



**FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS ALIMENTARIAS Y
ACUICULTURA**

UTILIDAD DE MICROSATÉLITES PARA FINES ACUÍCOLAS VARIABILIDAD
GENÉTICA EN DOS POBLACIONES TILAPIA GRIS *Oreochromis niloticus*
(Linnaeus, 1758) DE TARAPOTO Y HUACHO

Línea de investigación:

Desarrollo de productos de la acuicultura

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero Acuicultor

Autora:

Ramirez Huayhuas, Janet

Asesora:

Gamero Collado, Betty Eliseni
(ORCID: 0000-0002-6008-423X)

Jurado:

Zambrano Cabanillas, Abel Walter

Mogollón Ávila, Santos Valentín

Figueroa Vargas - Machuca, Manuel Eduardo

Lima - Perú

2021

Referencia:

Ramirez, J. (2021). *Utilidad de microsatélites para fines acuícolas variabilidad genética en dos poblaciones tilapia gris Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) de Tarapoto y Huacho* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5350>



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/>



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS
ALIMENTARIAS Y ACUICULTURA

UTILIDAD DE MICROSATÉLITES PARA FINES ACUÍCOLAS
VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS POBLACIONES TILAPIA GRIS
Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) DE TARAPOTO Y HUACHO

Línea de investigación:

Desarrollo de productos de la acuicultura

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero Acuicultor

Autora:

Ramirez Huayhuas, Janet

Asesora:

Gamero Collado, Betty Eliseni

(ORCID: 0000-0002-6008-423X)

Jurado:

Zambrano Cabanillas, Abel Walter

Mogollón Ávila, Santos Valentín

Figuerola Vargas - Machuca, Manuel Eduardo

Lima - Perú

2021

DEDICATORIA

*A DIOS, por la
fortaleza y sus bendiciones,
porque como lo prometió
nunca me dejó sola, su mano
guió mis pasos y me llevó a la
meta que anhele con el alma.
Suya es la vida, la sabiduría,
todo proviene de él*

*A mis amados
PADRES, Felipe y Marina,
quienes con su esfuerzo y
dedicación me han dado lo
mejor y me enseñaron que todo
se puede conseguir con mucho
esfuerzo y dedicación, y por ser
junto a mis hermanos, los
pilares que me apoyan siempre*

*A mi eterna compañera
de vida, Lisita; que desde el
cielo sé que está a mi lado,
velando por mi felicidad.*

A ti Carlos Miguel, *por
haberme enseñado el verdadero
valor de la libertad y a sonreír
con el alma, Gracias por llegar
a mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas que cooperaron con mi desarrollo profesional.

A mi coasesor, Daniel Saúl Oré Chávez por su gran apoyo académico.

A los miembros del Laboratorio de Sistemática Molecular y Fitogeografía, la Dra. Rina Ramirez y todo su equipo que dirige ella en su dirección, que me posibilitaron la cuantificación de ácidos nucleicos con el espectrofotómetro Nanodrop.

A mis amigos de la Universidad Agraria La Molina, Richard Estrada Cañari de la Facultad de Ciencias e Ingris Estrella Izarra Apaza de la Facultad de Pesquería ambos pertenecientes al Círculo de investigación en Ecología Molecular y Genómica evolutiva, que aportaron significativamente en la elaboración de la tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad Acuática a quienes tuve la oportunidad de conocer y que me apoyaron poniendo su valioso granito de arena durante la realización de mi tesis: Renato La Torre, un excelente amigo y a quien le estoy muy agradecida por toda su colaboración que me brindó en aprender las técnicas moleculares. A Mariela Carrasco, A mi hermana del alma Heyli, siempre sacándome una sonrisa y dándome ánimos para continuar aun cuando no se lograba los resultados, ahí mi amiga con su apoyo, A Fiorella., A Renzo, A Bryan a todos los que contribuyeron con este proyecto que me dejó muchas enseñanzas de vida, por todo el sacrificio, noches de desvelo, valió la pena no solo porque con esfuerzo logré terminar con éxito mis objetivos sino

porque compartí momentos únicos con todos. Gracias por esos días que compartimos juntos.

A mi Asesora la Blga. Betty Gamero Collado – UNFV por toda la cooperación brindada, por depositar su confianza en mí, por sus enseñanzas, porque sabe escuchar, por esa presión que de alguna u otra manera sirvió para que se llevara a cabo la sustentación de esta tesis.

A mí amada Escuela que me enseñó más que nociones teóricas y prácticas, la esencia de mi profesión.

A todos aquellos profesores y amigos que de una u otra manera me dieron consejos y ánimos para seguir adelante. Muchas gracias a ellos también.

Y finalmente a la colaboración del personal de la Estación Piscícola Santa Eulalia (EPSE) en la obtención y traslado de las muestras biológicas para la realización de mi tesis.

ABREVIATURAS

- A: Número de alelos
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AR: Media de número de alelos
- APS: Persulfato de Amonio
- AT: Número total de alelos
- cm: Centímetro
- CTAB: Bromuro de Cetil Trimetil Amonio
- EDTA: Ácido Etileno Diamino Tetra acético
- FD: Factor de Dilución
- FIS: Coeficiente de endogamia
- FST: Índice de fijación
- g: Gramo
- H2O mili-Q: Agua ultra pura: destilada, auto clavada
- ha: Hectárea
- Ho: Heterocigosidad observada
- He: Heterocigosidad esperada
- kg: Kilogramo
- km: Kilometro
- MgCl₂: Cloruro de Magnesio
- mm: Milímetro
- min: Minuto
- mM: Milimolar
- m.s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar

- ng: Nanogramos
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- pb: Pares de bases
- ppm: Partes por millón
- PIC: Contenido de información polimórfica
- rpm: Revoluciones por minuto
- s: Segundo
- SSR: Secuencias Simples Repetidas
- Tm: Temperatura de melting (°C)
- TEMED: Tetrametiletilendiamina
- TBE: Tris Borato EDTA
- Tris Base: Tris Hidroximetil Amino Metano
- Taq: Thermus aquaticus Enzima termoestable
- Vis/UV: Luz ultravioleta visible
- µl: Microlitro
- µM: Micromolar

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	IV
ABREVIATURAS	VI
INDICE DE CONTENIDO	VIII
ÍNDICE DE TABLA	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Descripción y formulación del problema.....	3
1.1.1. Descripción del problema	3
1.1.2. Problema principal	4
1.1.3. Problemas secundarios.....	4
1.2. Antecedentes	5
1.3. Objetivos	8
1.3.1. Objetivo general.....	8
1.3.2. Objetivos específicos	8
1.4. Justificación	8
1.5. Hipótesis	9
II. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Bases teóricas del tema de investigación	10
2.1.1. Sistemática	10
2.1.2. Distribución geográfica.....	10
2.1.3. Morfología	11
2.1.4. Alimentación.....	12
2.1.5. Hábitat	12
2.1.6. Reproducción	12
2.1.7. Generalidades del cultivo de tilapia	13
2.1.8. Acuicultura Mundial y Nacional de Tilapia	15
2.1.9. Marcadores moleculares	18
2.1.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
2.1.11. Microsatélites.....	20

2.1.12. Influencia de los factores genéticos en la Tilapia	27
2.1.13. Análisis de la variabilidad genética	28
2.1.14. Importancia de la variabilidad genética	29
2.1.15. Diversidad genética.....	30
III. MÉTODO.....	33
3.1. Tipo de investigación.....	33
3.2. Ámbito temporal y espacial	33
3.3. Variables	33
3.4. Población y muestra.....	33
3.5. Instrumentos.....	33
3.5.1. Materiales.....	33
3.5.2. Equipos	34
3.5.3. Reactivos.....	35
3.6. Procedimientos.....	37
3.6.1. Obtención de alevinos y transporte.....	37
3.6.2. Colectas de muestras biológicas.....	38
3.6.3. Ubicación geográfica de las muestras analizadas	39
3.6.4. Extracción de ADN.....	40
3.6.5. Amplificación de los marcadores microsatélites.....	43
3.7 Análisis de datos	48
3.7.1 Análisis de diversidad genética.....	48
IV. RESULTADOS.....	49
4.1. Extracción de ADN.....	49
4.2. Estandarización de la amplificación de los marcadores UNH 222, UNH 138, y UNH 1004.....	50
4.3. Genotipado de marcadores microsatélites (citación)	53
4.3.1. Amplificación del marcador microsatélite UNH 138 para la población de Huacho	53
4.3.2. Amplificación del marcador microsatélite UNH 222 para la población de Huacho	54
4.3.3. Amplificación del marcador microsatélite UNH 138 para la población de Tarapoto	55
4.3.4. Amplificación del marcador microsatélite UNH 222 para la población de Tarapoto	55
4.4. Cálculo del Índice Polimórfico	56
4.5. Estimadores estadísticos de diversidad genética en las poblaciones de Tilapia	56
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	59
VI. CONCLUSIONES	63

VII. RECOMENDACIONES	64
VIII. REFERENCIAS	65
IX. ANEXOS	77
ANEXO A.....	77
ANEXO B.....	80
ANEXO C.....	82
ANEXO D.....	85
ANEXO E.....	86

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1.	
<i>Características de diversos marcadores de ADN nuclear.....</i>	23
Tabla 2.	
<i>Tipos de microsatelites</i>	24
Tabla 3.	
<i>Microsatélites para Oreochromis niloticus</i>	44
Tabla 4.	
<i>Índices polimórficos de los marcadores UNH 138 y UNH 222 en las poblaciones de Huacho. y Tarapoto.....</i>	56
Tabla 5.	
<i>Estadísticos de data genotípica: Análisis locales</i>	57
Tabla 6.	
<i>Estadísticos de data genotípica: Análisis Globales</i>	58
Tabla 7.	
<i>Biometría de la población de tilapias (O. niloticus) de Huacho-Lima.....</i>	77
Tabla 8.	
<i>Biometría de la población de tilapias (O. niloticus) de Tarapoto-San Martin.</i>	79
Tabla 9.	
<i>Concentraciones y purezas - diluciones de los ADNs obtenidos con el método Salting Out modificado para la población de Huacho.</i>	80
Tabla 10.	
<i>Concentraciones y purezas - diluciones de los ADNs obtenidos con el método Salting Out modificado para la población de Tarapoto.</i>	81
Tabla 11.	
<i>Genotipado de los marcadores UNH 138 para la población de Huacho (NI-N30, Individuos de Huacho)</i>	82
Tabla 12.	
<i>Genotipado de los marcadores UNH 138 para la población de Tarapoto (NI-N30, individuos de Tarapoto)</i>	82
Tabla 13.	
<i>Genotipado de los marcadores UNH 222 para la población de Huacho (NI-N30, Individuos de Huacho).....</i>	83
Tabla 14.	
<i>Genotipado de los marcadores UNH 222 para la población de Tarapoto (NI-N30, Individuos de Tarapoto).....</i>	83
Tabla 15.	
<i>Frecuencias alélicas de los marcadores UNH 138 y UNH 222 en las poblaciones de Huacho y Tarapoto.....</i>	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología externa de la tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	11
Figura 2. Producción global acuícola de tilapia, con precios de importación de los Estados Unidos filete congelado	16
Figura 3. Esquema general del PCR	20
Figura 4. Ejemplo de un microsatélite puro di-nucleótido	21
Figura 5. Detección de polimorfismo utilizando análisis de microsatélites	22
Figura 6. Muestras de tejido almacenadas en alcohol de 96 °	39
Figura 7. Ubicación Geográfica de la Piscigranja “El Gran Paso” - Tarapoto, Granja Acuícola ACUAAHURA S.A.C. y Estación Piscícola Santa Eulalia – UNFV	40
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %	42
Figura 9. Cuantificación del ADN	43
Figura 10. Electroforesis del ADN extraído de 30 individuos colectados provenientes de una población de Huacho	49
Figura 11. Electroforesis del ADN extraído de 30 individuos colectados provenientes de una población de Tarapoto.....	50
Figura 12. Estandarización del marcador UNH 222, bajo diversas concentraciones de MgCl (1,5 mM, 2 mM, 2.5 mM, y 4 mM) de 4 muestras de las poblaciones de Tilapia	51
Figura 13. Estandarización del primer UNH 138, bajo diversas concentraciones de MgCl bajo diversas concentraciones de MgCl (1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, y 3.5 mM) de 4 muestras de las poblaciones de Tilapia.....	51
Figura 14. Electroforesis en gel de acrilamida para el Marcador UNH 1004 con Gradiente de Temperatura 50 - 54 °C. Gel denaturante de 6 %, 1 hora de corrida a 300 voltios con tinción de nitrato de plata.....	52
Figura 15. Electroforesis en gel de acrilamida para el Marcador UNH 1004 con Gradiente de Temperatura 55 - 59 °C. Gel denaturante de 6 %, 1 hora de corrida a 300 voltios con tinción de nitrato de plata.....	52
Figura 16. Electroforesis en gel de acrilamida para el Marcador UNH 138 para la población de Huacho	53
Figura 17. Electroforesis en gel de acrilamida para el Marcador UNH 222 para la población de Huacho	54
Figura 18. Electroforesis en gel de acrilamida para el Marcador UNH 138 para lo población de Tarapoto	55
Figura 19. Electroforesis en gel de acrilamida para el Marcador UNH 222 para lo población de Tarapoto	55
Figura 20. Equipo de electroforesis vertical CBS Scie.....	85

RESUMEN

La tilapia es una de las especies más cultivadas en el mundo por sus características de rápido crecimiento, su alta tasa de desove y su resistencia al estrés. En los años 1980 se desarrollaron nuevas variedades de tilapias las cuales fueron producidas por el entrecruzamiento de especies. Sin embargo, en los últimos años ha ocurrido una sobreproducción ocasionando problemas como una alta densidad poblacional, pérdida de tamaño de la progenie, y alta homocigosis. Ante ello, las técnicas moleculares basadas en los marcadores moleculares son eficientes para monitorear la variabilidad genética. Los microsatélites (SSR) son marcadores moleculares que desempeñan un papel importante en la investigación de la población y la genética ecológica. En este presente estudio se amplifica dos SSR (UNH 138 Y UNH 222) para dos granjas acuícolas peruanas (Huacho y Tarapoto), y como resultado se obtuvo dos loci con un índice de PIC que los calificaba como medianamente polimórficos. Se obtuvo el estimador estadístico F_{st} (0,08 y 0,14 para UNH 138 y UNH 222 respectivamente) , con ello se encontró muy poca diferenciación genética entre estas poblaciones, además por el índice F_{is} ($F_{is} = 0,75$ para UNH 138 y $F_{is} = 0,99$ para UNH 222) se encontró altas dosis de endogamia, lo que concuerda con sus ratios altos de homocidad observada e intrapoblacional y por último con niveles bajos de heterocidad (0,49 para Huacho y 0,41 para Tarapoto) , estos indicadores son atribuidos al apareamiento entre familiares de estas poblaciones muy pequeñas. En conclusión, se encontró muy poca variación intra e interpoblacional y se rechaza la idea de que estas poblaciones de estos centros podrían albergar subpoblaciones. Ante ello es necesario diseñar estrategias de conservación genética para evitar la alta homocigosis en estas poblaciones que pueda repercutir en esta especie a futuro.

Palabras claves: Tilapia, SSR, diversidad estructural, genética poblacional.

ABSTRACT

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the most cultivated species in the world for its fast-growing characteristics, its high spawning rate and its resistance to stress. In the 1980s new species of tilapia developed which were produced by the interbreeding of species; for example, *O. rocky mountain*, this is a hybridization of the species *O. aureus* and *O. niloticus*. However, in recent years overproduction has occurred causing problems such as high population density, loss of progeny size, and high homozygosity. Given this, molecular techniques based on molecular markers are efficient for monitoring the genetic variability of tilapia populations. Microsatellites (SSRs) are molecular markers that play an important role in population research and ecological genetics, although high development effort and genotyping are a technical limitation. In this present study, two SSRs (UNH 138 and UNH 222) were amplified for two Peruvian aquaculture farms (Huacho and Tarapoto), and as a result, two loci were obtained with a PIC index that classified them as moderately polymorphic. The statistical estimator F_{st} (0,08, and 0,14 for UNH 138 and UNH 222 respectively) was obtained, with this, very little genetic differentiation was found between these populations, also due to the F_{is} index ($F_{is} = 0,75$ for UNH 138 and $F_{is} = 0,99$ for UNH 222) it was found high doses of population inbreeding, which is consistent with their high ratios of observed and intra-population homogeneity, and finally with low levels of heterogeneity (0,49 for Huacho and 0,41 for Tarapoto), these indicators are attributed to mating between relatives of these very small populations. In conclusion, very little intra-population and inter-population variation was found, and the idea that these populations in these centers could harbor sub-populations is rejected. Given this, it is necessary to design genetic conservation strategies to avoid high homozygosity in these populations that may affect this species in the future.

Keywords: Tilapia, SSR, diversity population, genetic structure.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de la acuicultura a nivel mundial aporta de manera importante para cubrir las demandas de peces y otros organismos acuáticos destinados al consumo humano. La producción piscícola mundial está sustentada por organismos dulceacuícolas principalmente. (FAO, 2000).

En este sentido, el cultivo de tilapias es una fuente muy importante de proteínas y de mejora económica en los países de crecimiento menos acelerado. (Fitzsimmons, 2000).

Actualmente dado el panorama de producción; las tilapias han adquirido más importancia, específicamente la tilapia nilótica. El cultivo de tilapia ha crecido de manera significativa en el mundo, y el desarrollo de la tecnología avanza a pasos agigantados, esto se debe a la aceptación de esta especie en el mercado internacional, principalmente en los Estados Unidos. (Fitzsimmons, 2004).

La acuicultura de la tilapia en nuestro país es aún incipiente, para el grado de avance que muestran otros países latinoamericanos, como Brasil, Colombia y Ecuador, entre otros. Actualmente Ecuador, Costa Rica y Honduras, ocupan los primeros lugares en abastecimiento de filete fresco de tilapia a Estados Unidos, siendo este un mercado potencial para los productores de tilapia. (Baltazar y Palomino, 2004).

El cultivo de la tilapia depende de un adecuado manejo, alimentación y calidad genética que garantice las condiciones de rendimiento y adaptación. (Ruiz, 2012).

Una de las estrategias biotecnológicas que está contribuyendo, de gran manera, en el proceso de selección, mejoramiento y consolidación de las características genéticas de especies de interés productivo es la que nos brinda los marcadores moleculares con sus diversas aplicaciones. Estos marcadores permiten indicar la presencia de variantes alélicas producto de alguna mutación en las poblaciones a través del tiempo. Esta variabilidad es conocida como polimorfismo puesto que permite separar grupos, poblaciones, especies, etc.

Es por ello que estos marcadores moleculares deben tener características ideales como ser neutros y altamente polimórficos para poder identificar diferencias en el número de repeticiones para cada variante de los alelos. (Perales *et al.*, 2003).

Dentro de estos marcadores moleculares recomendados para evaluar las diferencias genéticas en poblaciones se encuentran los microsatélites de ADN, puesto que contienen un número de nucleótidos que se repiten en el tándem, y cuyos resultados son visualizados en geles de agarosa de alta resolución, geles de poliacrilamida y en ultimadamente en secuenciadores de ADN. Estos marcadores, lograron una revolución en el estudio de la genética animal en lo relacionado con la variabilidad genética, entrecruzamiento, asignación de parentesco identificación de especies y líneas. (Castillo *et al.*, 2011).

Un claro ejemplo de ello es en el estudio genético de poblaciones en peces, ya que toma una relevancia debido al impacto que causa a nivel productivo, siendo la variabilidad genética el recurso básico de cualquier programa exitoso. (Allendorf *et al.*, 1987).

Además del conocimiento genético que provee estos marcadores para incrementar la producción en los cultivos, a la vez que puede influir en la solución de situaciones, por ejemplo; en las actividades acuícolas, es común la producción de semilla propia y su uso en nuevas etapas de producción. Esta práctica conlleva a que una población cultivada incrementa con el tiempo la frecuencia de genes relacionados a caracteres adversos a la productividad, lo que se denomina el incremento de consanguinidad. En términos genéticos, la continua práctica de cruzamientos consanguíneos conduce al incremento de la homocigosidad y pérdida de diversidad genética. (Allendorf *et al.*, 1987).

Los microsatélites en los últimos diez años han cobrado importancia en mejorar las estrategias en la producción acuícola, esto debido a su alto nivel de polimorfismo, carácter codominante, facilidad de aplicación, alta reproducibilidad y son ampliamente utilizados en diversos estudios de poblaciones debido a que estos marcadores son muy informativos en la

identificación de individuos estrechamente relacionados, clones o cultivares. (Perales *et al.*, 2003).

En base a los microsatélites UNH 138, UNH 222, UNH 1004 se analizaron dos poblaciones de *O. niloticus* de Huacho y Tarapoto que se encuentran en la Estación Piscícola Santa Eulalia (EPSE) lo que será de gran utilidad en la descripción y diferenciación de poblaciones de tilapia nilótica.

Además, permitirá evaluar su dirección de cambios genéticos que se producen cuando se aplica programas de selección para mejoramiento genético.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la variabilidad genética de la especie *O. niloticus* mediante marcadores microsatélites en dos poblaciones de cultivo de tilapia gris de la Estación Piscícola Santa Eulalia que servirán de base científica para futuros programas de mejora genética.

1.1. Descripción y formulación del problema

1.1.1. Descripción del problema

En el Perú, la evaluación de la variabilidad genética se viene implementado en actividades pecuarias y agrícolas, como, por ejemplo, en la evaluación de poblaciones de bovinos criollos para uso potencial en programas de mejoramiento genético, y en la identificación del grado de diversidad genética de papas nativas (*Solanum spp*) conservadas en cultivos nativos. (Soto *et al.*, 2014).

Sin embargo, la variabilidad genética no está siendo analizada en centros acuícolas, por lo que mayormente se consideran los caracteres fenotípicos al realizar la selección de las especies a cultivar.

Por ejemplo, en la crianza de tilapia gris, segunda especie dulceacuícola más cultivada, no se viene evaluando la variabilidad genética como parte de la estrategia de

cultivo, sabiendo que este es uno de los factores importantes tanto para la implementación de programas de mejoramiento genético como para el incremento de la producción de tilapias en el Perú.

Ante esto, la problemática del presente trabajo de investigación pretende analizar la variabilidad genética de dos poblaciones de cultivo de tilapia gris procedentes de Tarapoto y Huacho que se encuentran en la Estación Piscícola Santa Eulalia (EPSE) a través de marcadores microsatélites que han demostrado ser muy eficientes para el análisis genético de poblaciones en cultivo y/o poblaciones naturales.

En tal sentido se formula el siguiente problema para la investigación.

1.1.2. *Problema principal*

- Se desconoce el nivel o grado de diversidad genética de las poblaciones cultivadas de Tilapia en nuestro país.

1.1.3. *Problemas secundarios*

- ¿Se podrá emplear marcadores microsatélites usados en otros países para poblaciones peruanas de Tilapia?
- ¿Estos marcadores microsatélites ofrecen la utilidad para determinar variabilidad genética y permiten estimar diversidad genética de Tilapia en el Perú?
- ¿Existe un marcado nivel de endogamia en las poblaciones de tilapia gris de Huacho y Tarapoto?

1.2. Antecedentes

Históricamente en la acuicultura se ha aplicado por mucho tiempo la selección y mejora de diferentes especies basándose en el fenotipo. Sin embargo, actualmente, se ha ido desarrollando una serie de técnicas moleculares que han permitido conocer la información genética que poseen los organismos; esta tecnología es conocida como marcadores moleculares que están siendo utilizados en estudios de genética humana, vegetal y animal; y que dentro de su clasificación encontramos a los marcadores moleculares microsatélites cuya aplicación en el cultivo de tilapias ha logrado ser muy eficiente, tal como se presentan a continuación:

Dentro de los primeros estudios de microsatélites tenemos a Kocher *et al.* (1998), elaboraron los mapas de ligamiento genético parciales de dos especies de tilapia, *Oreochromis aureus* y *Oreochromis niloticus* utilizando una población de retro cruzamiento interespecífico, basados en marcadores de microsatélites. El mapa de ligamiento de *O. aureus* compone 28 marcadores en 10 grupos de ligamiento y se cubrió 212,8 cm. y los marcadores fueron asignados a cuatro grupos de ligamiento en un mapa de ligamiento *O. niloticus* que cubre 40,6 cm. Estos resultados revelaron un alto grado de conservación entre los grupos de enlace definidos en *O. aureus* y el mapa de ligamiento genético de *O. niloticus*.

Briñez *et al.* (2011), analizaron la diversidad genética de seis poblaciones de tilapia híbrida roja, con el propósito de evaluar el beneficio potencial de un futuro programa de reproducción realizado en el Centro de Investigación para la Acuicultura (CENIACUA), Colombia.

Carleton *et al.* (2002), desarrollaron marcadores de microsatélites tipo (CA)_n para los peces cíclidos, *Oreochromis niloticus* usando una variación del método de captura magnética de híbridos, así mismo la genoteca genómica resultante fue altamente

enriquecida en ADN repetitivo con un 96% de los clones que contienen CA, que fueron utilizadas para diseñar cebadores que demostraron la importancia de reducir al mínimo de número de ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de amplificación antes y después de las etapas de enriquecimiento, con el objetivo de reducir la recombinación PCR y la generación de clones quiméricos.

Rutten *et al.* (2004), caracterizaron genéticamente a cuatro líneas domesticadas de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando 14 marcadores microsatélites y 64 individuos los cuales pertenecen a las siguientes líneas, Chitralada (AIT), Centros de Investigación de Desarrollo Internacional (IDRC), la línea GIFT (5^a generación), y la línea Gott. Los resultados de la caracterización del número promedio de alelos por marcador fueron 5,0 (Gott), 5,4 (AIT), 5,6 (IDRC) y 7,5 (GIFT), los alelos privados se encontraron en todos los marcadores, con la excepción de dos, así también la diferenciación de la población, FST, fue 0,17 (alta variación genética), el nivel esperado de heterocigosidad que osciló entre 0,624 a la 0,711, además del nivel observado de heterocigosidad que se desvió significativamente con respecto al nivel esperado en tres líneas. Esto fue probablemente debido al pequeño tamaño de la población. En conclusión, la aplicación del enfoque Weitzman mostró que todas las líneas tienen un valor añadido para la diversidad genética total y, por tanto, deben seguir aplicándose.

Moreira *et al.* (2007), evaluaron la variabilidad genética de las dos cepas de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), Chitralada y Red Stirling, y sus descendientes sometidos a programas de mejora genética en los sistemas de agricultura intensiva a través de marcadores de microsatélites.

Panarari *et al.* (2008), afirmaron que existe una gran variedad de marcadores moleculares, los cuales permiten el análisis de regiones de ADN nuclear (RAPDs, microsatélites, etc.) y mitocondrial (ADNmt), así como de regiones de ARN.

Torres *et al.* (2010), desarrollaron ensayos para caracterizar con marcadores moleculares a la tilapia roja (*Oreochromis sp.*), utilizando la técnica RAPD para el estudio de la diversidad genética de ésta especie, en cinco piscícolas del Valle del Cauca (Colombia) y en la determinación del nivel de introgresión de las especies parentales *Oreochromis mosambicus*, *O. niloticus* y *O. aureus.*, Los resultados obtenidos fueron valores de heterocigosidad esperada (0,196 a 0,256) y la estructura genética ($G_{st} = 0,22$) para *Oreochromis sp.*, que indicaron un elevado grado de polimorfismo y una alta estructuración genética.

Satriani *et al.* (2015), realizaron una investigación para evaluar el impacto del programa de selección de familias de algunos rasgos muy económicos en su variabilidad genética; haciendo uso de marcadores moleculares microsatélites; para el estudio utilizaron 180 muestras de la quinta generación de la tilapia del Nilo, siendo seleccionados para la variabilidad genética en tres loci de microsatélites (UNH 123, UNH 172 y UNH 216). Y cuyos resultados mostraron que la cantidad de variabilidad genética en la quinta generación de la tilapia del Nilo a partir de tres líneas osciló entre el 33 % y el 100 % y la relación de más alta distancia genética entre familias fue 0,3875. Esta investigación comprobó que las hembras y los machos emitidos desde cada familia que tiene más cantidad de variabilidad genética y mayor distancia para otros podrían ser considerados como materiales genéticos para producir la próxima generación.

Por último tenemos Días *et al.* (2016) realizaron un estudio de cuatro cepas de tilapia del Nilo - UFLA, GIFT, Chitralada y Red-Stirling que se caracterizaron genéticamente utilizando 10 loci microsatélites no codificantes y dos microsatélites localizados en el promotor además del primer intrón de la hormona del crecimiento (GH), estos microsatélites del gen de la hormona de crecimiento fueron identificados en las posiciones - 693 a - 679 en el promotor [motivo (ATTCT)₈] y en el intrón 1 en las

posiciones + 140 a + 168 [motivo (CTGT)7]. Así también la cepa UFLA se caracterizó genéticamente por primera vez y, debido a su origen único y distinción genética, puede llegar a ser un recurso importante para el mejoramiento genético de la tilapia del Nilo.

1.3. Objetivos

1.3.1. *Objetivo general*

- Evaluar la variabilidad genética de dos poblaciones cultivadas de tilapia gris provenientes de Tarapoto y Huacho mantenidas en la Estación Piscícola Santa Eulalia usando tres microsatélites UNH 138, UNH 222, y UNH 1004.

1.3.2 *Objetivos específicos*

- Optimizar la metodología para la amplificación de los microsatélites UNH 138, UNH 222 Y UNH 1004 para poblaciones de Tarapoto y Huacho.

- Estimar la diversidad genética de las poblaciones de Tarapoto y Huacho mediante marcadores microsatélites.

1.4 Justificación

Nuestro país cuenta con un alto potencial acuícola basado en sus condiciones climáticas e hidrológicas y en la variedad de especies que posee. Ante ello, se está desarrollando el Plan Nacional de Desarrollo Acuícola 2010 - 2021 que busca promover la competitividad de esta actividad. Adicional a ello el gobierno firmó préstamos para mejorar la inversión en innovación para el desarrollo de tecnologías.

Entre estas tenemos el potencial de los SSR para descubrir la variabilidad genética e índices de endogamias en poblaciones. El sistema de reproducción que utilizan las granjas

acuícolas pueden conducir a tener genotipos marcadamente homocigotos, ya que continuas autofecundaciones en estas especies harán surgir homocigotos recesivos para muchos genes deletéreos, por lo que los individuos serán cada vez más débiles, menos fértiles y las líneas más difíciles de mantener. Por ello, es necesario realizar un estudio de variabilidad intrapoblacional e interpoblacional en las granjas acuícolas de nuestro país.

1.5. Hipótesis

Las poblaciones de las granjas acuícolas de Huacho y Tarapoto presentan muy poca variabilidad genética entre genotipos y existe un importante nivel de endogamia debido al sistema de reproducción de estas granjas acuícolas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. Sistemática

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es una especie de origen africano, perteneciente a la familia cichlidae.

La clasificación taxonómica es la siguiente:

- **Reino:** Animalia
- **Phylum:** Chordata
- **Subphylum:** Vertebrata
- **Superclase:** Gnathostomata
- **Serie:** Pisces
- **Clase:** Actinopterygii Orden: Perciformes Familia: Cichlidae
- **Género:** *Oreochromis*
- **Especie:** *O. niloticus* (Linnaeus, 1758)
- **Nombres comunes:** Tilapia nilótica, tilapia gris, mojarra plateada.

2.1.2. Distribución geográfica

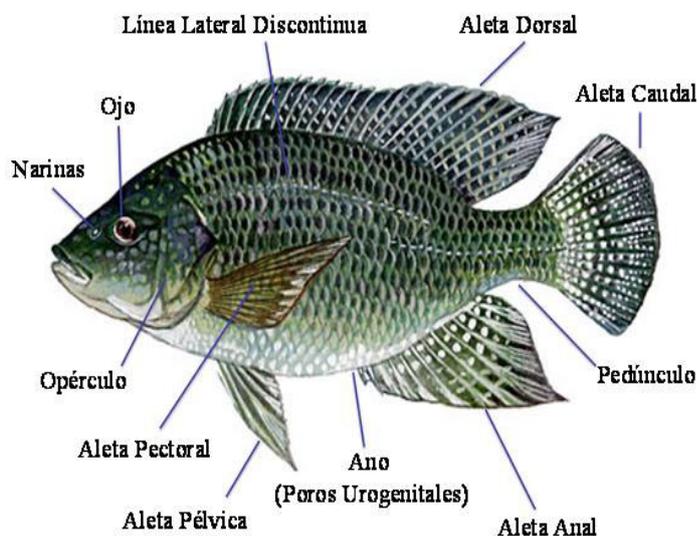
En la década del 50, en el Perú; la Dirección General de Caza y Pesca del Ministerio de Fomento y Agricultura realizó las primeras introducciones con la especie *Tilapia rendalli*, usada como forraje para el paiche (*Arapaima gigas*); a cargo de la Universidad Nacional Agraria La Molina y el Instituto del Mar del Perú (IMARPE), en la década de los 70; introdujeron las especies *Oreochromis hornorum*, *Oreochromis mossambica* y *Oreochromis niloticus*, con fines de cultivo e investigación en la selva. (Ramos y Gálvez, 2000).

2.1.3. Morfología

La tilapia gris posee un cuerpo generalmente comprimido y discoidal, la boca es frecuentemente ancha y bordeada por labios gruesos; las mandíbulas presentan dientes cónicos, y en algunas ocasiones incisivos. Para su locomoción poseen aletas pares e impares; las aletas pares las constituyen las pectorales y las ventrales mientras las impares están constituidas por las aletas dorsales, la caudal y la anal. La parte anterior de la aleta dorsal y anal es corta, consta de varias espinas y la parte terminal de radios suaves, disponiendo sus aletas dorsales en forma de cresta las cuales se caracterizan por tener coloración negra o gris. La aleta caudal es redonda, trunca y raramente cortada (Figura 1) (Rodríguez y García, 2009).

Figura 1

Morfología externa de la tilapia gris (Oreochromis niloticus)



Fuente: (Comité Sistema Producto Tilapia de México AC, 2012).

2.1.4. Alimentación

La tilapia es omnívora; consume alimento natural hasta las cuatro semanas, después aceptan alimento balanceado. El peletizado puede ser seco o húmedo, compacto o sin compactar. A partir de los 4 – 5 cm, las tilapias pueden consumir alimento artificial: harina de soya, harina de semillas de girasol de algodón, polvillo de arroz, es donde este último es un insumo energético. (Proyectos peruanos, 2017).

2.1.5. Hábitat

El nivel de oxígeno mayor a 4,5 ppm es el rango deseable para el crecimiento de la tilapia, siendo el alimento no consumido, las heces y la excesiva densidad de siembra factores que disminuyen el nivel de oxígeno. El rango óptimo de dureza del agua se encuentra entre 50 – 350 ppm, aguas por debajo de 20 ppm ocasionan problemas en la tasa de fecundidad. El pH óptimo debe estar entre 6,5 a 9; rangos por encima o por debajo retardan el crecimiento y retrasan la producción; valores cercanos a 5 causan mortalidad en pocas horas debido a problemas respiratorios. La temperatura óptima para la instalación del cultivo de tilapias está entre 24 °C – 32 °C. (Proyectos peruanos, 2017).

2.1.6. Reproducción

La tilapia presenta dimorfismo sexual visible; es decir, el macho y la hembra se diferencian del primero por poseer dos orificios bajo el vientre (orificio urinario y ano), mientras la hembra tiene tres (orificio urinario, ano y poro genital). El orificio genital del macho es un punto pequeño, mientras que el orificio urinario de la hembra es microscópico. El ano siempre es evidente y se caracteriza por ser un agujero redondo, finalmente el poro genital se ubica en una hendidura perpendicular al eje del cuerpo. (Rodríguez y García, 2009).

2.1.7. Generalidades del cultivo de tilapia

Después de eclosionar las post larvas de tilapia son aún mantenidas en la boca de las hembras hasta que absorben su saco vitelino. Posteriormente se las cosecha cinco días después de su eclosión con una artesa de pesca, luego las larvas se clasifican con un clasificador de tubo de PVC y malla metálica de 8 – 10 mm, las larvas que pasen la malla deben ser revertidas sexualmente con el método químico. A los 28 – 30 días los alevines de tilapia gris alcanzan los 0,3 – 0,5 g y de 2,5 – 4 cm de longitud. Al año de vida las tilapias grises llegan a pesar 700 g, peso al cual es posible conseguir filetes de 3 – 5 onzas. La tasa de mortalidad esperada en tilapias es de: 33,25 % para peces de 1 – 50 g, de 20 % para peces de 50 – 266 g, para peces mayores, la mortalidad es del 8 %. (Proyectos peruanos, 2017).

A.- Reversión sexual

Para trabajar en el cultivo únicamente con machos se pueden emplear tres métodos: realizar el sexaje manual, conseguir peces híbridos o hacer una reversión química a los alevines. (Proyectos peruanos, 2017).

- **Sexaje manual:** Se hace revisando los orificios urogenitales de las tilapias de 30 – 40 gramos de peso, si se ve sólo uno se trata de la uretra y corresponde a un macho; si se ven dos orificios, la uretra y el oviducto genital, se trata de una hembra. En este tipo de separación de machos un 2 % a 5 % es el margen de error aceptado. Las glándulas sexuales se diferencian a los 15 – 20 días, a los 2 – 3 meses ya están maduras y necesitan más de 24 °C para su reproducción. (Proyectos peruanos, 2017).

- **Hibridación:** Se obtiene mediante el cruce de dos especies genéticamente diferentes. El vigor híbrido otorga mejores atributos que la de los progenitores. El resultado

de la hibridación son peces 100 % machos si los progenitores son 100 % puros (Proyectos peruanos, 2017).

- **Reversión Química:** Las tilapias tienen inestabilidad sexual desde que eclosionan hasta que llegan a los 7 – 11 mm. La reversión se hace en este período suministrando andrógenos oralmente en la dieta durante 28 días. La reversión debe terminar cuando alcanzan los 11 mm. (Proyectos peruanos, 2017).

Se recolectan los huevos luego del desove y pasan a incubación artificial, se alimentan con la hormona durante 4 semanas consecutivas. Se usan 60 mg de hormona por cada kg de alimento. (Proyectos peruanos, 2017).

Los andrógenos más usados son: Metiltestosterona (MT), Etiltestosterona (ET) y Mesterolona. Con el primero de los andrógenos señalados se obtienen 98 % machos. (Proyectos peruanos, 2017).

La reversión se hace en ambientes especiales bajo techo, se usan tanques de PVC. La hormona que se usa en la reversión es importada, el tamaño de la partícula es de 0,5 – 0,8 mm y se disuelve previamente en 500 – 800 ml de etanol por kg, tratando de hacer una mezcla homogénea, se hace a temperatura ambiente y se deja secar por 2 días para volatilizar el alcohol. (Proyectos peruanos, 2017).

La mezcla de la hormona con el alimento debe ser de 60 – 120 mg de la hormona por kg de alimento. Los alevines para la reversión se alimentan 4 veces por día durante 7 días por semana, siendo la tasa de mortalidad esperada de 20 % (Proyectos peruanos, 2017).

2.1.8. Acuicultura mundial y nacional de Tilapia

A.- Acuicultura mundial

La tilapia, la especie más diversificada geográficamente, ha seguido agregando producción a lo largo del tiempo. Se espera que la producción sea de alrededor de 6,4 millones de toneladas métricas en 2017, un crecimiento del 6 % con respecto a 2016. En 2018 se espera que la producción crezca un 2,6 % a 6,5 %.

Esto sigue siendo significativamente más bajo que la tasa de crecimiento promedio durante el período de 10 años del período 2008 al 2017, que ha sido del 9,6 %. (FAO, 2006-2020).

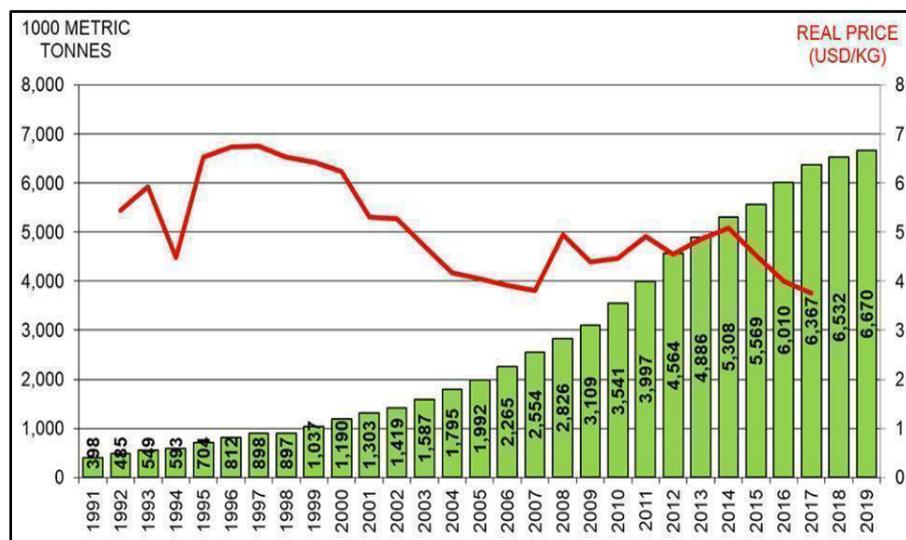
Cuando observamos un precio representativo, el precio de importación estadounidense de filetes congelados, encontramos que los precios reales fluctuaron entre \$ 4 - 5 por kg desde 2008. Disminuyó el año pasado a \$ 4, y en promedio fue de \$ 3,75 por kg durante los primeros siete meses de este año. El aumento sustancial de la producción desde 2008 no ha llevado a precios de mercado más bajos, lo que indica que la demanda de tilapia también ha cambiado con la oferta. (FAO, 2006-2020).

China es el principal productor mundial de tilapia, seguido de Egipto e Indonesia. Para 2017, la estimación promedio de nuestras fuentes es de 1,7 millones de toneladas métricas para China, casi 900,000 toneladas métricas para Egipto y 800,000 toneladas métricas para Indonesia. Para China, se espera que la producción esté en el mismo nivel el próximo año, mientras que para Egipto e Indonesia se espera que la producción aumente. (FAO, 2006-2020).

El rango de estimaciones de diferentes fuentes en China para el año 2017 está entre 1,3 y 1,9 millones de toneladas métricas con un promedio de 1,7 millones de toneladas métricas (Figura 2). Para 2018, el rango está entre 1,2 y 2,0 millones de toneladas métricas, también con un promedio de 1,7 millones de toneladas métricas. (FAO, 2006-2020).

Figura 2

Producción global acuícola de tilapia, con precios de importación de los Estados Unidos filete congelado



Fuentes: (FAO: 1990-2014).

La perspectiva de crecimiento del cultivo de Tilapia Nilótica en el continente americano se basa en el incremento de la demanda del producto en el mercado interno y la apertura de nuevos mercados internacionales para la tilapia con valor agregado. Si bien China es el principal productor de tilapia a nivel mundial, el incremento dependerá en su mayor parte de la producción de la región latinoamericana, para abastecer a los mercados y el consumo mundial de tilapia que cada año se incrementan más. (FAO: 1990-2014)

B.- Acuicultura nacional

En el Perú, su cultivo se ha extendido significativamente en la selva alta, sobre todo en el departamento de San Martín (frontera con Brasil). En la costa norte se están iniciando algunas experiencias importantes, vinculadas al aprovechamiento de represas y reservorios en los proyectos de irrigación del Chira-Piura y San Lorenzo. Una de ellas, es la realizada por FONDEPES en la represa de Poechos, donde se llevó a cabo un cultivo en jaulas flotantes. Otras experiencias recientes incluyen el desarrollo en el departamento de Piura,

donde la empresa American Quality ha realizado una importante inversión. (FAO: 1990-2014).

A nivel nacional el total de áreas habilitadas para el cultivo de tilapia es de 74,66 ha, de las cuales el 77,08 % (57,55 ha) se encuentran en las regiones de Piura y San Martín. De este total, 39 son autorizaciones y 3 concesiones. Cabe señalar que, de la totalidad de áreas habilitadas, sólo 46,08 ha (61,72 %) están destinadas al cultivo exclusivo de tilapia, mientras que las áreas restantes también autorizan el cultivo de otras especies, principalmente peces amazónicos. En el año 2015, “el Ministerio de la Producción registró 389 establecimientos acuícolas formales, donde el 58 % están en la categoría de subsistencia, 39 % de pequeña escala, 1 % a gran escala, 0,8 % orientada a la producción de semilla y 0,5 % a pequeña escala con producción de semilla”. (Baltazar *et al.*, 2018).

En la actualidad las perspectivas para el “Perú tiene muy buenas condiciones para el crecimiento y expansión del cultivo de tilapia, con especial énfasis en los ambientes amazónicos. Igualmente, en el mundo existen tecnologías disponibles para intensificar la producción y para el uso eficiente del agua a través de los sistemas de recirculación y sistemas acuapónicos complementarios” destacan los investigadores. Considerando la actual área de producción, la tasa de crecimiento de producción de tilapia y la tasa de crecimiento de la acuicultura peruana, los investigadores proyectan que para el 2025 la producción de tilapia en el Perú podría alcanzar las 6500 toneladas métricas, en un escenario conservador. Ellos destacan que un cambio en la normativa podría expandir las áreas de producción en la Amazonía, con lo cual la producción de tilapia podría dispararse a las 27 000 toneladas métricas para el año 2025 (Baltazar *et al.*, 2018).

2.1.9. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares microsatélites, conocidos también como SSR (Simple Sequence Repeat) o STRs (Short Tandem Repeat) son motivos de di, tri o tetra-nucleótidos (incluso pueden ser más complejos) repetidos en tándem a lo largo del ADN. (Hamada *et al.*, 1982).

Normalmente, los microsatélites no son codificantes. Posiblemente, desempeñan un papel en la regulación genética o actúan como en los procesos de conversión genética y recombinación. Se caracterizan por ser muy polimórficos, multialélicos, codominantes y reproducibles entre laboratorios. Además, en su análisis requiere solamente una cantidad escasa de ADN y es también susceptible de automatización. La interpretación de los resultados generados por este tipo de marcadores es relativamente sencilla. El principal inconveniente de los microsatélites es la labor y el costo bastante elevado que requiere el desarrollo de los cebadores. Así pues, la técnica SSRs representa hoy día una herramienta de confianza para el análisis de parentesco en la acuicultura y puede realizarse para la identificación de las relaciones paterno - filiales especialmente en especies de puesta natural, o particularmente es muy valioso su aplicación en la fundación de los stocks de reproductores. (Jeffreys *et al.*, 1985).

2.1.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue introducida por primera vez por Kary Mullis en los años ochenta. Esta técnica es capaz de amplificar una variedad de genes de un amplio conjunto de taxas dando lugar a una gran cantidad de datos de secuencias de ADN. (Kocher *et al.*, 1998).

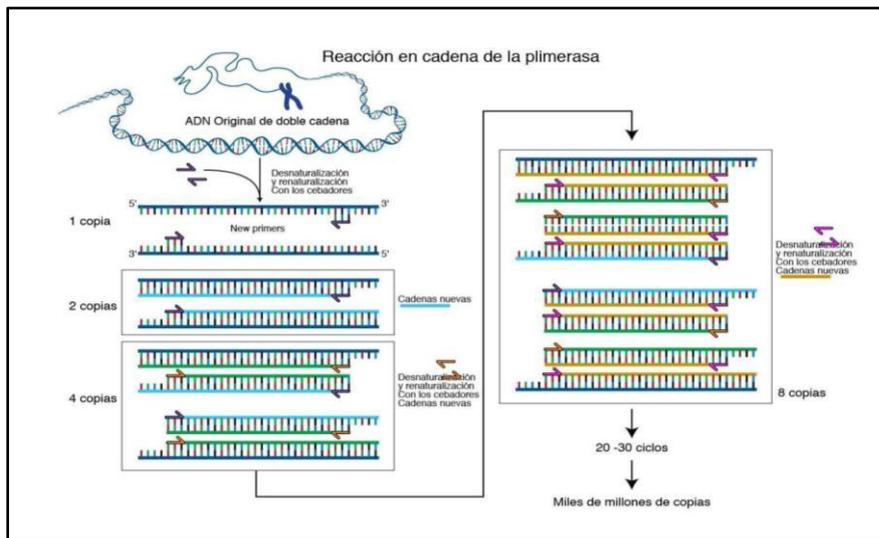
La PCR permite producir un enorme número de copias de una secuencia de ADN específica, normalmente se realiza con un volumen de reacción de 10 - 100 μ l en tubos de PCR que albergan la mezcla (tubos de 0,2 - 0,5 ml) que se colocan en el termociclador.

Para realizar la técnica se necesitan:

- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el sustrato para polimerizar nuevo ADN.
- Dos cebadores que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN.
- Iones divalentes. se suele usar cloruro de magnesio ($MgCl_2$).
- Una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento del ADN polimerasa.
- ADN polimerasa – Taq polimerasa
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- Ciclos de amplificación: En la figura 3 se puede observar el esquema general de los ciclos realizado por la PCR que son los siguientes.
- Desnaturalización: se separan las dos hebras de las cuales está constituido. Este paso puede realizarse entre 94 – 95 °C.
- Hibridación: Alineamiento/Unión del cebador, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 50 – 65 °C durante 20 - 40 s.
- Extensión: Elongación de la cadena, el ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN (Figura 3). La temperatura para este paso depende del ADN polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura máxima está en 75°C – 80 °C (comúnmente 72 °C).

Figura 3

Esquema general del PCR



Fuente: (Palumbi, 1996).

2.1.11. Microsatélites

Los microsatélites o secuencias repetidas cortas (SSR) son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pb, que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos. Están localizados tanto en regiones codificantes como no codificantes y están ampliamente distribuidos a lo largo del genoma eucariótico (Figura 4). Cuando estas regiones son individualmente amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos flanqueantes como iniciadores, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de la ocurrencia de los diferentes números de las unidades de repetición o motivos. (Arif & Khan, 2009).

Algunas de las características de estos marcadores versus otros (minisatélites, RFLPs, RAPDs, etc.), considerados por la mayoría de los autores como una poderosa herramienta para estudios genéticos son: presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son dominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, tienen una confiabilidad del 100 %, repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente en la (Tabla 1). (Aranguren *et al.*, 2005).

Tabla 1

Características de diversos marcadores de ADN nuclear

	RAPD	AFLP	Microsatélites
Información alélica	Dominante	Dominante	Co-dominante
Visualización del locus	Multi-Locus	Multi-Locus	Single Locus
Requerimiento del ADN (μg)	0.02	0.5	0.05
PCR previa	Si	Si	Si
Digestión	No	Si	No (si para desarrollarlos)
Costos	Bajo	Moderado	Alto
Costo por ensayo	Bajo	Moderado	Bajo

Fuente: (Arif y Khan, 2009).

B.- Clasificación de los microsatélites

Chambers y MacAvoy (2000) proponen que se utilicen los términos, 1) *puro* (o *perfecto*), 2) *compuesto* y 3) *complejo* para especificar que uno, de dos o más tipos de nucleótidos, de manera repetitiva respectivamente, se encuentran presentes a lo largo de un locus microsatélite dado, y que el término *interrumpido* (o *imperfecto*) como un descriptor

jerárquico adicional que implica una o más unidades no repetitivas en el interior de los microsatélites (Tabla 2).

Tabla 2

Tipos de microsatélites

Tipos de microsatélites	Nucleótidos
Mononucleotide: (A) ₁₃	AAAAAAAAAAAAAAAA
Dinucleotide: (GT) ₈	GTGTGTGTGTGTGTGT
Trinucleotide: (GAT) ₇	GATGATGATGATGATGATGAT
Tetranucleotide: (CTAG) ₆	CTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAG
Tetranucleotide: (CATTG) ₅	CATTGCATTGCATTGCATTGCATTG
Pentanucleotide: (GGATCC) ₃	GGATCCGGATCCGGATCC
Hexanucleotide: (GGATCC) ₄	GGATCCGGATCCGGATCCGGATCC
Imperfetc microsatellite	GTGTGTGTGTATGTGTGTGTG
Interrupted microsatellite	GTGTGTGTCCCGTGTGTGTGT
Compound microsatellite	GTGTGTGTGCTCTCTCTCTCTC

Fuente: (Yáñez, 2002).

C.- Ventajas de los microsatélites

Los microsatélites presentan ventajas respecto a otros marcadores moleculares, a saber: 1) automatización y elevada reproducción (marcador de PCR), lo que deriva en un bajo costo, 2) dominancia, 3) capacidad para analizar un único locus de posición conocida en el cromosoma y 4) homogénea distribución en el genoma nuclear. (Shinde *et al.*, 2003).

Siendo su gran ventaja su alta variación o alto número de alelos, por lo cual son considerados como marcadores muy polimórficos. El análisis de microsatélites se realiza mediante la amplificación por PCR y la separación de bandas en geles de poliacrilamida.

D.- Aplicaciones de los microsatélites

- Identificación individual y pruebas de paternidad

El principio de la prueba de paternidad utilizando marcadores genéticos consiste en la comparación del genotipo y/o fenotipo de la descendencia con el de sus progenitores.

Como principio mendeliano, uno de los alelos que presenta un individuo proviene del padre y otro de la madre. En dicho análisis, al igual que la identificación individual, la identificación del(os) testigo(s), tanto a nivel fenotípico como genotípico debe ser perfectamente conocida y concordante con la información obtenida en los análisis realizados al individuo. (Aranguren *et al.*, 2005).

- Mapas genéticos y genómica comparativa

Otra aplicación de los microsatélites es la construcción de mapas de ligamiento más completos y detallados, así como la identificación de genes de interés (QTLs). (Aranguren *et al.*, 2005).

- Estudios de genética de poblaciones

Representa una de las áreas en donde los microsatélites han sido más ampliamente utilizados, ya que nos permiten estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio es de gran importancia para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente en poblaciones de animales domésticos y en peligro de extinción. Durante los últimos años se han realizado muchos estudios que han utilizado los microsatélites para análisis filogenéticos, concluyendo que, al utilizar un buen número de loci analizados y con apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una buena aproximación de la filogenia. En los estudios de genética de poblaciones los marcadores

permiten la identificación de cada alelo por locus, la obtención de datos poblacionales y el cálculo de las frecuencias alélicas. De esta manera podemos estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos, así como también realizar análisis filogenéticos y de estructura de la población. (Aranguren *et al.*, 2005).

- **En la acuicultura y la pesca**

Los microsatélites son los marcadores moleculares utilizados, por ejemplo, para determinación de niveles de variabilidad genética, diferenciación genética poblacional, selección de reproductores, programas de mejoramiento genético, así como en programas de repoblación. (Hopp, 2010).

Estos marcadores han sido desarrollados para la mayoría de las especies importantes en la acuicultura, como, tilapias, carpas, camarones, salmones y bagres. (FAO, 2000).

- **La genética como herramienta de mejoramiento acuícola**

La evolución de la acuicultura ha sido promovida por los avances en el estudio del ADN (haciendo uso de los marcadores moleculares) y de los estudios de variabilidad genética, con los cuales se conoce con más claridad los procesos biológicos de domesticación de especies de animales que presenten potencial para cultivo. (Infante y Machado, 2007).

La genética no interfiere con otras disciplinas del desarrollo de la acuicultura, solamente aporta a los avances conseguidos por ellas. Actualmente la genética empleada en la acuicultura tiene como áreas que abarca: la determinación de recursos genéticos para la constitución de stock de reproductores en poblaciones naturales, estudios de control de reproducción, diversidad de las poblaciones y las diferencias que existen entre ellas, aplicables a poblaciones en cautiverio. Además de las mencionadas se ha incluido la aplicación de marcadores moleculares en programas de selección genética y manipulación

cromosómica, estudios genómicos recientes centrados en el mapeo genético y análisis de expresión génica. (Infante y Machado, 2007).

El desarrollo de una acuicultura sostenible requiere la evaluación y el conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones en cautiverio, con el fin de evitar los efectos negativos derivados de la endogamia. (Kincaid, 1983).

Dicha diversidad genética está íntimamente ligada a los recursos genéticos naturales, puesto que la mayoría de los reproductores de las especies en cautiverio proceden de capturas del medio natural. Por ello, la preservación de los recursos genéticos naturales debe ir en paralelo con el desarrollo de las actividades acuícolas. (Infante y Machado, 2007).

2.1.12. Influencia de los factores genéticos en la Tilapia

Son varios los factores genéticos que están involucrados en los procesos de selección de individuos para tener una línea adecuada a las condiciones de producción proyectadas, y que debe ser reconocido por los productores de alevines para alcanzar una máxima eficiencia en la producción del cultivo en cautiverio. (García, 1998).

En la tilapia, los recursos no han sido manejados de manera eficiente, es por esta razón que se ha ido perdiendo la pureza de las especies debido a la hibridación interespecífica. (Mc Andrew y Majundar, 1983).

Así como los elevados niveles de entrecruzamiento han dado paso a una depresión endogámica, lo cual ha evidenciado que las especies silvestres de África se desarrollan mejor que aquellas que se encuentran en cautiverio. (Tave y Smitherman., 1980).

Uno de los problemas de mayor impacto en el cultivo de tilapia es la endogamia, causada por el cruce constante entre organismos que se encuentran estrechamente relacionados genéticamente.

Los efectos negativos que se presentan en los cultivos son:

- Aumento en el número de alevines con daños genéticos y congénitos.
- Reducción en la eficiencia de la conversión alimenticia
- Elevados coeficientes de consanguinidad
- Drástica reducción de la supervivencia
- Reducción del crecimiento a los 150 y 300 días, se halla una gran variación en la talla y el peso de un mismo lote de hermanos. (Morales ,2003).

2.1.13. *Análisis de la variabilidad genética*

En la investigación de las especies piscícolas a nivel genético, se tiene como un primer paso detectar y cuantificar la variabilidad genética existente en las diferentes poblaciones naturales o en cautiverio. (Allendorf *et al.*, 1987).

El conocimiento de la estructura genética de las especies es considerado como un punto de suma importancia de la variabilidad genética. (Allendorf *et al.*, 1987).

Asimismo, el conocimiento de la forma como se distribuye dentro y entre las diferentes poblaciones de una especie que permita una adecuada gestión de las poblaciones de cultivo. Por ello, en anteriores décadas se han ido aplicando distintos métodos para evaluar cualitativa y cuantitativamente la variabilidad genética. Un correcto análisis de la variabilidad genética en las poblaciones debe contar con un número representativo de la población de origen y un número suficiente de marcadores moleculares evaluados para asegurar una conservación efectiva, una productividad continuada y una futura diversidad de la acuicultura.

2.1.14. *Importancia de la variabilidad genética*

El estudio de la variabilidad genética es muy importante para el avance de la genética evolutiva y la conservación de especies, su conocimiento puede ser empleado para las evaluaciones de especies y poblaciones ante los cambios ambientales o naturales provocados por acción del hombre, planear estrategias de conservación de poblaciones, especies y recursos genéticos, conocer las causas y consecuencias de la pérdida de la variabilidad genética y evaluar los riesgos de introducción de especies invasoras, enfermedades y variedades modificadas genéticamente sobre poblaciones. (Piñero et.al., 2008).

Es por ello, en las piscigranjas es fundamental el monitoreo de la variabilidad genética y de la endogamia para la conservación y adaptación de los especímenes que conformen los lotes en cautiverio. (Liu y Cordes, 2004).

La variabilidad genética dentro de una población puede permitir a una especie adaptarse a nuevas condiciones ambientales. Las especies que tienen poca variabilidad genética tienen más probabilidad a extinguirse frente a los cambios en el ambiente, enfermedades o algún cambio en el medio. Una baja variabilidad genética conduce a un mayor nivel de endogamia, que resulta del apareamiento de organismos relacionados entre sí. (Primarck y Ross, 2002).

Las evaluaciones de la variabilidad genética pueden realizarse con base en el modelo de Hardy-Weinberg, que establece que en una población las frecuencias genotípicas y alélicas de una población no cambian de generación en generación, siempre y cuando se cumplan los criterios de aplicación al modelo tales como que tiene que ser en una población infinita sin efectos de selección, ni mutación, migración y con apareamiento al azar. (Hartl y Clark, 1997).

El equilibrio de Hardy- Weinberg describe las leyes de Mendel sobre las frecuencias genotípicas y alélicas de una población, así como los efectos de la reproducción en especies. (Liu y Cordes, 2004).

2.1.15. Diversidad genética

La diversidad genética es la cantidad o suma de la variación genética presente en una población o especie como consecuencia de su evolución. La variación genética se define a su vez como las diferencias genéticas entre individuos o entre poblaciones de una especie. La diversidad genética actúa como un reservorio que permite a las poblaciones adaptarse a los cambios ambientales. El alto nivel de variación genética incrementa el potencial de las poblaciones a responder a selección y mantener la salud de los individuos. La diversidad genética es estimada mediante parámetros o índices que cuantifican la variación genética (polimorfismo) encontrada en los marcadores moleculares empleados, y resumen toda esa información en términos numéricos mucho más manejables. (González *et al.*, 2016).

A.- Índices de diversidad genética basada en microsatélites

- Heterocigosidad observada (H_o)

Se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra. Se calcula por cómputo directo.

$$H_o = \frac{\text{Número de heterocigotos}}{n}$$

Donde, n = número de individuos en la población

- **Heterocigosidad esperada (He)**

Es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en la población sean diferentes. Es la heterocigosidad para el locus si la población estuviera en Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW),

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

Donde, p_i = frecuencia del alelo i . (Nei., 1973).

B.- Contenido de información polimórfica (PIC)

Indica qué tan polimórfico (informativo) es un locus. Se calcula en base al número y frecuencia de los alelos. $PIC = 0$ (locus monomórfico), $PIC < 0,25$ (ligeramente informativo), $0,5 > PIC > 0,25$ (razonablemente informativo), $PIC > 0,5$ (altamente polimórfico),

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Donde, n = número de individuos en la población. (Botstein *et.al.*, 1980).

C.- Coeficiente de endogamia (Fis)

Indica el déficit de heterocigotos en una subpoblación o el total. Su valor oscila entre -1 (todos heterocigotos) y 1 (todos homocigotos). $Fis < 0$ (Exceso de heterocigotos), $Fis = 0$ (Equilibrio Hardy-Weinberg), $Fis > 0$ (Déficit de heterocigotos por exceso de homocigotos, endogamia o incidencia de alelos nulos). Se calcula como:

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_o}{H_s}$$

Donde, H_e = heterocigosidad esperada de la subpoblación: H_o = heterocigosidad observada en la subpoblación. (Price *et al.*, 2010).

D.- Índice de fijación (Fst)

La teoría de los índices de fijación o estadísticos F mide la probabilidad que dos alelos tomados aleatoriamente de una subpoblación (ya sea de individuos diferentes o del mismo individuo) sean idénticos por descendencia. Si hay flujo génico, es decir si hay una transferencia de alelos dentro de las subpoblaciones, esta probabilidad es baja; mientras que, si hay una baja tasa de flujo génico, las poblaciones divergen, ocurre mayor endogamia y el Fst incrementa. Por tal motivo, podemos utilizar el Fst para medir la diferenciación genética entre subpoblaciones. Si dos poblaciones presentan frecuencias alélicas iguales, el valor de Fst es igual a 0. En contraste, si dos poblaciones presentan frecuencias alélicas totalmente diferentes, el valor de Fst es igual a 1. Dentro de este rango, Wright propuso la siguiente valoración: 0 – 0,05 poca diferenciación, de 0,05 – 0,15 moderada, de 0,15 – 0,25 grande y > 0,25 muy grande. El Fst puede ser estimado de la siguiente manera:

$$F_{st} = 1 - H_s / H_t$$

Dónde: H_s es la heterocigosidad esperada promedio de todas las subpoblaciones y H_t es la heterocigosidad esperada para la población total. (Price et al., 2010).

E.- Software Rstudio

Rstudio es un entorno de desarrollo integrado (IDE) para el lenguaje de programación R, dedicado a la computación estadística y gráficos. Incluye una consola, editor de sintaxis que apoya la ejecución de código, así como herramientas para el trazado, la depuración y la gestión de espacio de trabajo. (Allaire., 2011).

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

Investigación cuantitativa de tipo experimental.

3.2. Ámbito temporal y espacial

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad Acuática de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el período de enero del 2015 a julio del 2016.

3.3. Variables

La variable a medir es el patrón de amplificación de cada locus respecto a su marcador molecular.

3.4. Población y muestra

Las poblaciones están compuestas por los individuos *Oreochromis niloticus* de las piscigranjas de Huacho y Tarapoto. Las muestras fueron quince individuos de *Oreochromis niloticus* elegidos completamente al azar de cada población.

3.5. Instrumentos

3.5.1. Materiales

- Tips de 0,1 – 10 ul.
- Tips de 10 – 100 ul.
- Tips de 100 – 1000 ul
- Tubos 0,2 ml para PCR
- Tubos de 1,5 ml

- Mallas Colectoras
- Piceta
- Caja de papel indicador de pH
- Gradillas
- Guantes de nitrilo
- Lentes de protección UV
- Placas petri
- Probetas de 100 ml
- Vaso Becker de 100 ml
- Matraz Erlenmeyer
- Fiolas de 50 ml y 100 ml
- Bagueta
- Ternopor
- Tijeras
- Tinas
- Aireador o difusor de oxígeno
- Bandejas para tinción de geles de poliacrilamida
- Vidrios para electroforesis vertical

3.5.2. Equipos

- Balanza analítica
- Transiluminador UV
- Termociclador Automático Gene Amp modelo 2720 de Applied Biosystems.
- Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific, Inc).
- Espectrofotómetro

- Cámara digital Canon PowerShot ELPH 300 HS.
- Cámara de electroforesis vertical y horizontal modelo DASG-400 (C.B.S. Scientific Company, Inc. Del Mar, CA, U.S.A)
- Microcentrífuga
- Vortex
- Fuente de poder
- Congeladora a - 25 °C
- Refrigeradora
- Micropipetas de 0.1 ul - 10 ul
- Micropipetas de 10 ul - 100 ul
- Micropipetas de 100 ul – 1000 ul
- Incubadora
- Estufa
- Autoclave
- Agitador magnético
- Horno microondas

3.5.3. Reactivos

- Proteinasa K (20 mg/ml)
- Agua destilada
- Eugenol
- TE 20:1 (Tris 20 M, EDTA 1 mM)
- NaOH 2%
- HCl
- TE 10:1 (Tris 10 M, EDTA 1 mM)

- Poliacrilamida 6 %
- Urea
- dNTPs (10 mM)
- MgCl₂ (25 mM)
- Bromuro de Etidio (5 mg/ml),
- Ladder 100 pb
- EDTA 0.5 M
- Agarosa 1 %
- Agarosa 2 %
- Tris 1 M
- Cloruro de sodio 5 M
- Taq polimerasa (5 U/μl)
- Agua de Milli-Q
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol
- Buffer TE 20:5
- Buffer de Homogeneización TNE-UREA
- Etanol 70 %
- SDS 10 % (concentración final 2 %)
- Acetato de Amonio 10 M (concentración final 5 M)
- Nitrato de plata
- Repel
- Alcohol de 96°
- TNE-UREA

- Cloroformo – Alcohol isoamílico (24:1)
- TBE 1X
- Urea 9 M
- APS 10 % (Persulfato de Amonio)
- TEMED puro
- Loading Buffer Formamida
- Ácido acético glacial 10 %
- Etanol absoluto 10 %
- Formaldehído (HCHO)

3.6. Procedimientos

3.6.1. *Obtención de alevinos y transporte*

Los alevinos de *Oreochromis niloticus* fueron adquiridos de las piscigranjas ubicadas en Tarapoto y Huacho, los mismos que fueron enviados por transporte aéreo para ser luego custodiados por la Estación Piscícola Santa Eulalia (EPSE), ubicada en el Kilómetro 40 de la Carretera Central, margen derecha del río Santa Eulalia a 950 m.s.n.m. Se adquirieron un total de 60 alevinos de los cuales se realizaron la biometría, luego se extrajo solamente un fragmento de la aleta anal según los requerimientos de ADN. Posteriormente de que las muestras son obtenidas, fueron preservadas en etanol absoluto, codificadas (N1 hasta N30 para la población de Huacho ; NT1 hasta NT30 para la población de Tarapoto) y transportadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villarreal, donde estuvieron almacenadas a 4 °C hasta la extracción de ADN y posteriormente al Laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) para realizar la

estandarización de los primers, visualización en geles de agarosa y poliacrilamida. (Figura 7).

3.6.2. *Colectas de muestras biológicas*

La muestra obtenida de la tilapia proviene de un fragmento de aleta anal de cada individuo. El uso de la aleta anal fue escogido debido a que permite mantener vivo al pez y disminuir el riesgo a infecciones. Para ello, se procedió con lo siguiente:

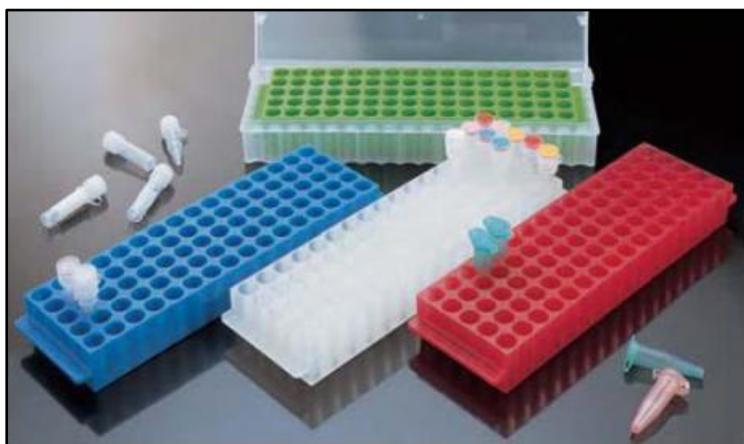
1. Se atrapó el pez con una red.
2. Se colocó al pez en un recipiente con agua y eugenol para adormecerlo.
3. El pez una vez adormecido fue colocado en una plancha de tecnopor para hacer la biometría y la toma de la muestra de aleta.
4. Se devolvió al pez a otro recipiente con agua y tetraciclina por 5 minutos para evitar infecciones.
5. El pez es devuelto al estanque de procedencia.

Debido a que el tejido de la aleta anal es expuesto a su ambiente, este puede contener bacterias provenientes del agua en el cual habitan. Para contrarrestar la contaminación por ADN ajeno a nuestra especie de trabajo, se realizaron 2 lavados con agua estéril antes de guardar la muestra en alcohol. El lavado permite retirar contaminantes químicos, así como eliminar los microorganismos que puedan estar adheridos a la superficie de la aleta, con el fin de contrarrestar la amplificación cruzada y / o inhibición de la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Las muestras de tejido fueron cortadas, colocadas en tubos de 1.5 ml y almacenadas en alcohol de 96° a una temperatura de 4°C hasta su posterior uso. (Figura 6).

Figura 6

Muestras de tejido almacenadas en alcohol de 96°



Fuente: Elaboración propia.

3.6.3. Ubicación geográfica de las muestras analizadas

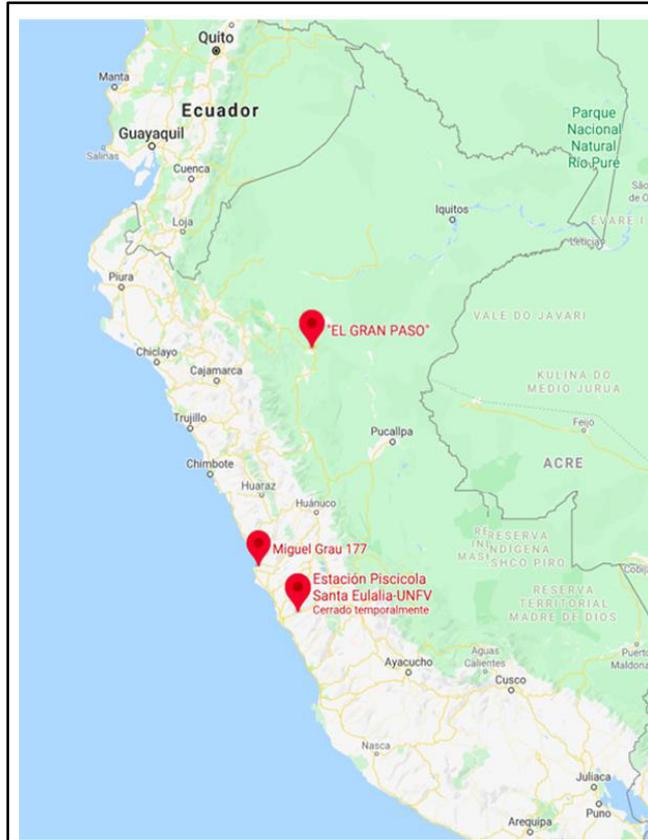
El trabajo fue desarrollado con muestras de individuos de una población de Huacho (N = 30) y Tarapoto (NT = 30), ambas se encuentran en el departamento de Lima y San Martín respectivamente (Fig. 7). Un total de 60 muestras fueron custodiadas por la Estación Piscícola Santa Eulalia. (EPSE), ubicada en el km 40 de la Carretera Central, margen derecha del río Santa Eulalia a 950 m.s.n.m.

En la Figura 7. Se observan las ubicaciones geográficas de los lugares de procedencia de las muestras, los cuales fueron de: La piscigranja “El Gran Paso”, ubicado en el distrito de Tarapoto departamento de San Martín y la Granja Acuícola ACUAHUAURA S.A.C. ubicado en Huacho, provincia Huaura, departamento de Lima también se observa la ubicación geográfica de la Estación Piscícola Santa Eulalia de la UNFV ubicado en la provincia de Huarochirí, departamento de Lima.

Figura 7

Ubicación Geográfica de la Piscigranja “El Gran Paso” - Tarapoto, Granja Acuícola

ACUAAHURA S.A.C. y Estación Piscícola Santa Eulalia – UNFV



Fuente: (Google Maps, 2020).

3.6.4. Extracción de ADN

La obtención del ADN es el primer paso para realizar una investigación de genética molecular, para extraer el ADN se toma en cuenta la naturaleza de la muestra que se va procesar.

Para el caso de la aleta anal, se usó una modificación del protocolo Salting Out Aljanabi, (1997), siguiendo los procedimientos respectivos:

1. Se realizaron 3 lavados de tejido de aletas anales de *Oreochromis niloticus* con Buffer TE 10:1 en una placa petri para eliminar el exceso de alcohol e hidratar la muestra. Luego el tejido triturado se secó en papel toalla. Se pesaron

aproximadamente 100 mg de tejido seco y fue introducido a un microtubo de 1.5 ml estéril.

2. Se adicionó 400 ul de TNE-UREA (ver composición en Anexo 4) y 100 ul de SDS 10 %, se homogeneizó mediante inversión del tubo, se suplementa 5 ul de Proteinasa K y se dejó incubando toda la noche a 60 °C.
3. Se adicionó al lizado un volumen equivalente de Cloroformo – Alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó enérgicamente por 3 min y se centrifugó a 13500 rpm por 15 min.
4. Se rescató la fase acuosa (fase superior) y se trasvasó a otro tubo microcentrífuga de 1.5 ml estéril. Se tuvo cuidado de no recuperar las otras fases en el tubo.
5. A la fase acuosa recuperada se le añadió una cantidad de NaCl 5 M para obtener una concentración final de 0,25 M de NaCl. Se agregó un volumen equivalente de Isopropanol frío, fue homogeneizado por inversión del tubo y se dejó incubando a - 20 °C por 2 horas.
6. Se centrifugó a 13 500 rpm por 20 min y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 600 ul de buffer de lavado (ver composición en Anexo 4) por 3 veces y entre cada lavada se centrifugó a 13500 rpm por 15 min para descartar el sobrenadante.
7. El pellet fue secado a 60 °C hasta eliminar trazas de etanol, fue resuspendido en 100 ul de TE 10:1 (Tris 20 mM, EDTA 1 mM) y almacenado a - 20 °C.
8. Para evaluar la integridad del ADN extraído, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1 % de 7 mm de espesor y se usó 7 ul de cada muestra de ADN con 1 ul de Loading Buffer. La corrida electroforética se realizó a 100 voltios por 60 min, el gel fue revelado con bromuro de etidio (5 mg/ml) y visualizado en un transiluminador UV. La obtención de imagen fue realizada con una cámara

digital Canon PowerShot ELPH 300 HS.

9. La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo con el uso de un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Inc) y se registraron los datos de concentración de ADN (ng/ul) y la relación ADN/Proteína (A260/A280). Se prepararon alícuotas de 50 ul para cada ADN con una concentración final de 50 ng/ul como soluciones de trabajo (Figura 8, Figura 9).

Figura 8

Electroforesis en gel de agarosa al 1 %



Fuente: Elaboración propia.

Figura 9*Cuantificación del ADN*

Fuente: Elaboración propia.

3.6.5. Amplificación de los marcadores microsatélites

Lee *et al.* (2004) realizaron un mapa genético de ligamiento en Tilapia (*Oreochromis spp.*), en el cual se detalla la ubicación de los marcadores microsatélites encontrados por medio del análisis de la progenie F2 proveniente de un cruce entre *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis aureus*.

Los primers o cebadores específicos para tilapia gris que se emplearon, son los tres locus microsatélites polimórficos, que se muestran en la (Tabla 3); los cuales se enviaron a diseñar.

Tabla 3*Microsatélites para Oreochromis niloticus.*

<i>Locus</i>	<i>Número o accesión</i>	<i>Motivo</i>	<i>Cebadores (5'→3')</i>	<i>Longitud (pb)</i>
UNH138	G12290	(CA)26	F:TTCAGCTTCATCTCTTG R:CCATTTTAACCTCTCCATCT	164 - 228
UNH 222	G12373	(CA)17	F:CTCTAGCACACGTGCAT R:TAACAGGTGGGAACTCA	162 - 196
UNH 1004	G68281	(GT)29	F:CATCTGAGTCACGCSGGTTC R:GCTGAGGTGAGTGTGATGGA	180 - 256

Fuente: Elaboración propia.

Estos marcadores microsatélites UNH 222, UNH 138 y UNH 1004 se encuentran localizados en los cromosomas 2, 16 y 22 respectivamente.

A.- Estandarización de las reacciones de PCR

Para la estandarización de los marcadores microsatélites se realizaron gradientes de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) usando valores de 1.5 mM, 2 mM y 2.5 mM. Además, se realizaron gradientes de temperatura para determinar el valor de la temperatura óptima de hibridación. Las condiciones base de las pruebas de PCR se realizaron de la siguiente manera: En una reacción de PCR de 25 ul compuesto de 100 ng de ADN; 1,5 mM – 2,5 mM de MgCl₂ (GeneOn), 1X de Buffer Maxim 0,08 mM de dNTPs (GeneOn), 0,08 uM de cada Primer (Invitrogen) y 0,2 unidades de Taq Polimerasa (GeneOn). Los productos de

PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (2,5 %) visualizados mediante tinción de bromuro en transiluminador UV.

B.- Electroforesis en gel de Poliacrilamida (PAGE)

Los productos de PCR de los marcadores microsatélites fueron corridos en un sistema de electroforesis vertical modelo DASG-400, mediante el uso de una matriz de poliacrilamida denaturante al 6 %, y revelado mediante el proceso de tinción con nitrato de plata. El proceso de instalación del sistema de electroforesis vertical se realizó de la siguiente manera:

- 1.** Los vidrios usados para el sistema de electroforesis vertical fueron lavados con agua y detergente. Inmediatamente después, se realizó un enjuague con alcohol medicinal de 96° para retirar los rastros de grasa.
- 2.** El armado de la cámara de electroforesis que contiene el gel consiste en la separación de 2 vidrios; uno grande (20 cm de largo x 20 cm de ancho) y uno pequeño (18 cm de largo x 20 cm de ancho) separados por 0.6 mm mediante peines. El proceso comienza con agregar 500 µl de REPEL a una cara de cada vidrio y esparcir homogéneamente en toda la superficie del vidrio. Este paso garantiza que el gel de poliacrilamida quede libre de ambos vidrios.
- 3.** Los vidrios son colocados uno frente a otro con la cara cubierta de REPEL hacia la parte interior separada por el peine cuadrado y los separadores laterales ambos con un grosor de 0,6 mm; se usa ganchos de presión para asegurar la estabilidad del ensamblado de la cámara vertical.

4. Para la elaboración de poliacrilamida denaturante al 6 %, se preparó solución de poliacrilamida al 21 % (20 % Acrilamida y 1 % Bis-acrilamida) y se realizó un stock de trabajo que consiste en bajar a una concentración final de 6 % de poliacrilamida en TBE 1X y 9 M de Urea.
5. Para la polimerización de 20 ml de gel de 6 % poliacrilamida denaturante, se utilizó 100 µl de APS 10 % (Persulfato de Amonio) y 50 µl de TEMED puro (N - Tetrametiletilendiamina); se homogeneizó en un beaker y se vertió el contenido dentro de la separación de los vidrios. Se dejó polimerizar el gel por un lapso de 2 horas a temperatura ambiente, luego se montó el gel polimerizado dentro del vidrio en el sistema de electroforesis vertical.
6. Se realizó una pre corrida a 300 voltios por 10 min para linealizar las fibras de la matriz y se pre-calentó el gel para cargar los productos de PCR denaturados en formamida.
7. Se denaturaron los productos de PCR usando el Loading Buffer Formamida (TBE 1X, Azul de bromofenol y Formamida pura), en una relación de 1:1 en un total de 10 µl de mezcla. Luego fueron sometidos a denaturación por calor a 95 °C en el termociclador por 10 min e inmediatamente después fueron enfriados en un rack de frío antes de ser cargados al gel.
8. Se limpió los pozos del gel de poliacrilamida con ayuda de una pipeta para eliminar el resto de urea dentro y cargar las muestras. Se realizó la corrida electroforética a 300 voltios por 10 horas.

El proceso de revelado con nitrato de plata se inicia después de terminar la corrida electroforética y consisten los siguientes pasos:

1. Se retiró el vidrio del sistema con cuidado y se separó los vidrios con ayuda de una pinza. Dejar reposar el gel en el vidrio adherido por 10 min.
2. Se sumergió el vidrio con el gel adherido en solución fijadora (ácido acético glacial 10 % y etanol absoluto 10 %) por 15 min con agitación constante para que el proceso se realice homogéneamente sobre la superficie del gel. El proceso de fijación permite que los productos de PCR queden fijados a la matriz del gel.
3. Se enjuagó con agua destilada por 10 s, 3 veces.
4. Se sumergió el gel en una solución de nitrato de plata al 0,2 % durante 30 min con agitación constante. Se enjuagó con agua destilada por 10 s.
5. El revelado de las bandas se realizó con el uso de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2 % con 1 % de formaldehído (HCHO) frío. El revelado finaliza con la presencia de las bandas las cuales son de un tono marrón en contraste con la matriz de poliacrilamida amarilla. Esta solución permite que precipiten los iones de plata metálica sobre el ADN.
6. Se detuvo el revelado del gel usando la solución de Stop (ácido acético glacial 10 % y etanol absoluto 10 %).
7. Se hidrató el gel por 10 min en agua destilada para luego tomar la fotografía y escanear el gel.

3.7. Análisis de datos

Con los productos del PCR en el gel electroforético, se tomó fotos y se caracterizó los genotipos de los individuos de las poblaciones de cultivo de tilapia de Huacho y Tarapoto, se utilizó el programa Gel Analyzer para establecer líneas horizontales en las fotos de los geles para identificar los alelos. Luego se construyó una tabla donde se coloca la presencia de locis con monomorfismo y polimorfismo.

3.7.1. Análisis de diversidad genética

Se utilizó la librería Polysat y Adegnet en Rstudio para poder calcular los estadísticos básicos, la frecuencia alélica y las riquezas alélicas, alelos nulos, heterogocidad observada/ esperada. Además, se construyó data frames en Rstudio para calcular los índices de polimorfismos (PIC), y los índices de Fst.

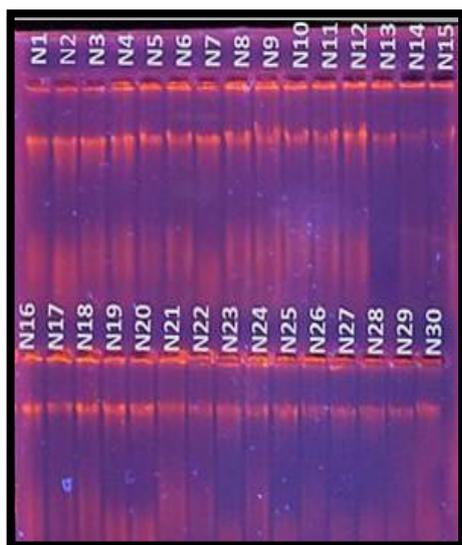
IV. RESULTADOS

4.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN siguiendo la modificación de Aljanabi, (1997) permitió aislar el ADN total a partir de tejido de aleta anal de *Oreochromis niloticus*. El ADN extraído se resuspendió en 100 μ l de TE 10:1 y se cuantificó mediante el uso de Nanodrop, se obtuvieron valores altos de concentración de ADN por encima de los 1000 ng/ μ l y los niveles de pureza se presentaron entre los valores de 1,8 y 2,07 para la población de Huacho (ver en anexo 2 -Tabla 4) y valores de 1,8 y 2,02 para la población de Tarapoto (ver en anexo 2 - Tabla 5). La integridad del ADN fue evaluada con la realización de una corrida electroforética, el ADN obtenido presentó buena integridad reflejado en la presencia de una banda intensa y compacta en la parte superior. Se realizó el proceso para las muestras provenientes de Huacho (Figura 10) y Tarapoto (Figura 11).

Figura 10

Electroforesis del ADN extraído de 30 individuos colectados provenientes de una población de Huacho. Agarosa 1.5 % (110 voltios, 50 min)

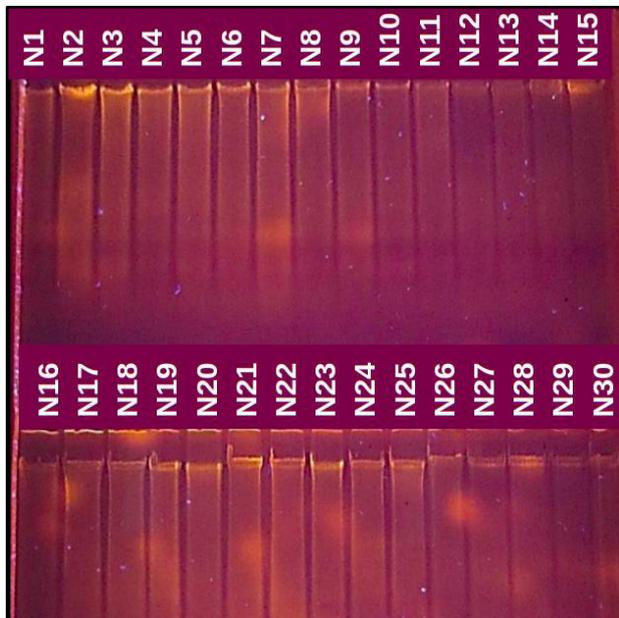


Se observa un alto grado de integridad del ADN.

Fuente: Elaboración propia.

Figura 11

Electroforesis del ADN extraído de 30 individuos colectados provenientes de una población de Tarapoto. Agarosa 1.5 % (110 voltios, 50 min)



Se observa un alto grado de integridad del ADN.

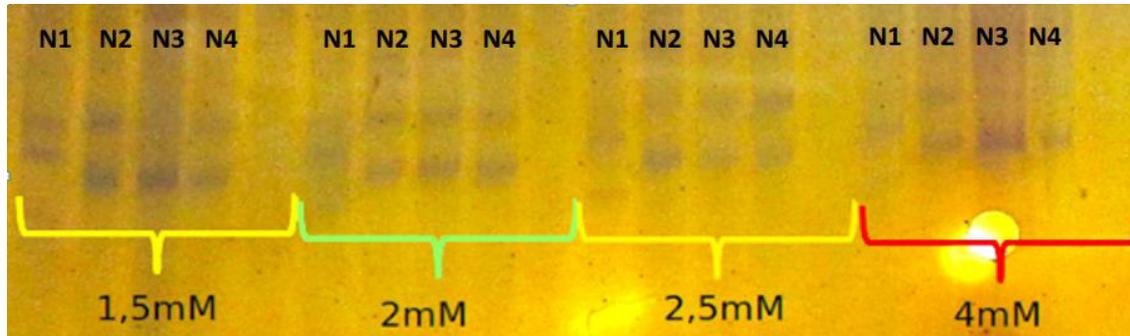
Fuente: Elaboración propia.

4.2. Estandarización de la amplificación de los marcadores UNH 222, UNH 138, y UNH 1004

La reacción en el termociclador para el marcador UNH 222 se programó a 95 °C para la desnaturalización, 56 °C temperatura de melting, y 72 °C para la polimerización de la polimerasa. Se cambió la temperatura a 55 °C para el microsatélite UNH 138, y 60 °C para el microsatélite UNH 1004. Estas reacciones se estandarizaron bajo diferentes gradientes (Figura 12, 13, 14, 15). Al final hubo amplificaciones a 1,5 mM para el UNH 222, y 2 mM para UNH 138, sin embargo, en ninguna estandarización de gradiente amplificó para el microsatélite UNH 1004. A continuación, se ven los gradientes de temperatura para el microsatélite UNH 222, UNH 138, y UNH 1004.

Figura 12

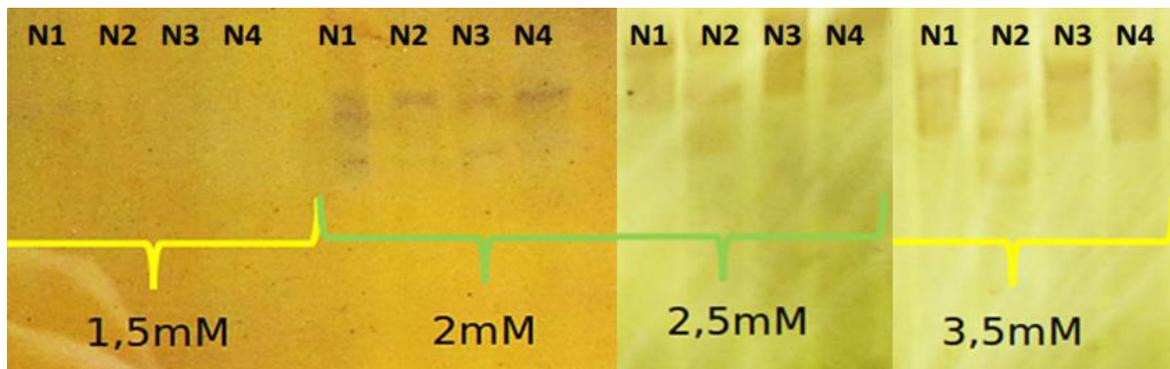
Estandarización del marcador UNH 222, bajo diversas concentraciones de $MgCl_2$ (1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, y 4 mM) de 4 muestras de las poblaciones de Tilapia



Fuente: Elaboración propia.

Figura 13

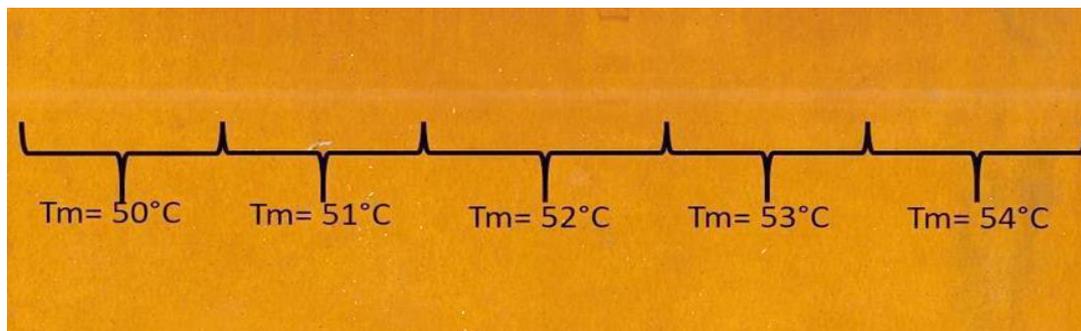
Estandarización del primer UNH 138, bajo diversas concentraciones de $MgCl_2$ bajo diversas concentraciones de $MgCl_2$ (1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, y 3,5 mM) de 4 muestras de las poblaciones de Tilapia



Fuente: Elaboración propia.

Figura 14

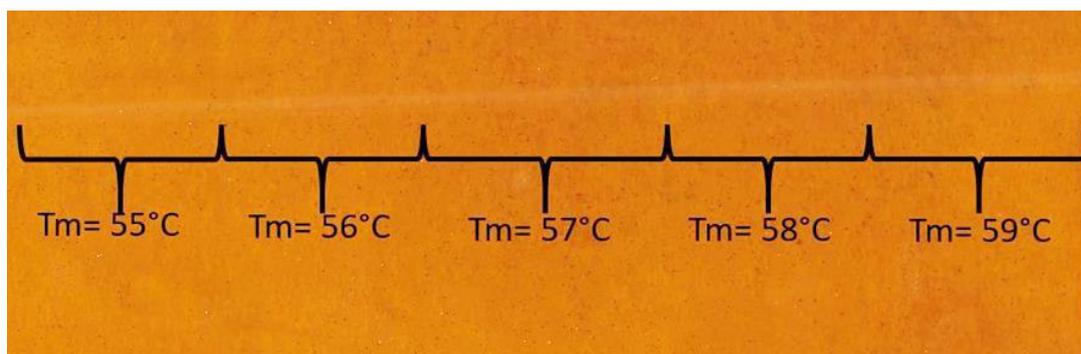
Electroforesis en gel de acrilamida para el Marcador UNH 1004 con Gradiente de Temperatura 50 °C - 54 °C. Gel denaturante de 6 %, 1 hora de corrida a 300 voltios con tinción de nitrato de plata



Fuente: Elaboración propia.

Figura 15

Electroforesis en gel de acrilamida para el Marcador UNH 1004 con Gradiente de Temperatura 55 °C – 59 °C. Gel denaturante de 6 %, 1 hora de corrida a 300 voltios con tinción de nitrato de plata.



Fuente: Elaboración propia.

4.3. Genotipado de marcadores microsatélites

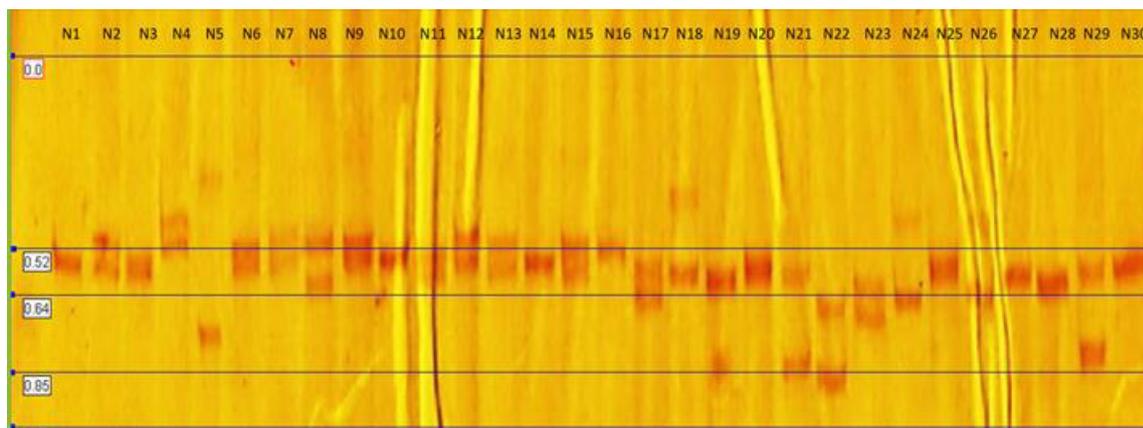
Se usó el programa Gel Analyzer donde se hicieron líneas para contabilizar los alelos. Se identificó tipos de alelos, donde se leyeron todos los geles y se designaron valores (0 donde está ausente) y (1 donde está presente) para hacer los conteos respectivos puestos en las tablas de caracterización genotípica de los marcadores microsatélites UNH 138 y UNH 222 (Ver Anexo 3 - Tablas 11, 12, 13 y 14) en las poblaciones de Huacho y Tarapoto. (GelAnalyzer.com, 2020).

A partir de estos datos obtenidos se realiza el cálculo de las frecuencias alélicas de los marcadores UNH 138 y UNH 222 en las poblaciones de Huacho y Tarapoto (Ver Anexo 3 - Tabla 15).

4.3.1. Amplificación del marcador microsatélite UNH 138 para la población de Huacho

Figura 16

Electroforesis en gel de acrilamida para el marcador UNH 138 para la población de Huacho



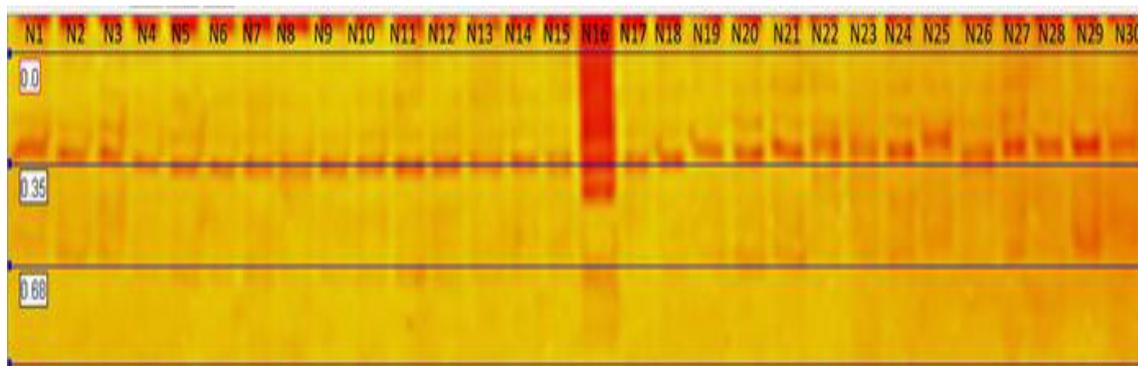
Fuente: Elaboración propia.

En la figura 16 se presenta amplificación del marcador UNH 138, en este se visualiza en primera instancia una alta cantidad de alelos para el locus UNH 138 para la población de Huacho.

4.3.2. Amplificación del marcador microsatélite UNH 222 para la población de Huacho

Figura 17

Electroforesis en gel de acrilamida para el marcador UNH 222 para la población de Huacho



Fuente: Elaboración propia.

En la figura 17 se presenta amplificación del marcador UNH 222, en este se visualiza en primera instancia muy baja cantidad de alelos para el locus UNH 222 en la población de Huacho.

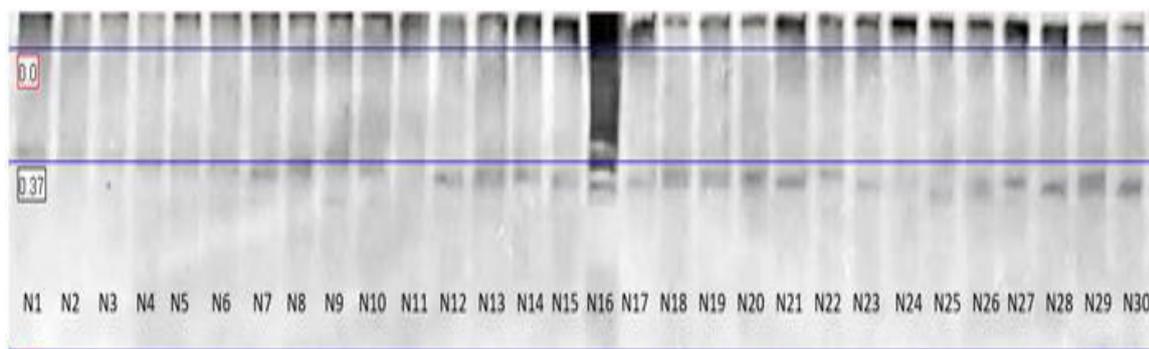
4.3.3. Amplificación del marcador microsatélite UNH138 para la población de

Tarapoto

Figura 18

Electroforesis en gel de acrilamida para el marcador UNH 138 para la población de

Tarapoto



Fuente: Elaboración propia.

En la figura 18 se presenta amplificación del marcador UNH 138, en este se visualiza en primera instancia muy baja cantidad de alelos para el locus UNH 138 en la población de Tarapoto.

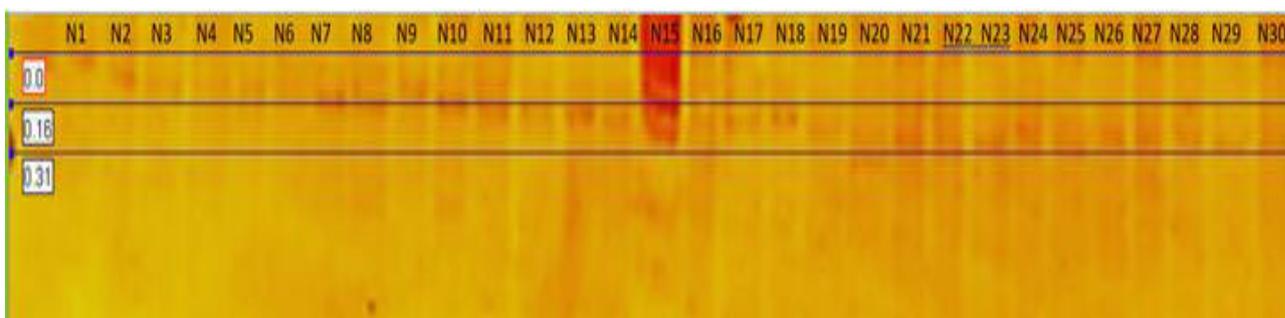
4.3.4. Amplificación del marcador microsatélite UNH 222 para la población de

Tarapoto

Figura 19

Electroforesis en gel de acrilamida para el marcador UNH 222 para lo población de

Tarapoto.



Fuente: Elaboración propia.

En la figura 19 se presenta amplificación del marcador UNH 222, en este se visualiza en primera instancia muy baja cantidad de alelos para el locus UNH 222 en la población de Tarapoto.

4.4. Cálculo del índice polimórfico

Se calculó los índices polimórficos a partir de las frecuencias alélicas. Se realizó a través del paquete Adegnet de Rstudio.

Tabla 4

Índices polimórficos de los marcadores UNH 138 y UNH 222 en las poblaciones de Huacho. y Tarapoto.

<i>Población</i>	<i>UNH 138</i>	<i>UNH 222</i>
Huacho	0,468	0,358
Tarapoto	0,375	0,562
Total	0,716	0,740

Fuente: Elaboración propia.

4.5. Estimadores estadísticos de diversidad genética en las poblaciones de Tilapia

Se calculó los diversos estimadores de variabilidad. Entre ellos, la heterocigosidad esperada intrapoblacional y promedio, heterocigosidad observada intrapoblacional y promedio, heterocigosidad total, coeficiente de endogamia, coeficiente de diferenciación genética.

Tabla 5

Estadísticos de data genotípica: Análisis locales (He: Heterogocidad esperada intrapoblacional, Fis: Coeficiente de endogamia intrapoblacional, Ho: Heterogocidad observada en cada población). Elaborado con Adegnet-Rstudio.*

<i>Marcador molecular</i>	<i>Población</i>	<i>He</i>	<i>Fis*</i>	<i>Ho</i>
Marcador	Huacho	0,5286	0,558	0,233
UNH138	Tarapoto	0,4992	0,933	0,033
Marcador	Huacho	0,4662	1	0
UNH222	Tarapoto	0,6382	1	0

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6

Estadísticos de data genotípica: Análisis Globales (Hi: Heterogocidad observada promedio, Hs: Heterogocidad esperada promedio, Fis: Coeficiente de endogamia, Fst: Coeficiente de diferenciación genética, Ht: Heterogocidad total). Elaborado con Adegnet-Rstudio.

<i>Marcador molecular</i>	<i>Hs</i>	<i>Ht</i>	<i>Hi</i>	<i>Fis</i>	<i>Fst</i>
Marcador UNH138	0,514	0,867	0,133	0,741	0,407
Marcador UNH222	0,552	0,954	0	1	0,421

Fuente: Elaboración propia.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Basado en la clasificación desarrollada por Botsein (1980), un $PIC > 0,5$ se considera altamente informativo; $0,25 < PIC < 0,5$ se considera moderadamente informativo y $PIC < 0,25$ se considera ligeramente informativo. Nuestros marcadores moleculares UNH 138 para la población de Huacho tuvieron un valor del PIC más alto ($PIC = 0,467$) que el UNH 222 ($PIC = 0,357$). En la población de Tarapoto el marcador UNH 222 obtuvo el mayor valor del PIC ($PIC = 0,561$), por lo que es más informativo que el UNH 138 ($PCI = 0,358$). A nivel interpoblacional el valor del PIC más alto se obtuvo para el UNH 222 ($PCI = 0,7403938$) a comparación del marcador UNH 138 ($PIC = 0,7158$). Estos índices polimórficos fueron congruentes con los He a nivel intrapoblacional, y congruentes con Hs a nivel interpoblacional.

El valor de F_{st} de 0,407 para el marcador UNH 108 y 0,421 para el marcador UNH 222 obtenidos en este estudio sugiere un nivel de diferenciación genética baja. Esto también se da en poblaciones de tilapia de India ($F_{st} = 0,326$) (Shyamala *et al.*, 2014), y de Brasil (Bezault *et al.*, 2011) $F_{st} = 0,326$, donde existe un similar sistema reproductivo al de estas granjas acuícolas ya que aquí se utiliza un solo tipo de machos para fecundar los huevos, además sólo intensifican un tipo de variedad y no tienen programas de mejoramiento genético. El apareamiento aleatorio en poblaciones pequeñas, como se da en las granjas acuícolas peruanas, estaría generando un resultado de apareamiento entre parientes biológicos y probable fijación aleatorio de alelos privados, todo esto se refleja en la poca diversidad genética. (Khaw *et al.*, 2009). El contraste a este tipo de apareamiento, lo tenemos en poblaciones altamente diversas como la de Lago Tana en África Oriental ($F_{st} = 0,9$) (Tibihika *et al.*, 2020) donde en las granjas de peces se mezclan múltiples peces de diferentes poblaciones de Tilapia.

La heterocigosidad es una importante medida de diversidad genética en poblaciones y actualmente tiene mucha atención de ecologistas y de acuiculturistas. (Angienda *et al.*, 2010).

Los valores de heterocigosidad esperada promedio para los locus UNH 138 y UNH 222 fueron $H_s = 0,514$ y $H_s = 0,552$ respectivamente, fueron mayores a los de heterocigosidad observada promedio, $H_i = 0,133$ y $H_i = 0$ respectivamente, concordando con aquellos obtenidos en un estudio realizado en Guangdong, China ($H_o = 0,4483$ y $H_e = 0,7097$), donde se halla un déficit de heterocigotos como efecto de un exceso de endogamia en las poblaciones. (Hassanien y Gilbey, 2005).

También se obtuvieron similares resultados de Heterocigosidad esperada promedio para las poblaciones de Níger, el valor H_e de 0,42 y para la población del Lago Metahara, el valor de 0,36 (Bezault *et al.*, 2011), sugiriendo un déficit de heterocigotos, entre las razones principales están los efectos biogeográficos y la falta de apareamiento aleatorio por ser poblaciones pequeñas.

Por el contrario, en otro estudio entre especies silvestres de tilapia (Ravakarivelo *et al.*, 2019), las heterocigosidades observadas y esperadas no mostraron diferencias significativas $H_o = 0,62$ y $H_e = 0,66$ y en cultivadas $H_o = 0,57$ y $H_e = 0,60$ fue similar.

Por otro lado, existen considerables diferencias en este estudio con los valores heterocigosidad esperados promedios (H_s) obtenidos en algunas poblaciones de Egipto, se reportó en Burullus el valor H_e de 0,843 y en Qena el valor fue de 0,886 (Hassanien *et al.*, 2005), de manera similar ocurrió para un locus específico en la población del lago Turkana ($H_e = 0,9237$) y del lago Albert ($H_e = 0,8861$) ubicados en Kenya. (Nyingi *et al.*, 2009).

Estos últimos análisis revelan un alto nivel de subestructura poblacional entre estas poblaciones, cabe indicar que eran poblaciones silvestres, y no presentan el mismo sistema de reproducción de granjas acuícolas.

Por otro lado, según Hassanien *et al.* (2005), la presencia de alelos nulos, (se habla de alelos nulos cuando estos no pueden ser amplificados por PCR), es debido principalmente a una mutación en el punto de hibridación del iniciador, o según Dawson *et al.* (1997), a la incapacidad de separar alelos cercanos debido a la presencia de bandas stutter en los geles electroforéticos, reduciendo la medida de los valores de la heterocigosidad.

Según He *et al.* (2012), el indicador "Fis" cuyo rango de valor varía de -1 y +1 teóricamente, aquellos valores positivos indican la deficiencia de heterocigotos en comparación con las expectativas del equilibrio Hardy-Weinberg, los valores en Fis que no diferían tanto de cero significativamente indican una conformación general a las expectativas del equilibrio de Hardy-Weinberg, y muestran que las poblaciones no evidenciaron abundante endogamia. En contraste con los valores en la tabla 8,1 de análisis globales, los loci UNH 138 y UNH 222 mostraron $Fis = 0,741$ y $Fis = 1$ respectivamente, demostraron así su alta homocigosidad, de igual modo que Nyingi, D. *et al.* (2009) en poblaciones del lago Bogoria y río Senegal en África Occidental ($Fis = 0,929$ y $Fis = 1,000$ respectivamente).

Los valores para estas muestras se podrían atribuir a efectos de Wahlund, o las altas tasas de endogamia (Wahlund, 1928).

El efecto Wahlund es un déficit heterocigótico observado cuando dos poblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) pero con diferentes frecuencias de alelos se mezclan. Nuestras granjas acuícolas representan "pequeños grupos" en los que es difícil de suponer que se estructuren en más de una población (al menos dos poblaciones diferenciadas).

Mientras en la tabla 8,2; en análisis intrapoblacional, mostraron indicadores Fis intrapoblacionales más altos, tanto en Huacho ($Fis = 0,933$) y Tarapoto ($Fis = 1$), y se

infiere la poca variabilidad genética, los déficit heterocigóticos observados son más probables debido al apareamiento entre familiares en estas poblaciones además de la erosión génica que posiblemente haya surgido por la propagación intensiva y de mayor demanda de *O. niloticus* , que son nativos de África y Medio Oriente. (Hassanien y Gilbey, 2005).

Finalmente, con esta primera caracterización de la variabilidad genética en esta especie, se sugiere programas con manejo reproductivo adecuado y un manejo en campo de las buenas prácticas acuícolas, para que se puede contribuir a la reducción de endogamia en estos centros acuícolas (Bentsen y Olesen, 2002) y mejorar la calidad de la producción.

VI. CONCLUSIONES

- Se pueden utilizar dos de los tres marcadores microsatélites propuestos tales como UNH 138 Y UNH 222 para las poblaciones de Tilapia gris de Huacho y Tarapoto-
- La variabilidad genética de dos poblaciones cultivadas de tilapia gris de la Estación Piscícola Santa Eulalia fue evaluada usando dos loci microsatélites medianamente informativos, encontrando muy poca diversidad genética y altos niveles de endogamia presentes en las poblaciones de tilapia gris cultivadas de Huacho y Tarapoto.
- Los marcadores microsatélites son herramientas que pueden ser implementadas en piscigranjas de Tilapia para evaluar el grado de endogamia de los reproductores y mejorar la producción de semilla. Así mismo el estudio más amplio de esta herramienta ayudaría a la aplicación de estrategias de selección asistida por marcadores.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda un estudio con mayor profundidad de las poblaciones de los individuos de interés de estudio. Además, se sugiere tener mayor precaución en la toma de muestra, y en el proceso de manejo del material génico debido a la presencia de contaminantes que están en el ambiente. Estos dificultan los procesos de amplificación en las reacciones en cadena de la polimerasa. También verificar el buen estado de los aparatos de laboratorio de los cuales obtenemos los resultados. Otro recurso importante es el manejo de una cámara de alta resolución para la toma de fotos, los cuales ayudan a una mejor visualización de los geles electroforéticos.
- Se indica que se requiere una investigación con mayor cantidad de marcadores microsátélites, y con mayores poblaciones de granjas acuícolas peruanas de la *Tilapia gris*, para tener un mejor panorama del nivel de endogamia de esta especie en estos centros.
- Se sugiere generar proyectos de conservación genética para evitar niveles endogámicos muy altos en las poblaciones de *Tilapia gris* en las granjas acuícolas de Huacho y Tarapoto.

VIII. REFERENCIAS

- Aljanabi, S. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692-4693.
- Allaire, J. (2011). *About Rstudio*. Rstudio. Recuperado de <https://rstudio.com/about>.
- Allendorf, F., Ryman, N., & Utter, F. (1987). Genetics and fishery management: past, present and future. En N. Ryman y F. Utter (Eds.), *Population Genetics and Fishery Management* (pp. 141-159). Washington Sea Grant Program.
- Angienda, P. O., Lee, H. J., Elmer, K. R., Abila, R., Waindi, E. N., & Meyer, A. (2010). Genetic structure and gene flow in an endangered native tilapia fish (*Oreochromis esculentus*) compared to invasive Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Yala swamp, East Africa. *Conservation Genetics*, 12(1), 243–255.
- Aranguren, M. A., Román, B. W., ISEA, V. Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal*, 13(1), 30-42.
- Arif, I.A., & Khan, H.A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 9-17.
- Baltazar, P., & Palomino, A. (2004). *Manual de cultivo de Tilapia* (1.^aed.). Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (FONDEPES). Recuperado de http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manual_tilapia.pdf.

- Baltazar, P., Mendoza, D., & Castañeda, M. (2018). Tilapia Potential in Peru. *World Aquaculture*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/328887766_Tilapia_Potential_in_Peru.
- Baroiller, J. F., D’Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., & Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(1), 30-38. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.018>.
- Bentsen, H., & Olesen, I. (2002). Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. *Aquaculture*, 204(3), 349–359. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00846-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00846-8).
- Bezault, E., Balaesque, P., Toguyeni, A., Fermon, Y., Araki, H., Baroiller, J.-F., & Rognon, X. (2011). Spatial and temporal variation in population genetic structure of wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) across Africa. *BMC Genetics*, 12(102). Recuperado de <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-102>.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., & Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet*, 32(3), 314-331.
- Briñez R, B., Caraballo O, X., & Salazar V, M. (2011). Diversidad genética en seis poblaciones de tilapia roja, usando microsatélites como marcadores genéticos. *Revista MVZ Córdoba*, 16(2), 2491-2498. Recuperado de <https://doi.org/10.21897/rmvz.1010>.
- Carleton, K. L., Streelman, J. T., Lee, B. Y., Garnhart, N., Kidd, M., & Kocher, T. D. (2002). Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Animal*

- Genetics*, 33(2), 140-144. Recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2002.00817.x>.
- Castillo, A., Cottet, L., Castro, M., & Sepúlveda, F. (2011). Rapid isolation of mycoviral double-stranded RNA from *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology Journal*, 8(1), 1-7. Recuperado de <https://doi.org/10.1186/1743-422x-8-38>.
- Comité sistema producto Tilapia de México AC. (2012). *Criterios Técnicos y Económicos para la Producción Sustentable de Tilapia en México*. (1.^aed.). Proyecto Integral de Capacitación 2012. Recuperado en <https://pdfslide.tips/documents/criterios-tecnicos-y-economicos-para-la-produccion-sustentable-de-tilapia-en-56384ffa3dca5.html>.
- Cuevas R.B, (2012). *Evaluación productiva y variabilidad genética de especies de tilapia del género Oreochromis en el estado de Sinaloa* [Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio Institucional del Instituto Politécnico Nacional. <http://www.remeri.org.mx/portal/REMERI.jsp?id=oai:tesis.ipn.mx:123456789/9899>
- Chambers, G. K., & MacAvoy, E. S. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 126(4), 455–476. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(00\)00233-9](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(00)00233-9).
- Dawson, A. (1997). A LINE-like transposable element in *Drosophila*, the I factor, encodes a protein with properties similar to those of retroviral nucleocapsids. *The EMBO Journal*, 16(14), 4448-4455. Recuperado de <https://doi.org/10.1093/emboj/16.14.4448>.
- Dias, M. A. D., De Freitas, R. T. F., Arranz, S. E., Villanova, G. V., & Hilsdorf, A. W. S. (2016). Evaluation of the genetic diversity of microsatellite markers among four

strains of *Oreochromis niloticus*. *Animal Genetics*, 47(3), 345-353. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/age.12423>.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (1990-2014). *Aquaculture topics and activities* (1.^a ed.). Dirección de información de la FAO.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2000). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura* (10.^a ed.). Dirección de información de la FAO.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006-2020). *Aquaculture topics and activities* (16.^a ed.). Dirección de información de la FAO.

Fitzsimmons, K. (2000). Tilapia: The Most Important Aquaculture Species of the 21st century. *Proceedings from the Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture*, 3-8.

Fitzsimmons, K. (2004). Development of new products and markets for the global tilapia trade. *Proceeding of the Sixth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, 624-633.

García, J. L., Jorde, P. E., Ryman, N. K., Utter, F., & Pla, C. (1991). Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture*, 95(3), 235-249. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90090-t](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90090-t).

García, U. (1998). La Acuicultura en Venezuela, una actividad con futuro. *Panorama Acuícola*, 4(6), 32-33.

GelAnalyzer.com (2018, 17 de junio). *GelAnalyzer19.1, Free desktop app for 1D gel electrophoresis evaluation*. Recuperado de <http://www.gelanalyzer.com/index.html>.

- Gonzalez, D., Gao, G., Baranski, M., Moen, T., Cleveland, B. M., Kenney, P. B., Vallejo, R. L., Palti, Y., & Leeds, T. D. (2016). Genome-Wide Association Study for Identifying Loci that Affect Fillet Yield, Carcass, and Body Weight Traits in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Genetics*, 7(203), 1-14. Recuperado de <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00203>.
- Google Maps. (2020). *Piscigranja "El Gran Paso"* [mapa]. Google. Recuperado de <https://www.google.com/maps/place/%22EL+GRAN+PASO%22/@-8.8246466,-80.4828923,5z/data=!4m5!3m4!1s0x91ba095c139f82c7:0xf46a200e2adf6439!8m2!3d-6.471712!4d-76.382289?hl=es>.
- Hamada, H., Petrino, M. G., & Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(21), 6465-6469. Recuperado de <https://doi.org/10.1073/pnas.79.21.6465>.
- Hartl, D.L., & Clark, A.G. (1997). *Principios of Population Genetics* (3^{er} ed.). Sinauer Associates.
- Hassanien, H. A., & Gilbey, J. (2005). Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquaculture Research*, 36(14), 1450–1457. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01368.x>.
- He, L., Xie, Y., Lu, W., Wang, Y., Chen, L., Mather, P., Zhao, Y., Wang, Y., & Wang, Q. (2012). Genetic diversity in three redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, Von Martens) lines developed in culture in China. *Aquaculture Research*, 43(1), 75-83. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02802.x>

- Hopp, E. (2017). Marcadores Moleculares (Conferencia). *Agrobiotecnología*, Buenos Aires, Argentina. Recuperado de <https://1library.co/document/yr8r81pz-marcadores-moleculares.html>
- Hoyos, M. (2009). *Reproducción en la vicuña macho: evaluación del método de contención química, colección de semen, análisis del eyaculado y biometría testicular*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio Institucional UNMSM. Recuperado de <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/967>
- Infante, C. & Manchado, M. (2007). Recursos genéticos de peces marinos de interés en acuicultura. En Martínez, P y Figueras, A. (Eds.), *Genética y Genómica en Acuicultura* (pp 23-64). Observatorio Español de Acuicultura.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316(6023), 76-79. Recuperado de <https://doi.org/10.1038/316076a0>.
- Khaw, H. L., Bovenhuis, H. L, Ponzoni, R. W., Rezk, M. A., Charo-Karisa, H., & Komen, H. (2009). Genetic analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) selection line reared in two input environments. *Aquaculture*, 294(1-2), 37-42. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.025>.
- Kincaid, H. L. (1983). Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture*, 33(1-4), 215-227. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90402-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90402-7).
- Kocher, T. D., Lee, W. J., Sobolewska, H., Penman, D., & McAndrew, B. (1998). A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 148(3), 1225-1232.

- Lee, B.-Y., Hulata, G., & Kocher, T. D. (2004). Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Heredity*, 92(6), 543-549. Recuperado de <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800453>.
- Liu, Z., & Cordes, J. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1-4), 1-37. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.027>.
- Mc Andrew, B. J., & Majundar, K. C. (1983). Tilapia stock identification using electrophoresic markers. *Aquaculture*, 30(1-4), 249-261. Recuperado de [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90167-9](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(83)90167-9)
- Montaldo, H. & Meza-Herrera, C. A. (1998). Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electronic Journal of Biotechnology* 1(2), 15-16.
- Morales, D. A. (2003). *Biología, Cultivo y Comercialización de la Tilapia*. (1.^a ed.). AGT Editor. S.A.
- Morera, L; De Andrés, D.F; Barbancho, M; Garrido, J.J; & Barba, C.J. (1999). Detección de variabilidad genética por microsatélites en el Alano Español. *Arch. Zootec.* 48 (181), 63-70.
- Moreira, A., Hilsdorf, A., Wagner, S., & Souza. (2007). La variabilidad genética de dos cepas de tilapia del Nilo utilizando marcadores microsatélites. *Investigación Agropecuaria*, 42(4), 521-526.
- Naranjo, G. (2014). *Optimización de un método de identificación del genotipo sexual mediante microsatélites en tilapia del Nilo (Oreochromis niloticus) en las piscinas de reproducción de Aquatil gen Cia. Ltda. Lago Agrio*. (Tesis de pregrado).

Repositorio institucional de Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/9862>.

Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12), 3321–3323.

Recuperado de <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.332>.

Nyingi, D., De Vos, L., Aman, R., & Agnèse, J. (2009). Genetic characterization of an unknown and endangered native population of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae; Teleostei) in the Lobo Swamp (Kenya).

Aquaculture, 297 (1–4), 57–63. Recuperado de

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.017>.

Panarari-Antunes, RS., Prioli, A. J., Prioli, S.M., Júlio, H.F., Jr, Agostinho, C.S., y Prioli, LM (2008), Variabilidad molecular en *Brycon cf. pesu* Müller y Troschel, 1845 (Characiformes: Characidae) de la cuenca Araguaia-Tocantins. *Genetics and molecular research*, 7(1), 95-106. Recuperado de <https://doi.org/10.4238/vol7-1gmr365>.

Palumbi, S. (1996). Nucleic Acids II: The polymerase chain reaction. En D.Hillis , C. Moritz y B.Mable (Eds.), *Molecular Systematics* (pp 205-247). Sinauer Associates.

Perales, R. H., Brush, S. B., & Qualset, C. O. (2003). Dynamic Management of Maize Landraces in Central Mexico. *Economic Botany*, 57(1), 21-34. Recuperado de

<https://doi.org/10.1663/0013-0001>.

Piñero, D., Brahona, A., Eguiarte, L., Rocha. O., & Salas, L. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en

México. En: Sarukhán, J. (Ed.), *Capital natural de México* (pp 415-435).
CONABIOL.

Price, A. L., Zaitlen, N. A., Reich, D., & Patterson, N. (2010). New approaches to population stratification in genome-wide association studies. *Nature reviews. Genetics*, 11(7), 459–463. Recuperado de <https://doi.org/10.1038/nrg2813>.

Primark, R., & Ross, J. (2002). *Introducción a la biología de la conservación*. Ariel.

Proyectos Peruanos (2017). Crianza de tilapias. *Proyectos Peruanos: El aliado de su inversión*. Recuperado de <http://proyectosperuanos.com/tilapias/>.

Ramos, R., & Gálvez, M. (2000). Impacto ambiental de la introducción de Tilapias en la cuenca del Río Piura. *Revista Científica de la Universidad Nacional de Piura*, 5(1), 80-97. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v13n3/v13n03a22.pdf>.

Ravakarivelo, M., Pepey, E., Benzie, J., Raminosoa, N., Rasamoelina, H., Mikolasek, O., & De Verdal, H. (2019). Genetic variation in wild populations and farmed stocks of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Madagascar. *Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire Des Pays Tropicaux*, 72(3), 101-106. Recuperado de <https://doi.org/10.19182/remvt.31780>.

Regitano, L. (2001). Introdução a análise de marcadores moleculares. En Tambasco Daniela (Ed.), *Biología molecular aplicada a produção animal* (pp. 25-39). EMBRAPA.

Rodríguez, H., & García-Ulloa, M. (2009). *Producción de Tilapia en invierno en el norte de Sinaloa*. Fundación Produce Sinaloa, A.C. Recuperado de <https://docplayer.es/93986524-Produccion-de-tilapia-en-invierno-en-el-norte-de-sinaloa.html>.

- Ruiz, L. (2012). Estado de la acuicultura en el Perú. *Revista AquatTIC*, 37(1), 99-106.
Recuperado de http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/37_12.pdf.
- Rutten, M., Komen, H., Deerenberg, M., Siwek, M., & Bovenhuis, H. (2004). Genetic characterization of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 35(2), 93-97. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01090.x>.
- Santos, A., Ribeiro, R., Vargas, L., Mora, F., Alexandre Filho, L., Fornari, D., & Oliveira, S. (2011). Bayesian genetic parameters for body weight and survival of Nile tilapia farmed in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(1), 33-43. Recuperado de <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2011000100005>.
- Satriani, G. I., Soelistyowati, D. T., Hardianto, D., & Aliah, R. S. (2015). Genetic variability of the fifth generation of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* using microsatellite DNA markers. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 10(2), 124-130.
Recuperado de <https://doi.org/10.19027/jai.10.124-130>
- Shelton, W. (2002). Tilapia culture in the 21st century. En: Guerrero, R.D. III & M.R. Guerrero Del Castillo (Eds.), *Proceedings of the International Forum on Tilapia Farming in the 21st Century* (pp 184-204). Philippine Fisheries Association Inc.
- Shinde, D., Lai, Y., Sun, F., & Arnheim, N. (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic acids research*, 31(3), 974–980. Recuperado de <https://doi.org/10.1093/nar/gkg178>.
- Shyamala, G., Karal-Marx, K., & Jeyasekaran, G. (2014). Genetic diversity in farmed Nile and Red Hybrid Tilapia stocks in India using microsatellite Genetic markers. *Journal of Aquaculture In The Tropics*, 29(3-4), 131–143.

- Soto, J., Medina, T., Aquino, Y., & Estrada, R. (2014). Diversidad genética de papas nativas (*Solanum sp.*) conservadas en cultivares nativos del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 20(3), 56-60. Recuperado de <https://doi.org/10.15381/rpb.v20i3.5216>.
- Tave, D., & Smitherman, R. (1980). Predicted response to selection for early growth in *Tilapia nilotica*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109(4), 439-445.
- Tibihika, P., Curto, M., Alemayehu, E., Waidbacher, H., Masembe, C., Akoll, P., & Meimberg, H. (2020). Molecular genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L. 1758) in East African natural and stocked populations. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1), 1-20. Recueperado de <https://doi.org/10.1186/s12862-020-1583-0>.
- Todesco, M., Pascual, M., Owens, G., Ostevik, K., Moyers, B., Hübner, S., Heredia, M., Hahn, A., Caseys, C., Bock, G., & Rieseberg, L. (2016). Hybridization and extinction. *Evolutionary applications*, 9(7), 892–908. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/eva.12367>.
- Torres Jaramillo, J., Muñoz, J. E., Cárdenas, H., Alvarez, L. A., & Palacio, J. D. (2010). Caracterización de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) con marcadores moleculares RAPD. *Acta Agronómica*, 59(2), 236-246. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/16289.
- Yáñez, A. V. (2002). *Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de librerías genómicas enriquecidas de camote (Ipomoeabatatas)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio Institucional UNMSM. Recuperado de https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/805/Ya%c3%bllez_av.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Wahlund, S. (1938). Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*, 11(1), 65-106.

Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1928.tb02483.x>.

IX. ANEXOS

ANEXO A

Tabla 7

Biometría de la población de tilapias (O. niloticus) de Huacho-Lima.

Nº de individuo	Sexo	Peso (g.)	Talla (cm.)	Altura (cm.)
N1	H	17,4	10,5	8
N2	H	44,91	13,5	5,4
N3	M	82,1	13,8	5,4
N4	M	37,96	12,9	5,7
N5	M	20,92	10,5	4,9
N6	M	57,88	13,8	5,5
N7	H	43,88	13,5	5
N8	M	41,24	13,1	6,9
N9	H	28,9	11,7	5,2
N10	M	13,84	9,5	5,6
N11	M	43,52	44,7	4,9
N12	M	54,01	14,5	5,1
N13	M	26,9	11,9	5,8
N14	M	49,95	14	7,2
N15	M	27,89	11,5	5,3
N16	M	44,27	14,5	4
N17	M	31,45	12,5	3,5
N18	M	22,74	10,5	3,3
N19	H	38,49	13	4
N20	H	50,74	15	4,5
N21	M	16,6	10,4	3

N22	M	32,86	13	3,8
N23	M	38,63	12,8	4
N24	H	27,49	11,5	3,5
N25	M	35,01	13	3,8
N26	H	30,46	12	3,7
N27	M	22,12	10,8	3,2
N28	M	23,41	11	3,2
N29	M	23,85	11	3,4
N30	H	19.31	10,5	3,3

Fuente: Elaboración propia.

N: Población de tilapias de Huacho.

H: Tilapia hembra

M: Tilapia macho

Tabla 8*Biometría de la población de tilapias (O. niloticus) de Tarapoto-San Martín.*

N° de individuo	Sexo	Peso (g.)	Talla (cm.)	Altura (cm.)
Nt1	H	134,4	22	8
Nt2	H	88,34	17,2	5,4
Nt3	M	82,1	17,5	5,4
Nt4	H	136,6	20,5	5,7
Nt5	M	149,75	21,5	4,9
Nt6	M	106,94	18	5,5
Nt7	H	62,45	16	5
Nt8	M	110,87	18,2	6,9
Nt9	H	88,5	17	5,2
Nt10	M	81,64	20	5,6
Nt11	H	131,1	18,5	4,9
Nt12	H	108,8	19	5,1
Nt13	H	114,25	20,9	5,8
Nt14	H	129,4	21,8	7,2
Nt15	M	155,3	17	5,3
Nt16	H	77,16	19	5,1
Nt17	H	108,72	25	6
Nt18	M	174,6	25,8	8
Nt19	H	220,1	18,9	8,5
Nt20	H	105,1	20,5	5,7
Nt21	M	123,17	16,5	5,5
Nt22	M	62,7	21,2	4,8
Nt23	H	162,5	20,5	6,5
Nt24	H	129,24	21,4	6,2
Nt25	H	161,19	21,4	7,4
Nt26	H	132,1	20,4	6,1
Nt27	H	130,55	20,3	6
Nt28	M	82,03	17	5,3
Nt29	M	98,05	18,5	5,5
Nt30	H	150,48	21,1	7

Fuente: Elaboración propia.

Nt : Población de tilapias de Tarapoto.

H: Tilapia hembra. M: Tilapia macho.

ANEXO B

Tabla 9

Concentraciones y purzas - diluciones de los ADNs obtenidos con el método Salting Out modificado para la población de Huacho. Las mediciones fueron realizadas usando un Espectrofotómetro Nanodrop Thermo Scientific.

HUACHO					
Individuo	Concentración (ng/μl)	Pureza* A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Dilución 100 ng/ul en 100 ul		
			[Inicial]	ADN	Agua
N1	833,2	2	833,2	12	88
N2	1157,2	1,81	1157,2	8,6	91,4
N3	1137,9	1,89	1137,9	8,8	91,2
N4	900,4	2,07	900,4	11,1	889
N5	1140,9	1,88	1140,9	8,8	91,2
N6	1137,9	1,84	1137,9	8,8	91,2
N7	960,4	1,94	960,4	10,4	89,6
N8	1096,2	1,82	1096,2	9,1	90,9
N9	845,6	2,06	845,6	11,8	88,2
N10	1187,9	1,88	1187,9	8,4	91,6
N11	1144,1	1,9	1144,1	8,7	91,3
N12	1145,5	1,95	1145,5	8,7	91,3
N13	500,3	1,97	500,3	20	80
N14	934,1	1,98	934,1	10,7	89,3
N15	1149,6	2,1	1149,6	8,7	91,3
N16	1072,2	1,91	1072,2	9,3	90,7
N17	876,8	1,94	876,8	11,4	88,6
N18	899,1	1,92	899,1	11,1	88,9
N19	805,6	1,94	805,6	12,4	87,6
N20	1121,4	2,02	1121,4	8,9	91,1
N21	459,1	2	459,1	21,8	78,2
N22	510,2	1,98	510,2	19,6	80,4
N23	694,8	1,95	694,8	14,4	85,6
N24	837,4	2,02	837,4	11,9	88,1
N25	576,4	2,01	576,4	17,3	82,7
N26	563,6	1,98	563,6	17,7	82,3
N27	760,6	2	760,6	13,1	86,9
N28	865,6	1,97	865,6	11,6	88,4
N29	525,2	1,98	525,2	19	81
N30	778,2	1,87	778,2	12,9	87,1

Para ADN valores de A₂₆₀/A₂₈₀ > 1,8 indican alta pureza

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10

Concentraciones y purezas - diluciones de los ADNs obtenidos con el método Salting Out modificado para la población de Tarapoto. Las mediciones fueron realizadas usando un Espectrofotómetro Nanodrop Thermo Scientific.

TARAPOTO					
Individuo	Concentración (ng/μl)	Pureza* A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Dilución 100 ng/ul en 100 UI		
			[Inicial]	ADN	Agua
Nt1	841,1	1,88	841,1	11,9	88,1
Nt2	725,1	1,89	725,1	13,8	86,2
Nt3	937,8	1,88	937,8	10,7	89,3
Nt4	1194,4	1,95	1194,4	8,4	91,6
Nt5	770,2	1,97	770,8	12,9	87,1
Nt6	890,4	1,96	890,4	11,2	88,8
Nt7	1051,5	1,97	1051,5	9,5	90,5
Nt8	851,6	1,97	851,6	11,7	88,3
Nt9	840,4	1,88	840,4	11,9	88,1
Nt10	1105,7	1,88	1105,7	9,04	90,96
Nt11	964,1	1,95	964,1	10,37	89,63
Nt12	924,6	1,96	924,6	10,61	89,39
Nt13	547,6	1,97	547,6	18,26	81,74
Nt14	914,1	1,97	914,1	10,62	89,37
Nt15	629,6	1,97	629,6	15,88	84,12
Nt16	1102,2	1,91	1102,2	9,07	90,93
Nt17	676,8	1,94	676,8	14,78	85,22
Nt18	999,6	1,92	999,6	10	90
Nt19	579,6	1,93	579,6	17,25	82,75
Nt20	1102,1	2,02	1102,1	9,07	90,93
Nt21	659,9	2	659,9	15,15	84,85
Nt22	610,9	1,99	610,9	16,37	83,63
Nt23	1094,1	1,95	1094,1	9,14	90,86
Nt24	737,4	2,03	737,4	13,56	86,44
Nt25	676,4	2	676,4	14,78	85,22
Nt26	663,8	1,99	663,8	15,06	84,94
Nt27	960,5	1,98	960,5	10,41	89,58
Nt28	865,6	1,97	865,6	11,55	88,45
Nt29	785,2	1,98	785,2	12,74	87,26
Nt30	918,4	2	918,4	10,89	89,11

Para ADN valores de $A_{260}/A_{280} > 1.8$ indican alta pureza

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO C

Tablas de caracterización de los marcadores microsatélites en *Oreochromis niloticus*

Tabla 11

Genotipado de los marcadores UNH 138 para la población de Huacho (N1-N30, Individuos de Huacho).

Locus	Alelos	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	N14	N15	N16	N17	N18	N19	N20	N21	N22	N23	N24	N25	N26	N27	N28	N29	N30	Total
UNH138	UNH138(1)	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
	UNH138(2)	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	38
	UNH138(3)	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	14

Fuente: Elaboración propia.

El número 1 indica la presencia del alelo y 0 la ausencia. (UNH 138(1)-1er alelo, UNH 138(2)-2do alelo, UNH 138(3)-3er alelo).

Tabla 12

Genotipado de los marcadores UNH138 para la población de Tarapoto (N1-N30, individuos de Tarapoto)

Locus	Alelos	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	N14	N15	N16	N17	N18	N19	N20	N21	N22	N23	N24	N25	N26	N27	N28	N29	N30	Total
UNH138	UNH138(4)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22
	UNH138(5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	38

Fuente: Elaboración propia

El número 1 indica la presencia del alelo y 0 la ausencia. (UNH 138(4)- 4to alelo, UNH 138(5)-5to alelo).

Tabla 13

Genotipado de los marcadores UNH 222 para la población de Huacho (N1 - N30, Individuos de Huacho).

Locus	Alelos	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	N14	N15	N16	N17	N18	N19	N20	N21	N22	N23	N24	N25	N26	N27	N28	N29	N30	Total	
UNH222(1)		1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	
UNH222																																	
UNH222(2)		0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	31	

Fuente: Elaboración propia.

El número 1 indica la presencia del alelo y 0 la ausencia. (UNH 222(1)-1er alelo, UNH 222(2)-2do alelo).

Tabla 14

Genotipado de los marcadores UNH 222 para la población de Tarapoto (N1 - N30, Individuos de Tarapoto).

Locus	Alelos	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	N14	N15	N16	N17	N18	N19	N20	N21	N22	N23	N24	N25	N26	N27	N28	N29	N30	Total	
UNH222(3)		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	
UNH222																																	
UNH222(4)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	22	
UNH222(5)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	12	

Fuente: Elaboración propia.

El número 1 indica la presencia del alelo y 0 la ausencia. (UNH 222(3)-3er alelo, UNH138 (4)-4to alelo, UNH138(5)-5to alelo).

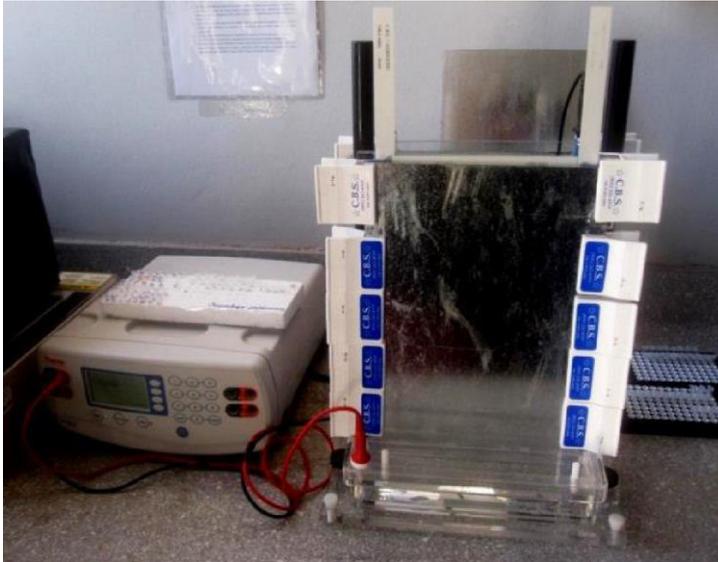
En base al genotipado se procedió a calcular las frecuencias alélicas. Estos cálculos se importaron a Rstudio y por medio del paquete Polysat de Rstudio se obtuvo las frecuencias alélicas. Estas se presentan en la tabla 15.

Tabla 15

Frecuencias alélicas de los marcadores UNH 138 y UNH 222 en las poblaciones de Huacho y Tarapoto.

Población	UNH 138(1)	UNH 138(2)	UNH 138(3)	UNH 138(4)	UNH 138(5)	UNH 222(1)	UNH 222(2)	UNH 222(3)	UNH 222(4)	UNH 222(5)
Huacho	0,13	0,63	0,24	0	0	0,37	0,63	0	0	0
Tarapoto	0	0	0	0,48	0,52	0	0	0,43	0,37	0,2
Promedio	0,065	0,315	0,12	0,24	0,26	0,185	0,315	0,215	0,185	0,1

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO D***Equipo de electroforesis vertical C.B.S. SCIENTIFIC*****Figura 20*****Equipos de electroforesis vertical CBS Scie***

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO E

Composición de las soluciones empleadas en la tesis

Todas las soluciones se deben preparar con agua bidestilada, y deben ser autoclavadas antes de usar a excepción de las soluciones de acrilamida y el Buffer de carga. Verificar el pH final. Se indican a continuación las concentraciones finales de los componentes para cada solución:

1) Buffer de Lisis TNE- UREA (Método modificado)

Tris 20 mM, NaCl 400 mM, EDTA 20 mM, Urea 5 M (pH = 7,5)

2) Buffer TBE 10X

Tris 0,89 M, Ácido Bórico 0,89 M, EDTA 0,02 M (pH = 7,5)

3) Solución Stock de Acrilamida 21 % (AKA 21 %)

Acrilamida 20%, Bis-Acrilamida 1%

4) Solución de Acrilamida 6 % DENATURANTE (Solución de trabajo)

AKA 6 %, TBE 1X, Urea Grado BM 9 M

5) Soluciones TE 20:1/TE 20:5

Tris 20 mM, EDTA 1 mM / Tris 20 mM, EDTA 5 mM (pH = 8)

6) Buffer de Carga 6X (Loading Buffer 6X)

Glicerol 30 %, Azul de bromofenol 0,25 %, Xilencianol 0,25 %, TBE 1X

7) Buffer Formamida (Loading Buffer)

Formamida 90 %, Azul de Bromofenol 0,1 %, Xilencianol 0,1 %, TBE 1X