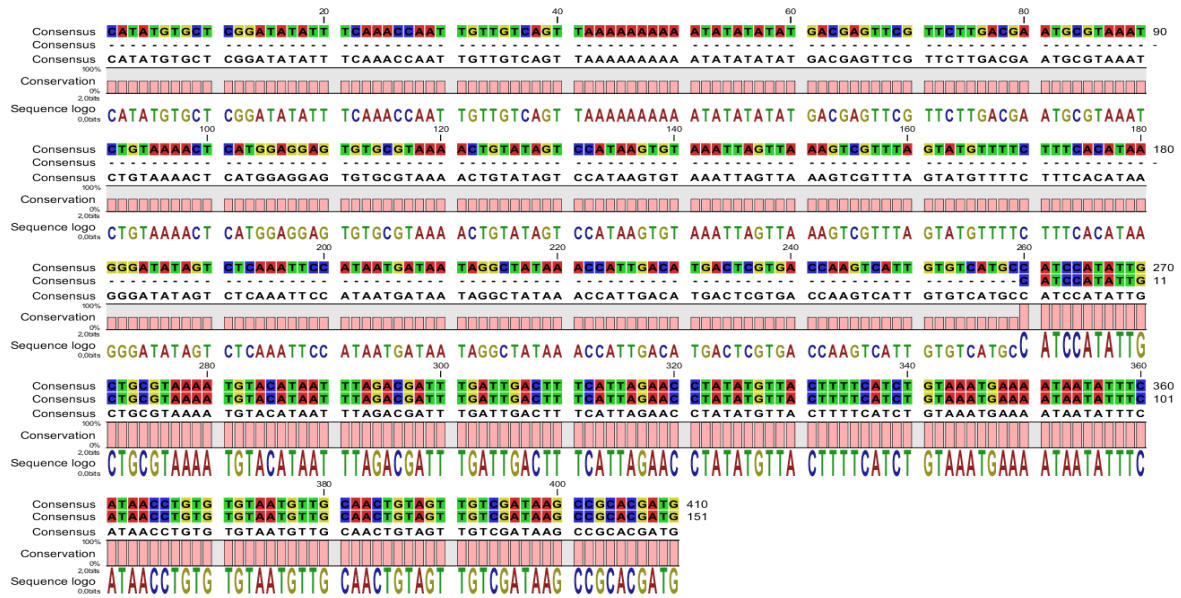


Figura 22

Alineamiento de la secuencia consenso_PROM_3C_trucha_albina (dorada)_vs_

Trucha silvestre (normal).

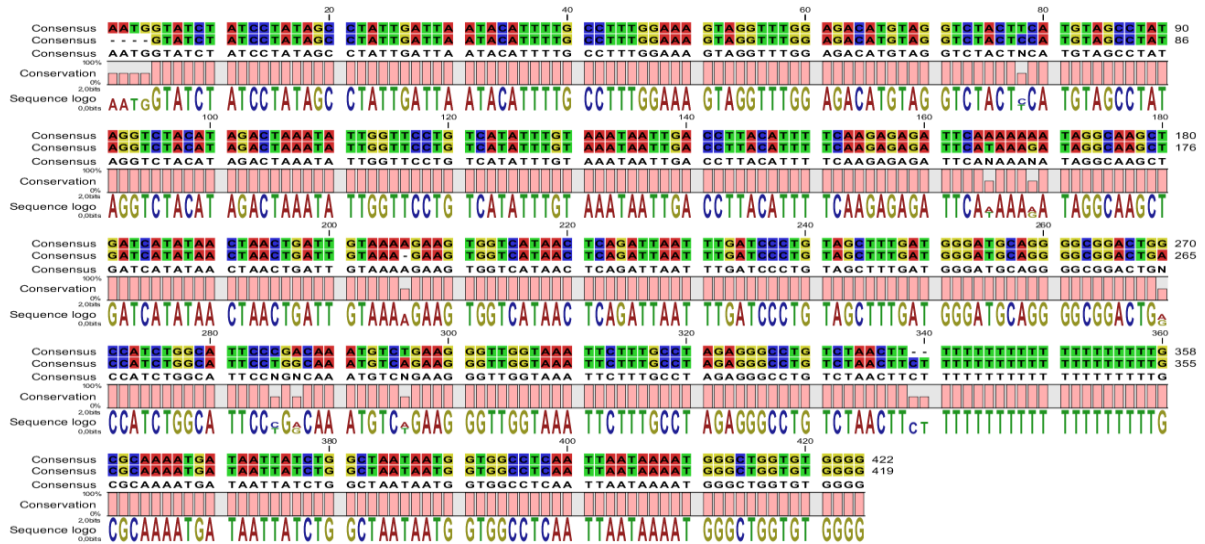
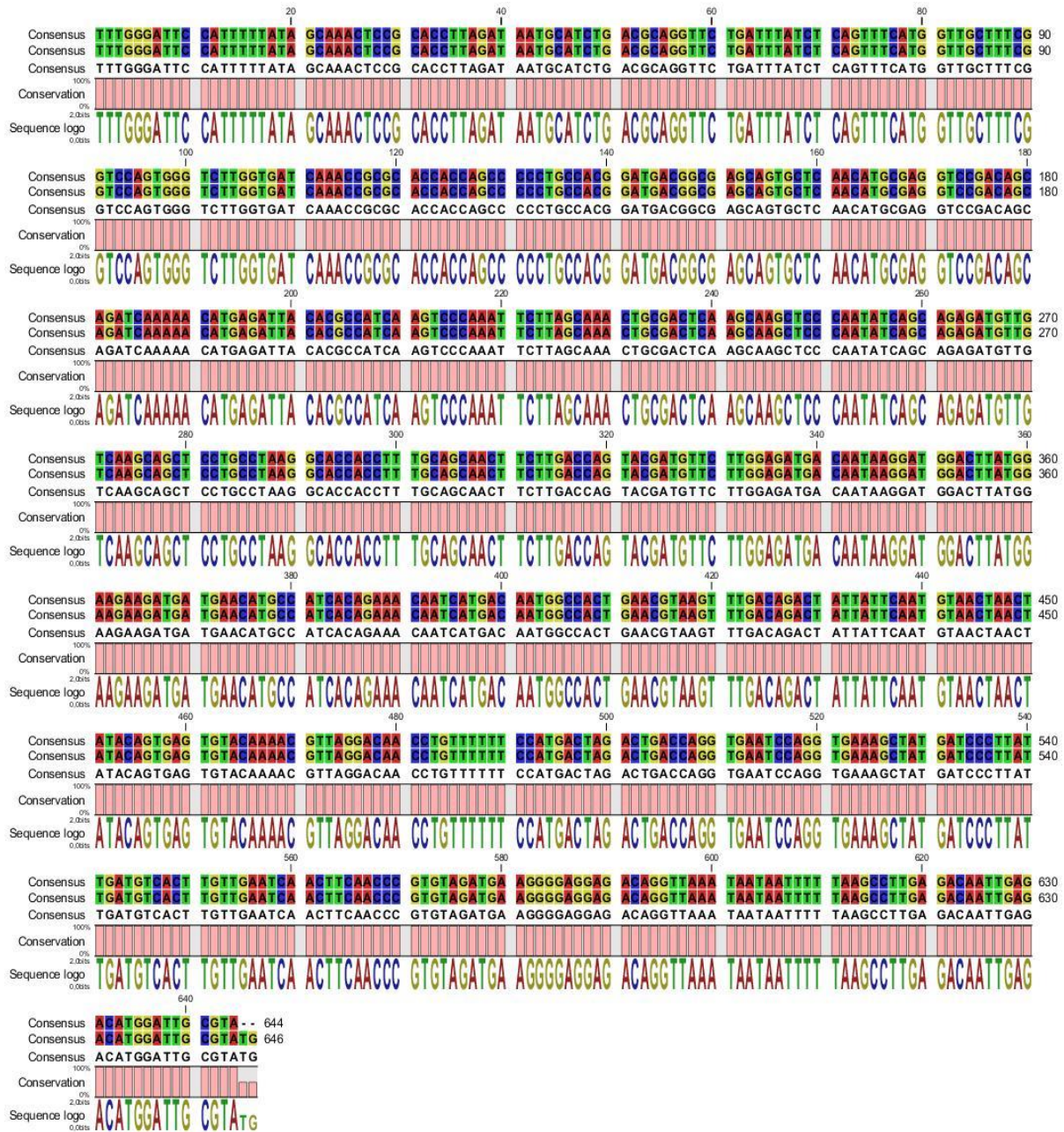


Figura 23

Alineamiento de la secuencia consenso_PROM_EXON_trucha_albina

(dorada)_vs_ Trucha silvestre (normal)



V DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La extracción de ADN se realizó utilizando el *gSYNC DNA Extraction Kit – GENEaid*, arrojando valores de 38.518 ng/ μ L y 33.088 ng/ μ L, además de ello se determinó el parámetro de absorbancia (A260/A280) valor que determina la pureza de ADN en el rango de calidad de 1.8 – 2.0. Para el trabajo de investigación se obtuvieron 1.709 y 1.723 tanto para trucha común como para trucha albina respectivamente. Valores que se encuentran por debajo del mínimo aceptable, el cual se debe a la calidad en la extracción, obteniéndose ADN de menor pureza y con presencia de contaminantes los cuales afectan directamente al rendimiento de la PCR.

Al realizar el análisis cualitativo de la extracción a través de un gel de agarosa se observa que existe la presencia de ADN de alto peso molecular debido a que existe una banda por encima de los 20 000 bp. Este análisis ayudó a detectar la no presencia de “*smear o chorreo*” que representa ADN degradado lo que dificultaría el proceso de PCR.

Según Innis & Geldand (1990) mencionan que se debe usar una temperatura de anillamiento o hibridación 5 °C por debajo de la temperatura de fusión más baja del par de primers utilizados, lo cual no se ve reflejado con las temperaturas de hibridación observadas en la tabla 1 siendo obtenidas del programa virtual de ThermoFisher SCIENTIFIC, T_m Calculator (<https://www.thermofisher.com>), la cual toma consideraciones dependiendo del kit de amplificación y los μ M de primer adicionados en las condiciones de PCR. Al momento de realizar una gradiente de temperatura para descartar lo dicho por Innis & Geldand (1990), se observó una mayor especificidad a la hora de observar las bandas en el gel de agarosa, lo que concuerda con Rychlik et al. (1990), el cual menciona que las temperaturas de hibridación demasiado bajas pueden llevar a eventos de inespecificidad en los primers utilizados.

El gen de miostatina ha sido identificado en diversas especies de vertebrados, la función de la miostatina es muy estudiada en lo que se refiere al agro, ganado, aves y diversos

mamíferos (McPherron et al., 2013). Pero aún se desconoce la función exacta dentro de los teleósteos, ya que posee al menos dos genes paralogos son expresados en diversos tejidos, estudios en mamíferos indican que el gen de la miostatina está altamente conservado durante la evolución de los vertebrados, lo que nos indica que la función de ser un gen de regulación negativa también ha sido conservado (Reyes & Rojas, 2014). En la tabla 5, podemos observar que el blast realizado a los primers, se aparean con la región de Miostatina 1a de *Oncorhynchus mykiss* reportado por Garitipaki et al., (2006), observando un asolapado en los productos de amplificación de cada primer, en el caso del primer Miost-prom-1 el producto de amplificación va desde el par base 152, hasta el par base 758, el primer Miost-prom-2, va desde el par base 732 al par base 1236, el primer Miost-prom-5, va desde el par base 1151 al par base 1781, y para finalizar el primer que amplifica parte del promotor y parte del exón, el primer Miost-exon1 que va desde el par base 2201 al par base 2896. Este análisis blast para los primers nos afirma la capacidad de amplificación para la región promotora para el gen de Miostatina de *Oncorhynchus mykiss*, de esta manera los productos amplificados por los tres primeros pares de primers generan un “asolapamiento” *in silico* que permitiría tener una secuencia consenso de casi toda la región promotora (75% aprox.). Y el par de primer del exón 1, genera un producto de amplificación de casi toda la región del exón 1 del gen de miostatina esto nos daría una dirección, para poder utilizar herramientas moleculares más actuales (Doudna et al., 2004) y realizar un posible programa de mejoramiento genético.

Las PCRs realizadas para amplificar a cada uno de los fragmentos del promotor y del Exón 1 del gen de la Miostatina, evidencian el amplicón correspondiente, observándose que ambos tipos de variedades de trucha (Silvestre o común y Dorada o albina) presentan el gen en estudio. Sin embargo, para corroborar que efectivamente es el gen de interés, se procedió con la secuenciación Sanger para lograr obtener la secuencia de cada uno de los amplicones obtenidos con el set de primers testeados en el presente trabajo.

Para obtener la secuencia de referencia para el análisis de los alineamientos se usó los primers y mediante un BLAST se obtuvo las secuencias de referencia para cada primer, utilizando en software CLC Genomics Workbench (versión 3.6.5), para visualizar y discriminar los conflictos hallados por error de paridad de bases nitrogenadas, encontrándose transversiones o transiciones, que fueron arregladas de manera manual.

El alineamiento de secuencias mostró que ambas variedades de trucha tienen el gen que codifica a la Miostatina, lo que indica que se puede realizar las modificaciones genéticas usando herramientas CRISPR-Cas, pueden ser posibles en ambos organismos, si bien son pocos los estudios que describen la expresión de Miostatina durante el desarrollo en peces, es importante precisar de qué manera el gen influye en el desarrollo del pez, es de esperar que los patrones de expresión sean distintos en peces con diferentes mecanismos de crecimiento muscular y en diferentes órganos según lo menciona De Santis y colaboradores (Como lo cita Torres, 2012)

En un trabajo previo se obtuvo la región promotora y región codificante de la miostatina-1 para *O. mykiss* (Garikipati et al., 2006), que consta de 5470pb. En el presente estudio, si bien no se realizó un secuenciamiento a todo el gen, se realizó un blaseo de las regiones obtenidas con la subida al NCBI (Altschul et al., 1997) por Garikipati(2006) para trucha arcoíris, las cuales se observan en las figuras 14, 15, 16,17, 19, 20, en las que podemos observar que las secuencias obtenidas son prácticamente iguales a las reportadas por Garikipati (2006), para trucha arcoíris, con lo que podemos indicar que el gen de miostatina es un gen muy conservado, esto se debe a que las especies analizadas por Garikipati son truchas pertenecientes a la región de Kearneysville en USA. y las truchas arcoíris analizadas en el presente trabajo son truchas que son importadas desde USA, según lo indicado por el Gerente de Acuicultura SAC., mientras que las truchas albinas o doradas, son truchas que son obtenidas por selección, lo que se podría referir a truchas propias de este continente, al analizar las Figuras 19 y 20,

podemos observar que el blast obtenido, toma como referencia la secuencia obtenida por Garikipati (2006), en la que se observa que los primer-exon-1 F y R amplifican la misma región para las truchas provenientes de USA como para las truchas obtenidas en este continente, si bien las truchas doradas, son producto de entrecruzamientos de organismos importados, el entrecruzamiento generaría variación en el gen de miostatina, pero las variaciones con respecto a las obtenidas por Garikipati (2006), son nulas, lo que nos podría indicar que se trata de un gen muy conservado dentro de la misma especie, o dentro de la misma familia Salmonidae, lo cual también es comprobado por Reyes & Rojas (2014) en su trabajo referente a miostatina en búfalos, que si bien solo indica que es muy conservada en mamíferos. En el presente estudio podemos indicar que también es conservada en peces de la misma familia filogenética, ya que se observa en la figura 18, que el consenso obtenido para el primer Miost-Prom-5 blaseo con la especie Salmon real o Chinook, reportada por Campbell et al. (2011) lo cual confirma que el gen de miostatina es un gen conservado dentro de la misma familia filogenética, lo que también se puede observar a la hora de realizar la alineación de las secuencias amplificadas por cada par de primers en las figuras 21, 22 y 23, donde se observan pequeñas variaciones dentro de la propia secuencia, ya que el porcentaje de similitud entre estas es mayor a 99%, cual podría darse por presencia de ruido en el secuenciamiento, ya que podemos observar variaciones en la secuencia en las figuras 21 y 22. Pertenecientes al promotor del gen de miostatina, mientras que en la figura 23, no se observa ningún tipo de variación en el secuenciamiento de la región amplificada por el primer del exon1(Miost-exon1), algo que también fue reportado por Reyes & Rojas (2014) y McPherron & Lee (1997), cuando compararon las secuencias del gen entre ratas, humanos, porcinos y bovinos sugiriendo que el alto grado de conservación de las secuencias de estos animales conlleva a conservar la función del gen.

VI CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró identificar y secuenciar con ayuda de los primers diseñados con el software primer 3plus, para la especie *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arcoíris), parte de la región promotora y del exon1 del gen de miostatina y también para su variante albina.

Se logró identificar y secuenciar parte de la región promotora del gen de miostatina de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y en su variedad albina, para los 3 juegos de primers diseñados, (**Miost-Prom-1, Miost-Prom-2, Miost-Prom-5**).

Durante el trimado del secuenciamiento del producto del primer **Miost-Prom-1**, para la variante albina, debido a la cantidad de regiones conflictos que poseía el cromatograma, el programa no pudo realizar un trimado y este no pudo ser reportado a diferencia de las demás secuencias, esto debido a que presentaba muchas regiones conflicto.

Se logró identificar y secuenciar parte del exon1 del gen de miostatina de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), y en su variante albina, para el juego de primers diseñados para esta región (**Miost-Exon-1**).

El análisis del secuenciamiento de los amplicones nos indican que el gen de miostatina es un gen altamente conservado dado que el porcentaje de similitud dado por el NCBI es de 99% casi todos los secuenciamientos obtenidos, para parte de la región promotora y del exon1, ya sea para la trucha arcoíris y para su variante albina, puesto que no se encontraron diferencias significativas, entre los resultados obtenidos del secuenciamiento sanger para las secuencias de la región promotora, con las registradas en el NCBI, puesto que el valor de E (Expect) al realizar el blast en el software virtual es un valor de 0.0 que corresponde según el propio NCBI a resultados mayores a $1/10^{-180}$ y un valor de $4e^{-71}$, el cual equivale $1/10^{-36}$ aproximadamente, lo cual nos indica que son especies relacionadas filogenéticamente.

Al comparar las secuencias obtenidas del secuenciamiento sanger de la región exón 1 con las registradas en el NCBI, para la variante albina y de la variante normal, no se encontraron diferencias significativas, ya que el valor de E dado por el propio NCBI, indica que son especies relacionadas filogenéticamente.

Se determino que los primers diseñados para parte de la región promotora y parte del exon1 son específicos para la especie diseñada (Trucha arcoíris), puesto que, al momento de visualizar el producto de amplificación en un gel de agarosa, se observan bandas nítidas sin “smearing” o chorreo, ni dímeros u otros productos que puedan dar a entender que no son específicos para la región diseñada.

VII RECOMENDACIONES

En este trabajo solo se ha desarrollado una extracción de ADN con un kit comercial, es conveniente desarrollar otros protocolos de extracción de ADN con otros kits comerciales, ello permitiría tener un espectro de protocolos, a fin de mejorar el producto de amplificación para los primers diseñados.

Se recomienda realizar el estudio a más variantes albinas, a fin de poder determinar más secuencias del gen de miostatina a fin de determinar si no existen variaciones con las especies de otros pisos altitudinales.

Se recomienda el uso de más de una empresa de secuenciamiento, debido a que los distintos protocolos de secuenciamiento que estas manejan, podría variar el resultado, lo que daría un espectro más amplio del análisis de los resultados, lo que podría identificar nuevas variantes.

Se recomienda realizar estudios similares en Truchas arcoíris en otros departamentos que posean un desarrollo acuícola para esta especie, para así poder tener una base de datos de estos organismos, con la finalidad de poder desarrollar un programa de mejoramiento genético, para generar una rentabilidad económica para estas regiones.

VIII REFERENCIAS

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., & Estrada, M. (2005). Myostatin Gene Silenced by RNAi Show a Zebrafish Giant Phenotype. *Journal of Biotechnology*, 119 (4), 31-304. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.04.023>
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 402 -3389. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Blast* NCBI. (s. f.). Blast NCBI. Recuperado 10 de enero de 2022, de https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- Bono, J., Olesnicky, E., & Matzkin, L. (2015). Connecting Genotypes, Phenotypes and Fitness: Harnessing the Power of CRISPR/Cas9 Genome Editing. *Molecular Ecology*, 24 (15), 22 - 810. <https://doi.org/10.1111/mec.132522>
- Campbell, N., & Narum, Sh. (2008) Identification of Novel Single Nucleotide Polymorphisms in Chinook Salmon and Variation among Life History Types, *Transactions of the American Fisheries Society*, 137(1), 96-106. <https://doi.org/10.1577/T07-011.1>
- Ministerio de la Producción - PRODUCE. (2016, octubre). *Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2015*. <https://sinia.minam.gob.pe/documentos/anuario-estadistico-pesquero-acuicola-2015>
- Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo (PROMPERÚ). (2020, septiembre). *TRUCHA (Oncorhynchus mykiss) (Trucha Arco iris, Salmon trout, Rainbow Trout, Nijimasu)*. <https://institucional.promperu.gob.pe/ContenidosFichas/asia-y-oceania/otok-ficha-mercado-japon-producto-trucha-2020.pdf>

Decreto Supremo N.º 002-2016, 02 de marzo del 2016, *Política Nacional Agraria*. Diario Oficial del Bicentenario El Peruano., 18 de marzo del 2016, pp. 581101- 581114.

Recuperado de <https://cutt.ly/AF0hgSE>

Delgado, I., Fuentes, E., Escobar, S., Navarro, C., Corbeaux, T., Reyes, A., Vera, M. I., Álvarez, M., & Molina, A. (2008). Temporal and Spatial Expression Pattern of the Myostatin Gene during Larval and Juvenile Stages of the Chilean Flounder (*Paralichthys adspersus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 151(2), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.07.003>

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>

Edvardsen, R. B., Leininger, S., Kleppe, L., Skaftnesmo, K. O., & Wargelius, A. (2014). Targeted mutagenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using the CRISPR/Cas9 system induces complete knockout individuals in the F0 generation. *PloS one*, 9(9), e108622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108622>

Elaswad, A., Khalil, K., Cline, D., Page-McCaw, P., Chen, W., Michel, M., Cone, R., & Dunham, R. (2018). Microinjection of CRISPR/Cas9 Protein into Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Embryos for Gene Editing. *Journal of Visualized Experiments*, 131. <https://doi.org/10.3791/56275>

FAO 2022. *Oncorhynchus mykiss*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Cowx, I. G. Fisheries and Aquaculture Division [online]. Rome. [Cited Saturday, May 28th, 2022].

https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/oncorhynchus_mykiss/en

- Garikipati, D. K., Gahr, S.A., & Rodgers, B.D. (2006). Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes. *J Endocrinol. Journal of Endocrinology* 190(3), 888 – 879. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06866>
- Grobet, L., Royo, L., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R., & Michel. G. (1997). A Deletion in the Bovine Myostatin Gene Causes the Double-Muscled Phenotype in Cattle. *Nature Genetics*, 15, 57–61. <https://doi.org/10.1038/ng0997-71>
- Gutierrez de Paula, T., Alves de Almeida, F., Carani. F., Vechetti-Júnior, J., Padovani, C.R., Simões, R. A., Assunção, E., Dos Santos, V.B., & Dal-Pai, M. (2014). Rearing Temperature Induces Changes in Muscle Growth and Gene Expression in Juvenile Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 169(1),31–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.12.004>
- Hanset, R., Michaux, C., Dessy-Doize, C., Burtonboy, G. (1982). Studies on the 7th Rib Cut in Double Muscled and Conventional Cattle. Anatomical, Histological and Biochemical Aspects. In: King, J.W.B., &F. Ménissier (Eds.), *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and its use to Improve Beef Production. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, (Vol 16, pp. 341–349). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-7550-7_30
- Haselkorn, R., Doudna, J., & Sternberg, S. (2018). A Crack in Creation: Gene Editing and the Unthinkable Power to Control Evolution. (Jennifer, D. & Samuel H. Sternberg) (Vol 32). <https://cutt.ly/4F0wNU3>
- Innis, M. A. & Gelfand, D. H. (1990). Optimization of PCRs, in *PCR Protocols: A Guide to*

- Methods and Applications. In Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., Innis, M. A., & White, H. (Eds.), Academic Press (pp. 3–12). [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(91\)90165-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(91)90165-5)
- Khalil, K., Elayat, M., Khalifa, E. *et al.* Generation of *Myostatin* Gene-Edited Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) via Zygote Injection of CRISPR/Cas9 System. *Sci Rep* **7**, 7301 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07223-7>
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T., & Bass, J. (1997). Mutations in Myostatin (GDF8) in Double-Muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Research*, *7*(9), 16 - 910. <https://doi:10.1101/gr.7.9.910>
- Karim, K., Elayat, Elsayed, M., Khalifa, S., Ahmed D., Miller, M., Abdelrahman, H., Ye, Z., Odin, R., Drescher, D., Vo, K., Gosh, K., Bugg, W., Robinson, D., & Dunham, R. (2017). Generation of Myostatin Gene-Edited Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*) via Zygote Injection of CRISPR/Cas9 System. *Scientific Reports*, *7*(7301). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07223-7>
- McPherron, A. C., Lawler, A., & Lee. S. (1997). Regulation of Skeletal Muscle Mass in Mice by a New TGF- β Superfamily Member. *Nature*, *387*(6628), 83–90. <https://doi.org/10.1038/387083a0>
- Mcpherron A. C, Lawer A. M, & Lee S.J. (1997). Double Muscling in Cattle Due to Mutations in The Myostatine Gene. *Proceedings Of the National Academy of Sciences*, *94*(23), 12457-12461. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12457>
- Mendoza, D. (2011). Informe de Panorama de la Acuicultura Mundial, America Latina y el Caribe y en el Perú. *Ministerio de la producción*. <https://cutt.ly/aF0fNDz>
- Nadjar-Boger, E., & Funkenstein, B. (2011). Myostatin-2 gene structure and polymorphism of the promoter and first intron in the marine fish *Sparus aurata*: evidence for DNA

duplications and/or translocations. *BMC genetics*, 12, 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-22>

NCBI - WWW Error Blocked Diagnostic. (s. f.-b). NCBI. Recuperado 7 de mayo de 2022, de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

OIE, (2011). Utilización de animals en la investigación y educación. Organización Mundial de Sanidad Animal. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/es_chapitre_1.7.8.htm#article_1.7.8.

Ortega, H., Hidalgo, M., Trevejo, G., Correa, E., Cortijo, A. M., Meza, V., & Espino, J. (2012). Lista anotada de los peces de aguas continentales del Perú: Estado actual del conocimiento, distribución, usos y aspectos de conservación. Ministerio del Ambiente, Dirección General de Diversidad Biológica - Museo de Historia Natural, UNMSM. https://museohn.unmsm.edu.pe/docs/pub_ictio/Ortega_et_al.2012Lista_Peces_Aguas_Cont.Peru.pdf

Østbye, T. K., Galloway, T. F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., & Andersen Ø (2001). The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *European journal of biochemistry*, 268(20), 5249–5257. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02456.x>

Primer3Plus - Pick Primers. (s. f.). Primer 3 Plus. Recuperado 7 de mayo de 2022, de <https://www.primer3plus.com>

QIAGEN CLC Genomics Workbench | QIAGEN Digital Insights. (s. f.). Bioinformatics Software and Services (CLC Genomics Workbench). Recuperado 7 de mayo de 2022, de <https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-clc-genomics-workbench/>

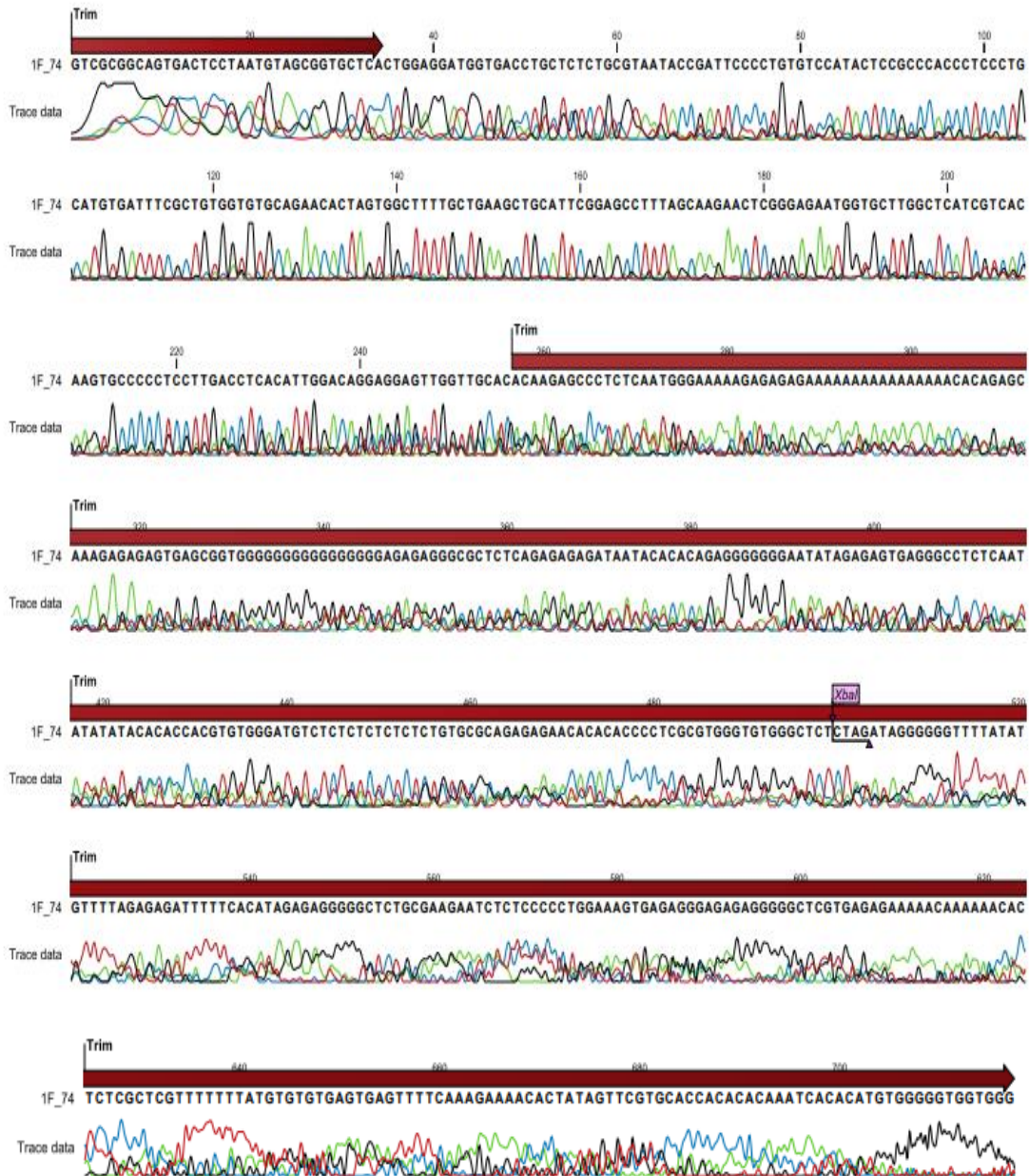
- Radaelli, G., Rowlerson, A., Mascarello, F., Patruno, M., & Funkenstein, B. (2003). Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. *Cell and tissue research*, 311(2), 239–250. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0668-y>
- Rainuzzo, J. (2020). La Cadena de Valor de La Trucha. *Programa Nacional de Innovación En Pesca y Acuicultura-PNIPA*, 1, 1-66. <https://hdl.handle.net/20.500.12864/194>
- Rescan, P. Y., Jutel, I., & Rallièrre, C. (2001). Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of experimental biology*, 204(Pt 20), 3523–3529. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.20.3523>
- Rodgers, B. D., Weber, G. M., Sullivan, C. V., & Levine, M. A. (2001). Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology*, 142(4), 1412–1418. <https://doi.org/10.1210/endo.142.4.8097>
- Reyes, M. A., & Rojas, N. J. (2014). Secuenciación y análisis del gen de la miostatina GDF 8 en búfalos de la raza murray y sus cruces para determinar la existencia de posibles mutaciones que se expresen en doble musculatura en el departamento de Antioquia [Tesis de Grado, Universidad de LaSalle]. Programa de Medicina Veterinaria. https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/237
- Rodgers, B. D., Roalson, E. H., Weber, G. M., Roberts, S. B., & Goetz, F. W. (2007). A proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 292(2), E371–E372. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00395.2006>
- Rychlik W, Spencer WJ, & Rhoads RE. (1990). Optimization of the annealing temperature for

- DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 12 – 6409.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Satoshi, A.& Kinoshita. M. (2014). Targeted Mutagenesis Using CRISPR/Cas System in Medaka. *Biology Open*, 3(5), 71-362. <https://doi.org/10.1242/bio.20148177>
- Sawatari, E., Ryoko, S., Tomoko, A., Hisashi, H., Susumu, U., Yuko, W., Takahiro, N., & Masato, K. (2010). Overexpression of the Dominant-Negative Form of Myostatin Results in Doubling of Muscle-Fiber Number in Transgenic Medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 155(2), 89 - 183.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.10.030>
- Thomas, K. R., & Capecchi. M. (1987). Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem Cells. *Cell*, 51(3), 12 – 503.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90646-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90646-5)PlumXMetric.
- Tm Calculator*. (s. f.). Tm Calculator - Thermo Fisher. Recuperado 1 de marzo de 2022, de <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>
- Torres, J. M. (2012). Caracterización y Expresión del Gen de Miostatina de Pargo Flamenco (Lutjanus guttatus) durante el Desarrollo Embrionario, Larvario y Juvenil. [Tesis De Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.]
<https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/154/1/Torres%20Velarde%200Julia%20Mar%C3%ADa.pdf>
- Torres, J. M. (2018). Silenciamiento génico de miostatina – 1 en tejido muscular de Lutjanus guttatus. [Tesis De Doctorado, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.] <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/1088>

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), 115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Varshney, G. K., Pei, W., LaFave, M. C., Idol, J., Xu, L., Gallardo, V., Carrington, B., Bishop, K., Jones, M., Li, M., Harper, U., Huang, S. C., Prakash, A., Chen, W., Sood, R., Ledin, J., & Burgess, S. M. (2015). High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Genome research*, 25(7), 1030–1042. <https://doi.org/10.1101/gr.186379.114>
- Yanhong, S., Yu, X., & Tong, J. (2012). Polymorphisms in Myostatin Gene and Associations with Growth Traits in the Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *International Journal of Molecular Sciences* 13(11), 14956–61. <https://doi.org/10.3390/ijms131114956>
- Xu, Ch., Wu, G., Zohar, Y., & Jun Du, Sh. (2003). Analysis of Myostatin Gene Structure, Expression and Function in Zebrafish. *Journal of Experimental Biology* 206 (22), 79 – 4067. <https://doi.org/10.1242/jeb.00635>
- Xu, L., Zhao, P., Mariano, A., & Han. R. (2013). Targeted Myostatin Gene Editing in Multiple Mammalian Species Directed by a Single Pair of TALE Nucleases. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2,112. <https://doi.org/10.1038/mtna.2013.39>
- Xu, X., Scott-Scheiern, T., Kempker, L. & Simons, K. (2007). Active Avoidance Conditioning in Zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.06.002>

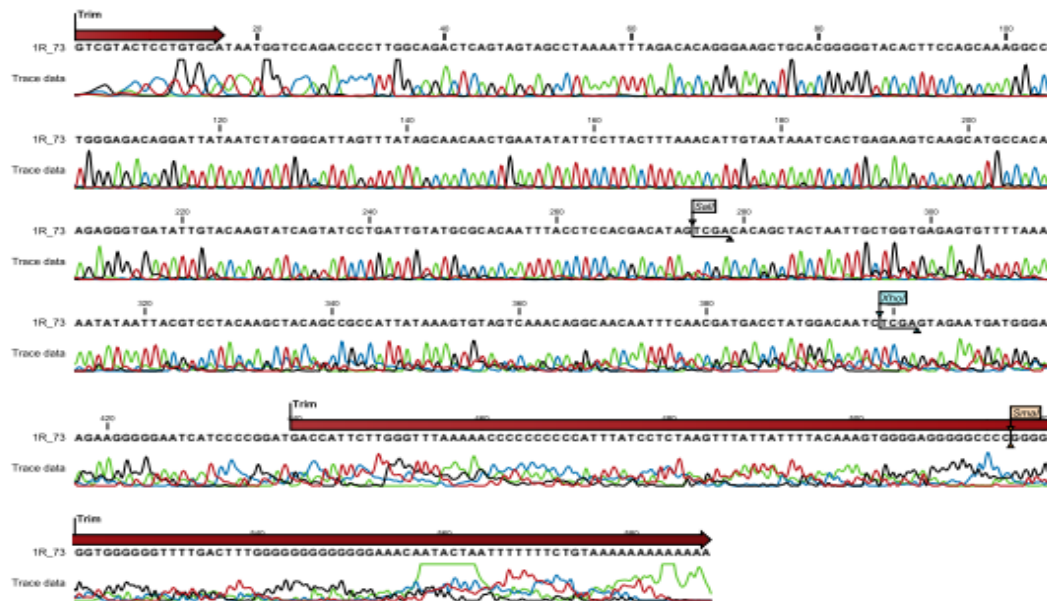
IX ANEXOS

Anexo 1

Cromatografía de la lectura 1F_74 (trucha albina primer prom 1a)

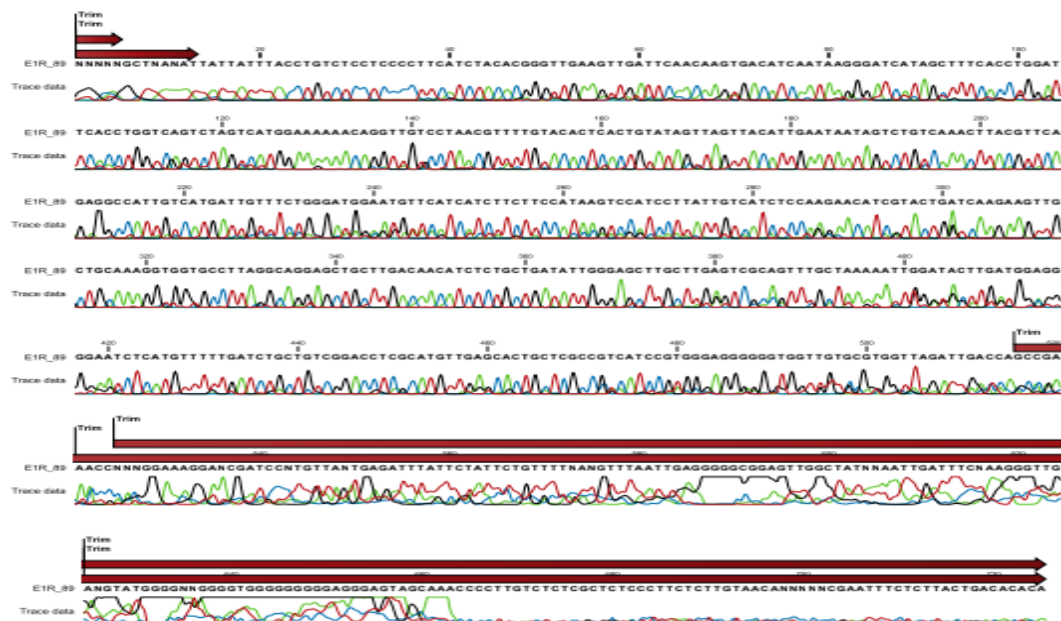
Anexo 2

Cromatografía de la lectura 1R_73 (trucha normal primer 1a)



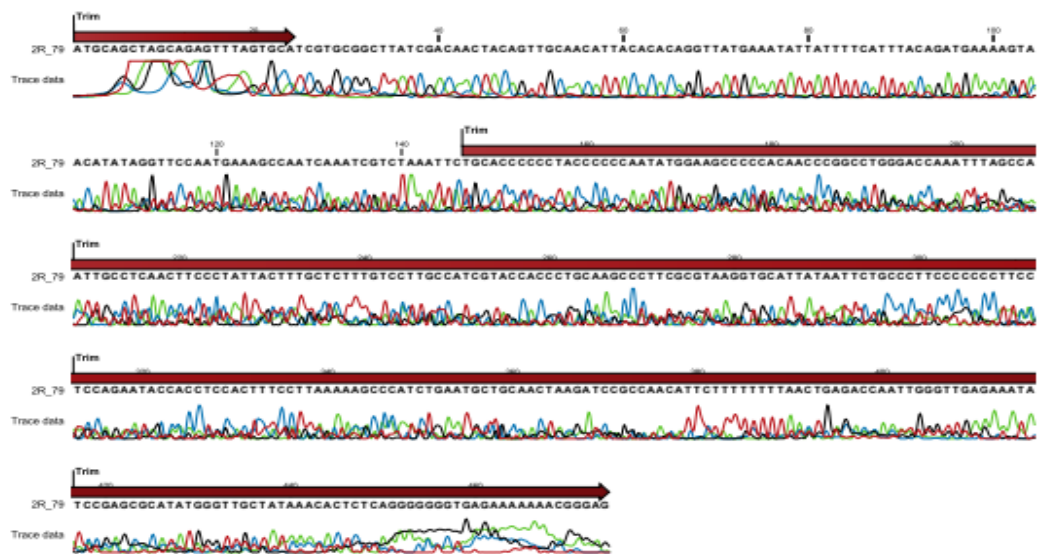
Anexo 3

Cromatografía de la lectura E1R_89 (trucha normal primer exón)



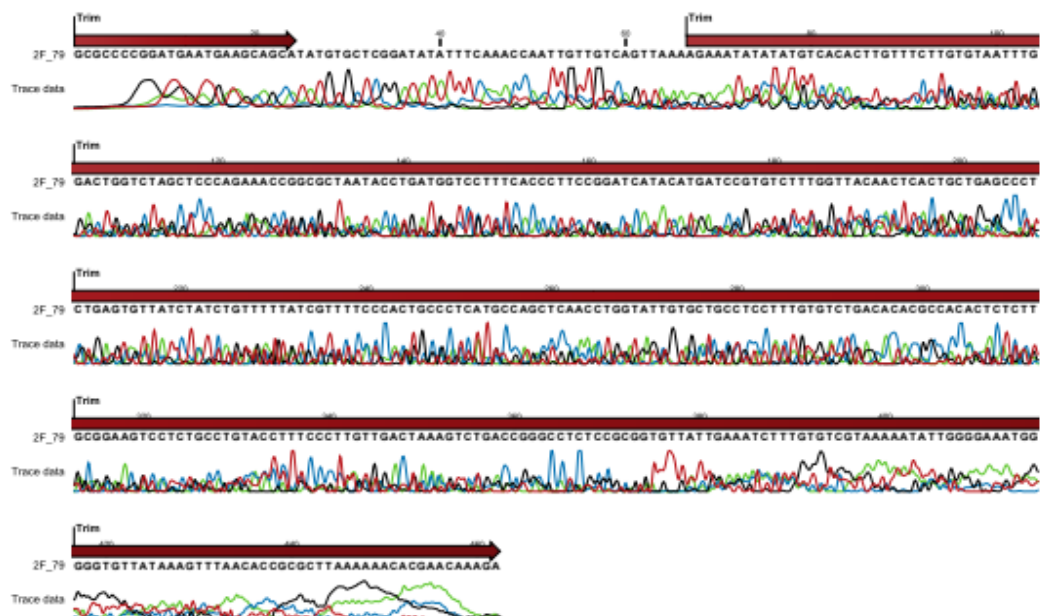
Anexo 6

Cromatografía de la lectura 2R_79 (trucha albina primer prom2b)



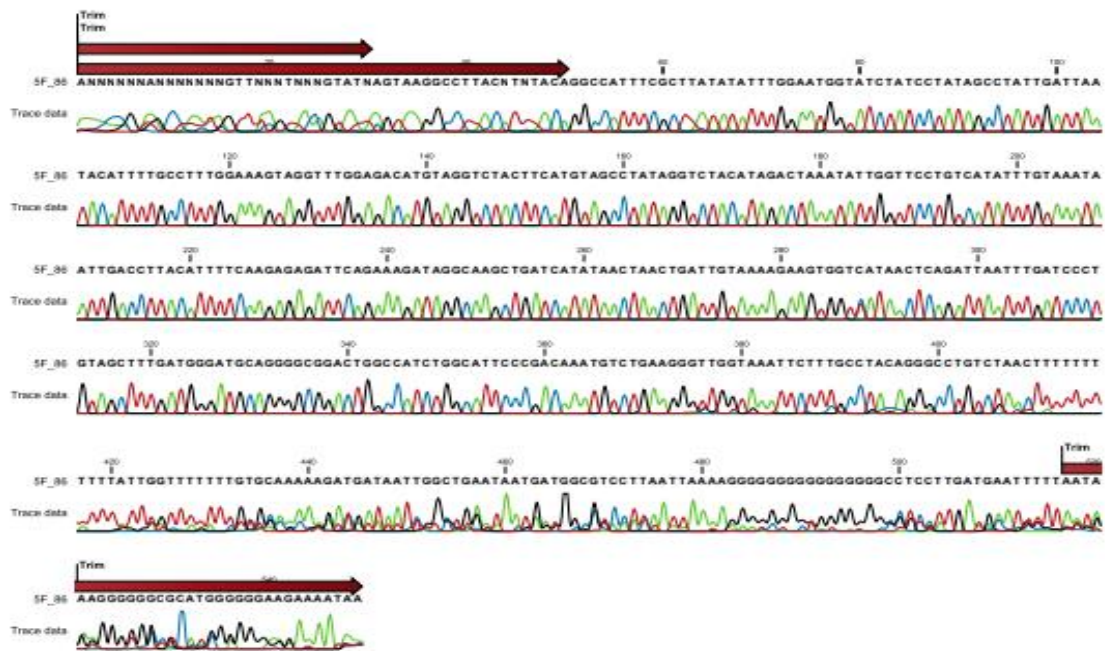
Anexo 7

Cromatografía de la lectura 2F_79 (trucha albina primer prom 2b)



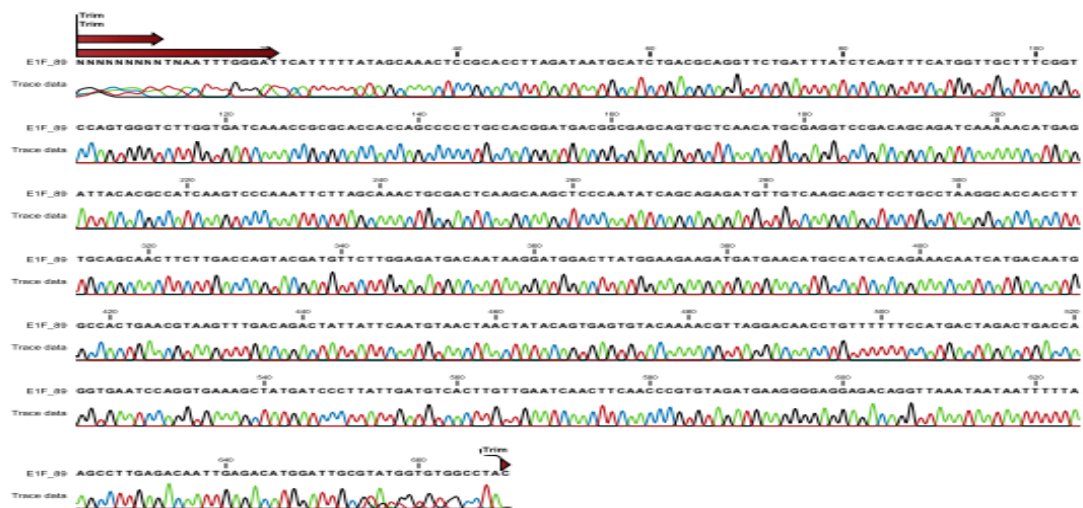
Anexo 12

Cromatografía de la lectura 5R_86 (trucha albina primer prom 3c)



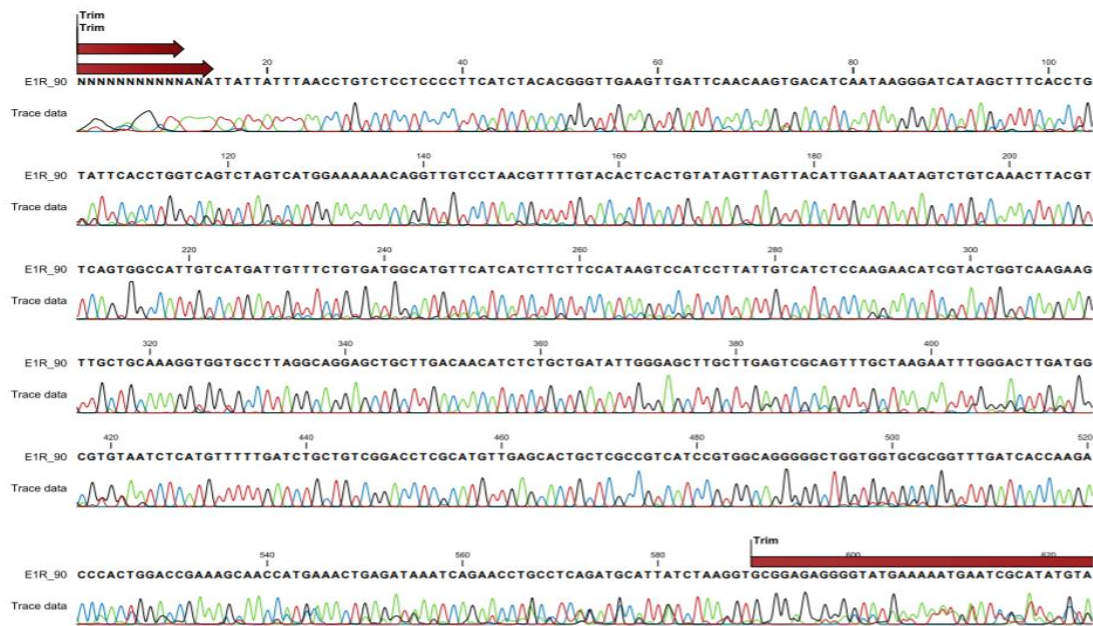
Anexo 13

Cromatografía de la lectura EIF_89 (trucha normal primer exón)



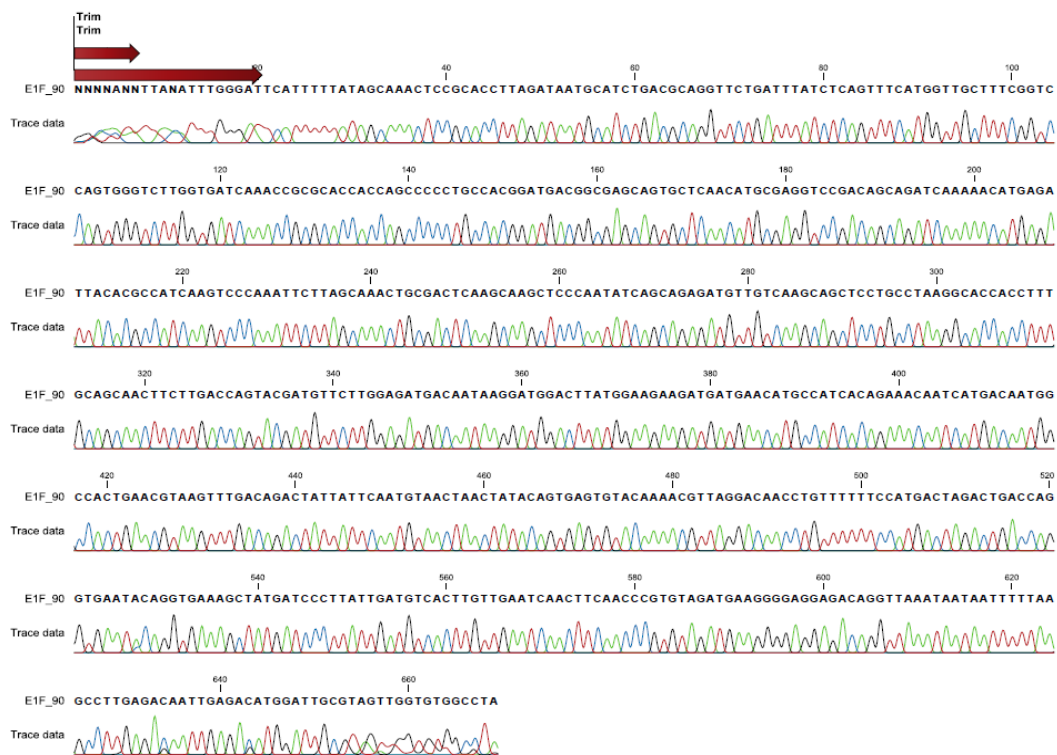
Anexo 14

Cromatografía de la lectura E1R_90 (trucha albina primer exón)



Anexo 15

Cromatografía de la lectura EIF_90 (trucha albina primer exón)



Anexo 16

Imagen de la especie Oncorhynchus mykiss

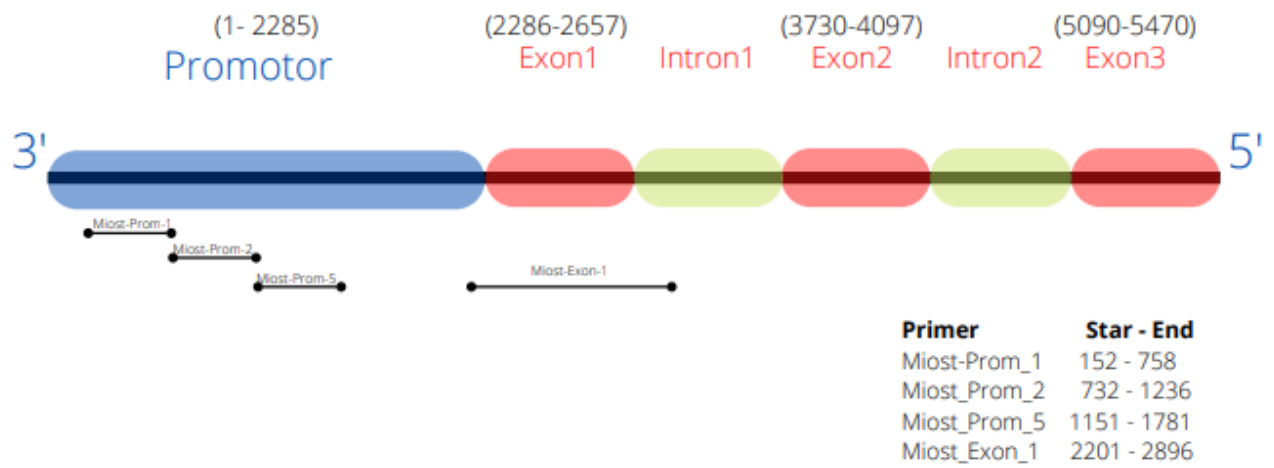
**Anexo 17**

Imagen de la especie Oncorhynchus mykiss (Variedad Albina)



Anexo 18

Representación grafica de regiones del promotor y exón secuenciados y analizados.



Anexo 19

Matriz de consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	METODOLOGIA
<p>SECUENCIA MIENTO Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR Y DEL EXON I DEL GEN DE MIOSTATINA ASOCIADO AL CRECIMIENTO O MUSCULAR EN DOS VARIETADES DE TRUCHA ARCOIRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS, WALBAUM 1792) DE LA REGIÓN JUNÍN – HUANCAYO</p>	<p>Los altos costos del alimento dentro del rubro acuícola disminuyen la rentabilidad y aumentan los costos del producto, se deben buscar alternativas que mejoren la rentabilidad de los cultivos acuícolas para obtener mejores resultados y aminorar el costo al consumidor final</p>	<p>Objetivos Objetivo General. Identificar, secuenciar y analizar molecularmente el promotor y el exón 1 del gen de la Miostatina de dos variedades de la trucha arcoíris (Onchorhynchus mykiss) de la región Junín – Huancayo. Objetivos Específicos. identificar y secuenciar una parte del promotor del gen de miostatina en la trucha arcoíris (Onchorhynchus mykiss) y su variedad albina o dorada. Identificar y secuenciar una parte del exón 1 del gen de miostatina en la trucha arcoíris (Onchorhynchus mykiss) y su variedad albina o dorada. Analizar la variabilidad de las secuencias amplificadas del promotor y del exón 1 del gen de miostatina en la trucha arcoíris (Onchorhynchus mykiss) y su variedad albina o dorada. Determinar la capacidad de amplificación de los primers diseñados para el promotor y el exón 1 del gen de Miostatina en la trucha arcoíris (Onchorhynchus mykiss) y su variedad albina o dorada.</p>	<p>Hipótesis nulas No se podrá secuenciar el promotor y el exón 1 del gen de la Miostatina en la trucha arcoíris (Onchorhynchus mykiss). El secuenciamiento nucleotídico del promotor y del exón 1 del gen de Miostatina en los individuos analizados de trucha arcoíris (Onchorhynchus mykiss) de la región Junín - Huancayo no presentan polimorfismo genético molecular. Hipótesis alternativas Se podrá secuenciar el promotor y el exón 1 del gen de la Miostatina en la trucha arcoíris (Onchorhynchus mykiss). El secuenciamiento nucleotídico del promotor y del exón 1 del gen de Miostatina en los individuos analizados de trucha arcoíris (Onchorhynchus mykiss) de la región Junín – Huancayo, al menos uno presenta polimorfismo genético molecular.</p>	<p>Tipo: Aplicada Tecnológica ámbito Temporal y Espacial Temporal: Se evaluó el gen de miostatina entre los periodos de Junio 2021 a Junio del 2022 ámbito Espacial: Se evaluó la secuencia del gen de miostatina en la trucha arcoíris y su variante albina obtenido en el LMGYRA de la UNFV población: Se trabajo con cuatro muestras de tejido de las aletas caudales de especímenes en estadio adulto de trucha arcoíris y su variedad albina criadas de la piscigranja Acuatrout SAC de la región Junín. técnicas e instrumentos: Extracción de ADN de tejido mediante gSYNC DNA Extraction Kit – GENEaid Amplificación mediante PCR Secuenciamiento análisis de datos en software de CLC Genomics Workbench (versión 3.6.5)</p>