

**Caracterización genética, fenotípica y productiva de la tilapia en
Antioquia, Colombia**

Andrés Felipe Montoya López

Director

Ariel Marcel Tarazona Morales. Ph.D

Co-directora

Martha Olivera Ángel. Dr. Sci. Agr.

Doctorado en Ciencias Animales

Universidad de Antioquia

2018

Agradecimientos

Quiero expresarle mi gratitud a los profesores Ariel Tarazona y Martha Olivera. De igual manera agradezco al: Programa de Doctorado en Ciencias Animales - Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, Programa Nacional de Formación de Investigadores - crédito educativo condonable de Colciencias convocatoria 567 de estudios de doctorado en Colombia y al convenio 4600000970 Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia – ASOACUICOLA del Fondo de Ciencia Tecnología e Innovación, Sistema General de Regalías.

Tabla de Contenido

Lista de tablas	iii
Lista de figuras.....	vi
Resumen general.....	ix
Abstract.....	x
Introducción general.....	1
Objetivos	21
Capítulo 1 Genetic diversity of four broodstocks of tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.) from Antioquia, Colombia	22
Capítulo 2 Identificación de tilapias (Cichliformes:Cichlidae) ferales en embalses del norte de los Andes mediante código de barras de ADN	61
Capítulo 3 Body shape variation between farms of tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.) in colombian Andes using landmark-based geometric morphometrics	91
Capítulo 4 Desempeño productivo de cuatro procedencias de tilapia roja (<i>Oreochromis</i> sp.) de Antioquia (Colombia) en condiciones subóptimas constantes de temperatura y temperatura variable en zona de montaña	110
Capítulo 5 Transcriptome analysis of tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) exposed to suboptimal temperatura	128
Conclusiones generales.....	155
Recomendaciones	159
Anexos	164

Lista de tablas

Capítulo 1.

Table 1. Microsatellites used in the present study.....	30
Table 2. Volumes and concentrations of components for multiple reactions....	33
Table 3. Molecular identification results per locus for four broodstocks tilapia in Antioquia, Colombia.	37
Table 4. Genetic diversity per broodstock from 10 microsatellites, excluding null alleles and loci with linkage disequilibrium	43
Table 5. Expected heterozygosity (H_e) and observed heterozygosity (H_o) per population calculated from different microsatellite groups.....	43
Table 6. Results of molecular variance analysis (AMOVA)	45
Table 7. Comparison of results obtained by previous microsatellite studies in wild and cultivated tilapia populations..	50

Capítulo 2.

Tabla 1. Caracteres diagnósticos morfométricos y merísticos para la identificación de cuatro especies de <i>Oreochromis</i>	83
Tabla 2. Identificadores de acceso a GenBank de las secuencias originales obtenidas en el presente estudio.	85
Tabla 3. Resumen de las distancias genéticas totales, adentro y entre los grupos utilizando el método de dos parámetros de Kimura.	86
Tabla 4. Unidades taxonómicas operativas (UTO) obtenidas mediante el análisis GMYC	87

Capítulo 3.

Table 1. Water quality parameters of the three farms evaluated in the present study from Betancur <i>et al.</i> (2016).....	104
Table 2. Water quality parameters of the three farms evaluated in the present study from Betancur <i>et al.</i> (2016) cont.	105

Capítulo 4.

Tabla 1. Resultados experimento 1, temperatura subóptima constante.	125
Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos del agua durante el experimento 2.	125
Tabla 3 . Resultados de la primera etapa del experimento 2.	126
Tabla 4. Resultados de la segunda etapa del experimento 2.	126
Tabla 5. Costo del alimento por Kg de biomasa húmeda para el experimento 2 completo	127

Capítulo 5.

Table 1. Representative DEGs between 22.40 ± 1.76 C (treatment) and 30.32 ± 1.02 °C (control) groups for Oreonil1.0 dataset.....	145
Table 2. Representative DEGs between 22.40 ± 1.76 C (treatment) and 30.32 ± 1.02 °C (control) groups for ASM185804v2 dataset.....	146
Table 3. Representative gene ontology terms from the complete DEGs lists	147
Table 4. Representative gene ontology terms from the upregulated DEGs lists	148
Table 5. Representative gene ontology terms from the downregulated DEGs lists	149

Recomendaciones

Tabla 1. Cruces dialélicos sugeridos.....	163
---	-----

Lista de figuras

Capítulo 1.

Figure 1. Structural population analysis to determine number of clusters (K) in tilapia broodstocks in Antioquia, Colombia.....	44
Figure 2. Assignment of each individual from the four broodstocks to K = 2, 3, or 4	46

Capítulo 2.

Figura 1. Ubicación de los embalses donde se tomaron las muestras para el presente estudio.....	88
Figura 2. Árbol Neighbor-Joining a partir del método de dos parámetros de Kimura que incorporó 81 secuencias originales y 28 secuencias de referencia de un fragmento del gen mitocondrial, Citocromo C oxidasa subunidad I.	89
Figura 3. Árbol ultramétrico que incorporó 81 secuencias originales y 28 secuencias de referencia de un fragmento del gen mitocondrial, Citocromo C oxidasa subunidad I.	90

Capítulo 3.

Figure 1. Representative images for each group of tilapia examined.....	106
Figure 2. Position of landmarks used in the present study.....	107
Figure 3. Group centered scores of the regression between Procrustes coordinates and log-transformed centroid size.....	108
Figure 4. Canonical variate analysis (CVA) of the covariance matrix of the shape coordinates.....	109

Capítulo 4.

Figura 1. Diseño experimento 2.	123
Figura 2. Variación temporal de la temperatura del agua en las tres granjas del municipio de Cocorná.	123
Figura 3. Variación temporal de la temperatura del agua en las tres granjas del municipio de San Carlos.	124
Figura 4. Diagrama de caja para la tasa específica de crecimiento en la segunda fase del experimento 2.	124

Capítulo 5.

Figure 1. Comparison of DEGs found in 22.40 ° C treatment versus 30.32 ° C control of two reference transcriptomes.	150
Figure 2. Principal components analysis of variance stabilizing transformed gene expression values for the 500 most variable genes in Oreonil1.0 dataset.	151
Figure 3. Principal components analysis of variance stabilizing transformed gene expression values for the 500 most variable genes in ASM185804v2 dataset.....	152
Figure 4. Hierarchical clustering and heat map of DEGs with a fold change ≥ 2.0 with the variance stabilizing transformation in Oreonil1.0 dataset	153

Figure 5. Hierarchical clustering and heat map of DEGs with a fold change ≥ 2.0 with the variance stabilizing transformation in ASM185804v2 dataset..... 154

Resumen general

La tilapia es una de las especies más importantes en la acuicultura mundial. En Colombia, esta especie representa el mayor porcentaje de la producción piscícola. Con el objetivo de caracterizar molecular y fenotípicamente algunas de las poblaciones cautivas y ferales de tilapia en el departamento de Antioquia, en la presente tesis se estudiaron: 1. La diversidad genética de los reproductores de granjas dedicadas a la producción de alevinos; 2. La identificación molecular de poblaciones silvestres en embalses; 3. Las variaciones en la forma del cuerpo entre individuos de diferentes granjas; 4. El desempeño productivo de alevinos comerciales en condiciones de pequeños productores y 5. Los cambios transcripcionales en individuos expuestos a temperatura subóptima. Los resultados obtenidos mostraron que: 1. La heterocigocidad de los grupos de reproductores analizadas fue media-alta, el grupo Nilótico estuvo claramente diferenciado, mientras que los reproductores rojos presentaron baja estructuración; 2. En los embalses Peñol-Guatapé, Playas, San Lorenzo, Punchiná, Porce II y Porce III fue posible identificar haplotipos de *Oreochromis urolepis*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* y *Coptodon rendalli*; 3. Existieron diferencias en la forma del cuerpo entre las granjas estudiadas, particularmente los individuos nilóticos fueron más elongados y presentaron una posición más ventral del extremo posterior de la órbita, mientras que las granjas rojas se diferenciaron entre sí por la profundidad del cuerpo y el tamaño de la cabeza; 4. En condiciones de cultivo de pequeños productores en zona de montaña se registraron altas variaciones en las características ambientales y existieron diferencias en la tasa específica de crecimiento entre los orígenes de tilapia evaluados; 5. De acuerdo con el método empleado, se identificaron hasta 1,554 genes expresados diferencialmente en individuos expuestos durante 13 días a una temperatura de 22.40 ± 1.76 °C comparado con el control a 30.32 ± 1.02 °C. A partir de estos resultados, se concluye que existe una diversidad genética importante tanto en poblaciones cautivas como ferales, así como una alta variabilidad en la morfología y en la respuesta productiva de las diferentes semillas comerciales de tilapia en Antioquia. Adicionalmente se proponen genes candidatos como marcadores de estrés térmico en tilapia.

Abstract

Tilapia is one of the most important fish in aquaculture worldwide. In Colombia, this species is the most farmed fish. The aim of this thesis was to characterize the genetics and phenotypic traits of some captive and feral populations of tilapia in Antioquia, Colombia. Therefore, the following studies were conducted: 1. Characterization of genetic diversity of four broodstocks, 2. Molecular identification of feral populations in reservoirs, 3. Description of the shape variation of two red and one Nile tilapia farmed populations; 4. Comparison of productive performance of four local red tilapia strains in the conditions of smallholders in mountain area and 5. Description of transcriptomic changes of Nile tilapias exposed to sub-optimal water temperature. The results of these studies showed that: 1. The four Antioquia tilapia broodstocks showed medium to high heterozygosity, the Nile group was clearly differentiated, whereas the red broodstocks presented low structuring, 2. In Peñol-Guatapé, Playas, San Lorenzo, Punchiná, Porce II and Porce III reservoirs was possible to identify five haplotypes of tilapia belonging to *Oreochromis urolepis*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* and *Coptodon rendalli*. 3. There were morphological differences between farms. Fishes from the Nile farm were more elongated and had a more ventral position of the posterior extreme of the orbit than the red individuals. Additionally, the red groups were separated by body depth and head size. 4. The water conditions of smallholders in mountain area were highly variable and some productive characteristics showed differences between local strains of red tilapia. 5. Depending on the method used, up to 1,554 differential expressed genes were found in tilapias exposed to water temperature of 22.40 ± 1.76 C compared to those exposed to 30.32 ± 1.02 °C for 13 days. From these results, it is concluded that there is an important genetic diversity in both captive and feral populations, as well as a high variability in the morphology and in the productive response of local strains of Antioquia. Additionally, candidate genes are proposed as heat stress markers in tilapia.

Introducción general

La población humana creciente, que se proyecta alcance los 9.600 millones de habitantes en 2050, necesita superar múltiples desafíos; uno de ellos es la producción de proteínas animales en un contexto de recursos naturales limitados y externalidades ambientales negativas sin precedentes (Fry et al. 2018). Por lo anterior, las especies de cultivo no solo necesitan aumentar su productividad respecto a crecer más rápido sino, también deben ser más eficientes en convertir alimento consumido a biomasa (de Verdal et al. 2017a). La acuicultura es la tecnología de producción de alimentos de más rápido crecimiento en el mundo (Anderson et al. 2017). En el año 2014, el cultivo de animales acuáticos a nivel global ascendió a 73,8 millones de toneladas, con un valor estimado de US \$ 160 mil millones. Este total, comprendió 49,8 millones de toneladas de peces (valoradas en US \$ 99 mil millones), 16,1 millones de toneladas de moluscos (US \$ 19 mil millones), 6,9 millones de toneladas de crustáceos (US \$ 36 mil millones) y 7,3 millones de toneladas de otros animales acuáticos incluyendo anfibios (US \$ 3.7 mil millones) (FAO, 2016).

La tilapia es uno de los peces comestibles de agua dulce más productivos y comercializados internacionalmente (Wang and Lu 2016). En la acuicultura mundial, esta es la quinta especie más importante en términos de valor y cantidad producida, equivalentes a 3.93 millones de toneladas valoradas en US \$ 6 mil millones en el año 2015 (FAO, 2017). En diferentes países del continente americano, la tilapia es la principal especie de pez cultivada (ACEB, 2014; CONAPESCA, 2013; FAO, 2013). En el año 2016, las tilapias (*Oreochromis* sp.) representaron el 61.25% (66.946 toneladas) de las 109.300 toneladas que producidas en la piscicultura de Colombia (MINAGRICULTURA 2017).

Los programas de selección correctamente diseñados han revolucionado la eficiencia biológica de la producción vegetal y animal mediante el desarrollo de líneas de alto rendimiento (Gjedrem et al. 2012). Un programa de selección en piscicultura trata de aparear solo los peces que se consideren más adecuados

para un objetivo particular (más grandes, con mayor crecimiento, aquellos con el color deseado, etc.) con la esperanza de que los peces reproductores elegidos puedan transmitir sus características a su descendencia. Si esto ocurre, la próxima generación será más valiosa porque los peces crecerán más rápido, lo que aumentará la productividad por área; los peces crecerán más eficientemente, lo que reducirá los costos de alimentación; o los peces tendrán un color de cuerpo más deseado, lo que aumentará su valor en el mercado (Tave 1995).

El estado de los programas de selección y el nivel de tecnología utilizado para la producción de especies acuáticas son muy variados, desde el uso de semilla silvestre hasta la selección familiar que incorpora herramientas genómicas (Yáñez et al. 2015). Un ejemplo de estos extremos es la producción acuícola europea, en donde más del 80% de la semilla utilizada proviene de la cría selectiva y en la cual la respuesta acumulada en la selección para el peso a la cosecha varía de +65% para rodaballo a +900% para trucha (Janssen et al. 2017).

La cría selectiva aprovecha la variación genética que existe para muchos de los caracteres con cualidades deseables. En este sentido, uno de los primeros pasos en un programa de selección es la recolección del material genético que formará la población base y que debe asegurar el mantenimiento de una amplia variabilidad genética (diversidad alélica) que permita una respuesta de selección apropiada a largo plazo (Gjedrem and Baranski 2009). Por lo anterior, previo a la utilización de cruces controlados para evaluar el valor genético de los individuos o el grado de varianza genética aditiva para rasgos particulares, se deben tomar decisiones sobre qué poblaciones cautivas o silvestres se deben usar como fuentes para establecer dicha población base (Loughnan et al. 2016).

Un número importante de productores de tilapia (principalmente pequeños productores) se encuentran en zonas de montaña en el departamento de Antioquia. En estos lugares, la temperatura ambiental es cálida pero la temperatura del agua puede ser subóptima (menor a 22°C) y presentar grandes

variaciones. Adicionalmente, los pequeños productores de tilapia de Antioquia enfrentan el reto de utilizar semilla de tilapia sin información sobre su comportamiento productivo en sus condiciones particulares.

El propósito del presente estudio, fue analizar la variación genética, fenotípica y productiva de algunas poblaciones de cultivo, así como la riqueza de especies ferales de Tilapia en el departamento de Antioquia para aportar información esencial en el establecimiento de una población base para un posible programa de selección asistido por marcadores moleculares para estrés térmico en el contexto de productores en zona de montaña. Esta tesis se desarrolló debido a la falta de información primaria y experimental que existe en la producción de Tilapia y en la acuicultura en general del departamento de Antioquia así como un aporte de elementos novedosos en el contexto de la acuicultura nacional.

El eje articulador de la presente tesis fue la identificación de la variabilidad tanto fenotípica como genética en poblaciones de producción y ferales (capítulos 1 a 4) profundizando en la expresión diferencial génica a temperaturas subóptimas (capítulo 5) como las que se pueden encontrar en condiciones de pequeños productores en zona de montaña en el departamento de Antioquia, para entender mejor la respuesta al estrés ambiental en la búsqueda de marcadores moleculares para programas de selección. En este sentido, en el primer capítulo se analizan la estructura y diversidad genética de reproductores de tilapia de las principales granjas productoras de alevinos del departamento de Antioquia, mientras que en el segundo capítulo se identifican las especies tilapias ferales de tilapia en algunos embalses de este departamento, suponiendo que una mayor riqueza de especies potencialmente aporta mayor diversidad genética en un programa de selección para tilapia. En el tercer capítulo, se caracteriza y compara la forma del cuerpo de las tilapias cultivadas en diferentes granjas del departamento de Antioquia mediante morfometría geométrica, como una propuesta de análisis fenotípico en programas de selección. En el cuarto capítulo se compara el desempeño productivo de diferentes semillas comerciales de tilapia producidas en el departamento de Antioquia bajo condiciones constantes y de pequeños productores en zona de montaña. Los individuos estudiados en el primer

capítulo son los reproductores de los cuales descienden los peces analizados en los capítulos 3, 4 (excepto Til4) y 5. Finalmente, en el último capítulo se identifican genes expresados diferencialmente en tilapia bajo condiciones subóptimas de temperatura mediante análisis del transcriptoma completo.

El programa GIFT fue una investigación colaborativa formada en 1988 por el “*WorldFish Center*” (anteriormente, “*ICLARM*”) y sus socios de Filipinas y Noruega, destinado a desarrollar metodologías para programas de selección de peces tropicales de importancia en la acuicultura (Ponzoni et al. 2010). Este proyecto, demostró que la aplicación de métodos de selección animal tradicionales a una población genéticamente variable de tilapia del Nilo, dió como resultado una respuesta genética considerable en la tasa de crecimiento, en el rango de +10% a +14% por generación para el peso a la cosecha (Bentsen et al. 2017). Diferentes reportes muestran que a nivel global los grupos de tilapia derivados de GIFT, continúan presentando una respuesta a la selección para el peso a la cosecha de +11.9% a +14% por generación (Thodesen et al. 2013; Hamzah et al. 2014).

Entre los años 2007 y 2011, se desarrolló el programa para el mejoramiento de la tilapia en Colombia, liderado por el Ministerio de Agricultura, CENIACUA, INCODER y ACUANAL. La población base de este programa estuvo constituida por grupos cultivados en diferentes departamentos del país, así como por individuos ferales. Este proyecto, evidenció la variabilidad en las respuestas productivas entre los diferentes orígenes de tilapia y ambientes de Colombia evaluados (Erazo 2017). Brinez, Caraballo, & Salazar (2011) evaluaron la diversidad genética de algunas de las poblaciones del programa para el mejoramiento de la tilapia en Colombia. Estos autores, utilizando un grupo de cinco microsatélites en seis poblaciones provenientes de cuatro departamentos (excluyendo Antioquia) encontraron que la heterocigosidad esperada estuvo entre 0.586 y 0.837. Adicionalmente, todas las poblaciones mostraron desviaciones significativas de equilibrio de Hardy–Weinberg, debido principalmente a la falta de heterocigotos y el índice de fijación sugirió una diferenciación genética entre las poblaciones.

Entre las procedencias usadas y sus cruces en el programa para el mejoramiento de la tilapia en Colombia, Pulgarin (2012) encontró que la heterosis para ganancia de peso y sobrevivencia varió de -23.17% a +34.4% y entre -27.48 a +14.85 respectivamente. Este mismo autor, reporta una habilidad combinatoria general para ganancia de peso entre -6.55 (población Caldas) a +27.25 (Llanos Orientales) con la población de Antioquia obteniendo un valor de +0.05. Por otro lado, los valores de habilidad combinatoria general para sobrevivencia estuvieron entre -2.6 (Córdoba) y +3.9 (Antioquia).

El departamento de Antioquia es el tercero en producción piscícola en Colombia, aportando el 6% de la producción del país en 2016 equivalentes a 6.589 toneladas (MINAGRICULTURA 2017). Subregiones de este departamento como son el bajo Cauca, Magdalena medio y Urabá, tienen condiciones geográficamente aptas para el cultivo de tilapia por sus suelos con pendientes menores a 3%, altura sobre el nivel del mar menor a 1.000 metros (URPA 2011) y temperatura del agua superior a 25°C. En Antioquia son pocos los trabajos que se han realizado en mejoramiento de genético de tilapia. Por ejemplo, Pineda, Taborda, & Hernández (2013) evaluaron la progenie de cruzamientos entre individuos de diferente coloración para realizar selección por conformación corporal basada en la longitud total y profundidad del cuerpo. Sin embargo, no existe información sobre la estructura y variabilidad genética de los reproductores del departamento, la identificación molecular de las poblaciones ferales, la respuesta productiva de la semilla o la variación fenotípica entre granjas.

Los beneficios netos acumulados estimados de la adopción del cultivo de tilapia genéticamente mejorada en Ghana a lo largo de veinte años con un descuento del 5%, oscilaron entre más de 130 millones de dólares y cerca de 650 millones de dólares, con una probabilidad de alrededor del 40% de que el valor actual neto sea superior a 400 millones de dólares (Ansah et al. 2014). En el año 0 de un programa de mejoramiento en tilapia, no hay ingresos, pero es el año en el que se realiza la inversión inicial, por lo que el beneficio económico es negativo. En el año 1, el valor del beneficio económico es incluso más negativo debido a los costos de las pruebas y a la ausencia de retornos. Los

rendimientos aparecen por primera vez en el año 2, y el punto de equilibrio (cuando el valor del beneficio económico cambia de negativo a positivo) ocurre entre el segundo y el tercer año. Para el año diez, el beneficio económico se calcula en cuatro millones de dólares y la relación costo/beneficio en 8,5 (Ponzoni et al. 2007).

En el estudio de Omasaki et al. (2017) se analizó el valor económico para diferentes objetivos de selección en el cultivo de tilapia del Nilo de pequeños piscicultores en estanques de tierra en Kenia. Estos autores, encontraron que al mejorar el coeficiente de crecimiento térmico, se redujo el período de crecimiento, aumentando el número de ciclos de producción en las granjas. Sin embargo, los peces de mayor crecimiento consumen más oxígeno, por lo cual es necesario mejorar la tasa de conversión alimenticia y utilizar densidades poblacionales más bajas para evitar limitaciones de oxígeno.

De acuerdo con la revisión de Ansah et al. (2014) históricamente y desde un punto de vista social, el uso más importante de las tilapias ha sido la producción para consumo doméstico, con millones de pequeños piscicultores en más de 100 países complementando su dieta con tilapia. También se ha producido un aumento constante del número de la tilapia de propiedad familiar comercializa microempresas en muchos países. Los peces a menudo son recuperados de estanques o tanques cercanos, limpiados, fritos y puestos a la venta. Esta tilapia frita proporciona una considerable proporción de proteínas y calorías en la dieta en estos países en desarrollo. Adicionalmente en las condiciones del departamento de Antioquia, la venta de animales vivos para pesque y pague así como la actividad de pesca directa por parte de turistas en granjas de pequeños productores genera un mayor precio de venta de los peces comparado con la venta en el mercado mayorista de Medellín. Por otro lado según la revisión de Yosef (2009) la industria de la tilapia proporciona empleo en la excavación de estanques, fabricación de jaulas y redes, alimentación y recolección de peces, clasificación, transporte, procesamiento, venta, entre otros. En esta industria, las granjas dedicadas a la producción de alevinos emplea un promedio de 3.4 personas por hectárea y las diferentes

operaciones de la industria son inclusivas para las mujeres comparadas con otras actividades agropecuarias.

Los programas de selección pueden disminuir el factor de conversión alimenticia en la producción de Tilapia (de Verdal et al. 2017b). Esto significa menos alimento para obtener un kg de carne, lo que supone una disminución de los impactos ambientales de la acuicultura al requerir menos insumos (como por ejemplo torta de soya, harina de pescado, etc.) que generalmente son producidos lejos de las granjas y tienen sus propios problemas ambientales (como por ejemplo degradación de suelos, sobrepesca, pérdida de biodiversidad, etc. Ilea, 2009). Con esta disminución de la conversión, también se disminuye la huella de carbono al ser necesarios menos combustibles fósiles para el transporte de materias primas por kg de carne producido y menos emisiones de carbono en la producción agrícola de materias primas por kg de tilapia (Pelletier and Tyedmers 2010). De igual manera, al mejorar el coeficiente de crecimiento térmico, se puede llegar a producir más carne de tilapia por año en la misma granja. Lo anterior conlleva a un mejor uso de la infraestructura y los equipos y una disminución en la huella hídrica por el aumento de la producción de carne por m³ de agua utilizado (Besson et al. 2016). Por otro lado, los programas de selección junto con una adecuada formulación y manejo del alimento pueden reducir las emisiones de sólidos suspendidos orgánicos, Nitrógeno y Fósforo por Kg de carne producida en los efluentes de las granjas de Tilapia.

Los marcadores de ADN que están estrechamente vinculados a genes importantes desde el punto de vista productivo, se pueden utilizar como herramientas moleculares para la selección asistida (MAS). Lo anterior, implica el uso de la presencia o ausencia de un marcador como complemento a la selección fenotípica (Collard et al. 2005). Idealmente, estos marcadores deberían localizarse en la mutación causal de la variación fenotípica (Yue 2014).

Uno de los principales ejemplos de un programa de MAS en acuicultura es el trabajo de Fuji et al. (2007). Esto autores describieron como un alelo del microsatélite Poli9-8TUF, fue dominante y responsable de la resistencia a la

linfocistis en el lenguado verde oliva. A partir de esta información, estos autores criaron una nueva población de lenguado verde oliva producida mediante el cruce de una hembra homocigótica para el alelo resistente y un macho de una población comercial criada para una mayor tasa de crecimiento y forma corporal. Los peces originados de este cruce fueron probados en granjas comerciales y no presentaron linfocistis comparados con una incidencia de esta patología de 4.5% a 6.3% en las granjas control que no contaban con individuos con el alelo resistente.

En tilapia, los programas MAS han sido utilizados en la producción de poblaciones monosexo. Un método efectivo de producir individuos genéticamente machos a gran escala es el cruce de hembras normales (XX) con supermachos (YY). Sin embargo existe una dificultad para la identificación rápida de los genotipos X y Y. Por esta razón, Sun et al. (2014) desarrollaron un marcador ubicado en el grupo de ligamiento 23 cercano al locus predicho para la determinación sexual, que presentó para el genotipo X una banda 440 pares de bases mayor a la que se encuentra en el genotipo Y.

En términos prácticos, la mayoría de los rasgos productivos están determinados por un gran número de genes, cada uno aportando un pequeño efecto, por lo que los programas basados en MAS son ineficientes en muchos casos (Blasco and Pena 2018). Por ejemplo, en el Salmón del Atlántico, existe evidencia de que regiones de los cromosomas 13, 18, 19 y 20 afectan la ganancia de peso (Tsai et al. 2015). En otras especies mejor estudiadas que las utilizadas en piscicultura como los bovinos, se estima que la producción de leche puede estar afectada por entre 2.000 a 10.000 genes (Meuwissen et al. 2016).

Un mapa de ligamiento es una lista ordenada de marcadores genéticos ubicados a lo largo de los cromosomas en el genoma. La construcción de un mapa de ligamiento requiere cuatro componentes principales: marcadores polimórficos, plataformas de genotipificación, familias de referencia y software para el análisis de ligamiento (Yue 2014). Diferentes mapas de ligamiento han sido reportados en tilapias. Por ejemplo, mapas basados en microsatélites para individuos F2 del cruce entre *O. niloticus* y *O. aureus* (Lee et al. 2005) así como

para individuos producto del el cruce entre *O. mossambicus* y *Oreochromis* sp. (Liu et al. 2013). Por otro lado, Guyon et al. (2012) construyeron mapas híbridos de radiación de alta resolución y mapas mediante hibridación *in situ* para *O. niloticus*.

Un QTL es una región cromosómica que incluye un gen único o grupos de genes que afectan un rasgo cuantitativo (Pang et al. 2017). Si bien en tilapia, se han sido identificados QTL principalmente para determinación sexual (Eshel et al. 2011; Palaiokostas et al. 2015), existen diversos trabajos de QTL en Tilapia para inmunidad innata, respuesta al estrés, parámetros bioquímicos de la sangre, tolerancia a bajas temperaturas y tamaño de los peces en individuos F2 del cruce entre *Oreochromis mossambicus* y *Oreochromis aureus* (Cnaani et al. 2003; Cnaani et al. 2004), color del cuerpo en individuos F2 de cruce entre *Oreochromis niloticus* y *O. aureus* (Lee et al. 2005), contenido de omega 3 en individuos F2 del cruce entre *O. mossambicus* y *Oreochromis* sp. roja (Lin et al. 2018) y tolerancia a salinidad en *O. niloticus* (Gu et al. 2018) entre otros. Sin embargo, los QTL detectados en muchas poblaciones experimentales a menudo implicaron el cruce de líneas genéticamente divergentes y no son aplicables universalmente a todas las poblaciones de producción debido a la inconsistencia entre marcadores y QTL entre poblaciones, efectos QTL con otros factores genéticos y ambientales así como la sobre estimación del efecto QTL (Nguyen 2016). Adicionalmente, solo un pequeño número de los QTL identificados en cruces experimentales, han sido confirmados posteriormente y se les ha realizado mapeo fino (Yue 2014).

La disponibilidad de un gran número de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en especies de cultivo (por ejemplo Hong Xia et al., 2015, reportaron cerca de 1.4 millones de SNP en los genomas de tilapia GIFT, roja, *O. niloticus* silvestre y *O. mossambicus*) ha permitido la búsqueda de las mutaciones subyacentes a la variación en rasgos complejos a través del uso de estudios de asociación del genoma completo (GWA) (Goddard and Hayes 2009). Este tipo de estudios, prueban la asociación de cada SNP con el rasgo de interés. La suposición básica de los GWA es que las asociaciones significativas se presentan porque el SNP está en desequilibrio de ligamiento con (y por lo tanto

cerca de) una mutación causal que afecta el rasgo de interés (Hayes and Goddard 2010).

El término secuenciación de próxima generación (NGS) continúa siendo la forma popular de describir los métodos de secuenciación de muy alto rendimiento, en los cuales, millones o miles de millones de observaciones se realizan en paralelo durante la ejecución de un solo programa en un único instrumento (Levy and Myers 2016). En la última década, las tecnologías NGS han aumentado su capacidad por un factor de 100 a 1,000 y han incorporado innovaciones revolucionarias para abordar las complejidades de los genomas que impulsan investigaciones que se consideraban casi imposibles hace unos pocos años (Goodwin et al. 2016). De esta manera, es posible estudiar: el transcriptoma completo (RNA-seq) de una sola célula (Jaitin et al. 2014), la metilación del genoma completo (Soto et al. 2016), los sitios de unión de factores de transcripción en el genoma completo (Bartlett et al. 2017) el diagnóstico genético de enfermedades (Xue et al. 2015), la evaluación prenatal no invasiva (Chitty et al. 2015) así como la secuenciación *de novo* (Schmidt et al. 2017) y metagenómica (Crofts et al. 2017), etc.

Actualmente, una combinación de SNP, GWA y RNA-seq se utiliza para detectar variantes que afecten rasgos de interés, profundizando en los mecanismos funcionales que los determinan (eQTL y QTL-seq, Westra et al. 2013; Nishida et al. 2017). Una manera de llevar a cabo este tipo de experimentos es mediante el análisis de segregantes agrupados (BSA), en el cual se agrupan muestras de ADN de progenie que exhibe fenotipos contrastantes y se identifican marcadores que muestran diferencias entre los dos grupos utilizando resecuenciación del genoma completo y análisis de expresión diferencial (Takagi et al. 2013). Mediante el uso de QTL-seq, Li et al. (2017) identificaron regiones del genoma asociadas con tolerancia a hipoxia en tilapia GIFT y evidenciaron la expresión diferencial de los genes GPR132 y ABCG4. Por otro lado, Gu et al. (2018) usaron QTL-seq y análisis basado en ligamiento para tolerancia a salinidad en tilapia GIFT. Estos autores encontraron una región QTL localizada a 23.0 Mb del grupo de ligamiento 18 y que explicó 79% de la variación fenotípica para tolerancia a salinidad. De igual

manera, los genes LACTB2, KINH, NCOA2, DIP2C, LARP4B, PEX5R, y KCNJ9 cerca del QTL identificado tuvieron una expresión diferencial en intestino, cerebro o branquia a diferentes salinidades.

Es necesaria una comprensión más completa de la arquitectura genética responsable del crecimiento, la reproducción y la respuesta al estrés para criar poblaciones más productivas y eficientes en la industria acuícola. De esta manera, los modelos genéticos necesitan ser respaldados por datos experimentales, los bordes exón-intrón deben ser definidos, se deben identificar los transcritos diferencialmente así como la expresión y función de los genes necesitan ser estudiados con más detalle (Abdelrahman et al. 2017).

Los marcadores de ADN nuclear como los microsatélites, proporcionan más opciones en el manejo de las poblaciones de peces porque siguen un modo de herencia biparental y tienen aplicaciones más prácticas para describir la estructura genética, particularmente en poblaciones de cultivo (Romana-Eguia et al. 2018). Sin embargo, la combinación de marcadores genéticos es un enfoque deseable para caracterizar la estructura y variabilidad genética de una población puesto que permiten promediar la señal evolutiva proporcionada por muchos loci e inferir eventos demográficos históricos o recientes sobre las diferentes tasas mutacionales de las regiones genómicas (Cuéllar-Pinzón et al. 2016).

El análisis del estado genético y la identificación de las especies de tilapias cultivadas en el mundo se han complicado debido a las múltiples introducciones de diferentes especies, las dificultades en la resolución taxonómica, la aplicación generalizada de hibridación interespecífica y la introgresión híbrida en algunas poblaciones. Esto hace que sea muy importante la historia de cualquier stock para evaluar su potencial en acuicultura y para interpretar mejor los resultados del creciente número de estudios genéticos y genómicos realizados en tilapia (McAndrew et al. 2016).

El presente estudio, beneficiará a los piscicultores de Tilapia del departamento de Antioquia, puesto que muestra las diferencias productivas entre las

principales semillas procedentes de este departamento y que pueden aplicar en sus condiciones particulares. De igual manera, el presente estudio evidencia restricciones en algunos parámetros fisicoquímicos del agua que se presentan en el cultivo de esta especie en Antioquia y en los cuales los piscicultores se deben enfocar para mejorar su productividad. Por otro lado, entidades del estado colombiano se pueden beneficiar de los resultados que se presentan en este escrito, como por ejemplo la Secretaría de Agricultura de la Gobernación de Antioquia, la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca así como el Ministerio de Medio Ambiente y las Corporaciones Autónomas Regionales en lo relacionado con los resultados del fomento productivo con tilapia en pequeños piscicultores en zonas de montaña, la caracterización de la diversidad genética para la elaboración de directrices para la producción de semilla certificada en piscicultura y manejo genético de reproductores así como la identificación molecular de poblaciones ferales de Tilapia. Por último, los académicos del área acuícola pueden encontrar resultados atractivos que permitan el desarrollo de futuras investigaciones y la continuidad hacia un programa formal de selección de Tilapia en el departamento de Antioquia.

Referencias

Abdelrahman H, ElHady M, Alcivar-Warren A, Allen S, Al-Tobasei R, Bao L, Beck B, Blackburn H, Bosworth B, Buchanan J et al. (2017) Aquaculture genomics, genetics and breeding in the United States: Current status, challenges, and priorities for future research. *BMC Genomics* 18:1–23. doi: 10.1186/s12864-017-3557-1

ACEB AC e EB (2014) 1º Anuário brasileiro da pesca e aquicultura. ITAIPU Binacional, Ministério da Pesca e Aquicultura

Anderson JL, Asche F, Garlock T and Chu J (2017) Aquaculture: Its Role in the Future of Food. In: Schmitz A, Kennedy P and Schmitz T (eds) *Frontiers of Economics and Globalization* volume 17 *World Agricultural Resources and Food Security*. Emerald Publishing, pp 159–173

Ansah YB, Frimpong EA and Hallerman EM (2014) Genetically-improved tilapia strains in Africa: Potential benefits and negative impacts. *Sustain* 6:3697–3721.

doi: 10.3390/su6063697

Bartlett A, O'Malley RC, Huang SSC, Galli M, Nery JR, Gallavotti A and Ecker JR (2017) Mapping genome-wide transcription-factor binding sites using DAP-seq. *Nat Protoc* 12:1659–1672. doi: 10.1038/nprot.2017.055

Bentsen HB, Gjerde B, Eknath AE, de Vera MSP, Velasco RR, Danting JC, Dionisio EE, Longalong FM, Reyes RA, Abella TA et al. (2017) Genetic improvement of farmed tilapias: Response to five generations of selection for increased body weight at harvest in *Oreochromis niloticus* and the further impact of the project. *Aquaculture* 468:206–217. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.10.018

Besson M, Aubin J, Komen H, Poelman M, Quillet E, Vandeputte M, Van Arendonk JAM and De Boer IJM (2016) Environmental impacts of genetic improvement of growth rate and feed conversion ratio in fish farming under rearing density and nitrogen output limitations. *J Clean Prod* 116:100–109. doi: 10.1016/j.jclepro.2015.12.084

Blasco A and Pena R (2018) Current Status of Genomic Maps: Genomic Selection/GBV in Livestock. In: Niemann H and Wrenzycki C (eds) *Animal Biotechnology 2: Emerging Breeding Technologies*. Springer International Publishing, Cham, pp 61–80

Brinez BR, Caraballo X and Salazar M (2011) Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellites genetic markers microsatelites como marcadores genéticos. *Rev MVZ Córdoba* 16:2491–2498.

Chitty LS, Mason S, Barrett AN, Mckay F, Lench N, Daley R and Jenkins LA (2015) Non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia and thanatophoric dysplasia: Next-generation sequencing allows for a safer, more accurate, and comprehensive approach. *Prenat Diagn* 35:656–662. doi: 10.1002/pd.4583

Cnaani A, Hallerman EM, Ron M, Weller JI, Indelman M, Kashi Y, Gall GAE and Hulata G (2003) Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F2tilapia hybrid. *Aquaculture* 223:117–128. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00163-7

Cnaani A, Zilberman N, Tinman S, Hulata G and Ron M (2004) Genome-scan

analysis for quantitative trait loci in an F2 tilapia hybrid. *Mol Genet Genomics* 272:162–172. doi: 10.1007/s00438-004-1045-1

Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB and Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196. doi: 10.1007/s10681-005-1681-5

CONAPESCA CN de A y P (2013) Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013 de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Mazatlán

Crofts TS, Gasparrini AJ and Dantas G (2017) Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat Rev Microbiol* 15:422–434. doi: 10.1038/nrmicro.2017.28

Cuéllar-Pinzón J, Presa P, Hawkins SJ and Pita A (2016) Genetic markers in marine fisheries: Types, tasks and trends. *Fish Res* 173:194–205. doi: 10.1016/j.fishres.2015.10.019

de Verdal H, Komen H, Quillet E, Chatain B, Allal F, Benzie JAH and Vandeputte M (2017a) Improving feed efficiency in fish using selective breeding: A review. *Rev Aquac* 1–19. doi: 10.1111/raq.12202

de Verdal H, Mekki W, Lind CE, Vandeputte M, Chatain B and Benzie JAH (2017b) Measuring individual feed efficiency and its correlations with performance traits in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 468:489–495. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.11.015

Erazo E (2017) Mejoramiento genético de la tilapia Nilótica. *Semin. Biotecnol. Apl. a la Agroind. Piscícola*

Eshel O, Shirak A, Weller JI, Slossman T, Hulata G, Cnaani A and Ron M (2011) Fine-mapping of a locus on linkage group 23 for sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim Genet*. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02128.x

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016) The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 Contributing to food security and

nutrition for all. FAO, Rome

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) Contribución de la pesca y la acuicultura a la seguridad alimentaria y el ingreso familiar en Centroamérica. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Panamá

Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (2017) FAO Yearbook: Fishery and Aquaculture Statistics. 2015. FAO Annu Yearb. doi: 10.5860/CHOICE.50-5350

Fry JP, Mailloux NA, Love DC, Milli MC and Cao L (2018) Feed conversion efficiency in aquaculture: do we measure it correctly? *Environ Res Lett* 13:024017. doi: 10.1088/1748-9326/aaa273

Fuji K, Hasegawa O, Honda K, Kumasaka K, Sakamoto T and Okamoto N (2007) Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 272:291–295. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.07.210

Gjedrem T and Baranski M (2009) Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction. doi: 10.1007/978-90-481-2773-3

Gjedrem T, Robinson N and Rye M (2012) The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture* 350–353:117–129. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.04.008

Goddard ME and Hayes BJ (2009) Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nat Rev Genet* 10:381–391. doi: 10.1038/nrg2575

Goodwin S, McPherson JD and McCombie WR (2016) Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 17:333–351. doi: 10.1038/nrg.2016.49

Gu XH, Jiang DL, Huang Y, Li BJ, Chen CH, Lin HR and Xia JH (2018) Identifying a Major QTL Associated with Salinity Tolerance in Nile Tilapia Using QTL-Seq. *Mar Biotechnol* 20:98–107. doi: 10.1007/s10126-017-9790-4

Guyon R, Rakotomanga M, Azzouzi N, Coutanceau JP, Bonillo C, D’Cotta H,

- Pepey E, Soler L, Rodier-Goud M, D'Hont A et al. (2012) A high-resolution map of the Nile tilapia genome: a resource for studying cichlids and other percomorphs. *BMC Genomics* 13:1–17. doi: 10.1186/1471-2164-13-222
- Hamzah A, Ponzoni RW, Nguyen NH, Khaw HL, Yee HY and Mohd Nor SA (2014) Performance of the genetically improved farmed tilapia (GIFT) strain over ten generations of selection in Malaysia. *Pertanika J Trop Agric Sci* 37:411–429.
- Hayes B and Goddard M (2010) Genome-wide association and genomic selection in animal breeding. *Genome* 53:876–883. doi: doi:10.1139/G10-076
- Hong Xia J, Bai Z, Meng Z, Zhang Y, Wang L, Liu F, Jing W, Yi Wan Z, Li J, Lin H et al. (2015) Signatures of selection in tilapia revealed by whole genome resequencing. *Sci Rep* 5:1–10. doi: 10.1038/srep14168
- Ilea RC (2009) Intensive livestock farming: Global trends, increased environmental concerns, and ethical solutions. *J Agric Environ Ethics* 22:153–167. doi: 10.1007/s10806-008-9136-3
- Jaitin DA, Kenigsberg E, Keren-Shaul H, Elefant N, Paul F, Zaretsky I, Mildner A, Cohen N, Jung S, Tanay A et al. (2014) Massively parallel single cell RNA-Seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* (80-) 343:776–779. doi: 10.1126/science.1247651.Massively
- Janssen K, Chavanne H, Berentsen P and Komen H (2017) Impact of selective breeding on European aquaculture. *Aquaculture* 472:8–16. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.03.012
- Lee BY, Lee WJ, Streelman JT, Carleton KL, Howe AE, Hulata G, Slettan A, Stern JE, Terai Y and Kocher TD (2005) A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics* 170:237–244. doi: 10.1534/genetics.104.035022
- Levy SE and Myers RM (2016) Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 17:95–115. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022413
- Li HL, Gu XH, Li BJ, Chen CH, Lin HR and Xia JH (2017) Genome-Wide QTL

- Analysis Identified Significant Associations Between Hypoxia Tolerance and Mutations in the GPR132 and ABCG4 Genes in Nile Tilapia. *Mar Biotechnol* 19:441–453. doi: 10.1007/s10126-017-9762-8
- Lin G, Wang L, Ngho S Te, Ji L, Orbán L and Yue GH (2018) Mapping QTL for Omega-3 Content in Hybrid Saline Tilapia. *Mar Biotechnol* 20:10–19. doi: 10.1007/s10126-017-9783-3
- Liu F, Sun F, Li J, Xia JH, Lin G, Tu RJ and Yue GH (2013) A microsatellite-based linkage map of salt tolerant tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis* spp.) and mapping of sex-determining loci. *BMC Genomics* 14:14–58. doi: 10.1186/1471-2164-14-58
- Loughnan SR, Smith-Keune C, Jerry DR, Beheregaray LB and Robinson NA (2016) Genetic diversity and relatedness estimates for captive barramundi (*Lates calcarifer*, Bloch) broodstock informs efforts to form a base population for selective breeding. *Aquac Res* 47:3570–3584. doi: 10.1111/are.12807
- McAndrew BJ, Penman DJ, Bekaert M and Wehner S (2016) Tilapia genomic studies. *Genomics Aquac.* doi: 10.1016/B978-0-12-801418-9.00005-6
- Meuwissen T, Hayes B and Goddard M (2016) Genomic selection: A paradigm shift in animal breeding. *Anim Front* 6:6–14. doi: 10.2527/af.2016-0002
- MINAGRICULTURA (2017) Cifras sectoriales 2017 Acuicultura. [https://sioc.minagricultura.gov.co/Acuicultura/Documentos/Forms/AllItems.aspx?RootFolder=%2FAcuicultura%2FDocumentos%2F002 - Cifras Sectoriales&FolderCTID=0x0120003EDA72C8E75E664DA8175AEB0E4979D1](https://sioc.minagricultura.gov.co/Acuicultura/Documentos/Forms/AllItems.aspx?RootFolder=%2FAcuicultura%2FDocumentos%2F002%20-%20Cifras%20Sectoriales&FolderCTID=0x0120003EDA72C8E75E664DA8175AEB0E4979D1)
- Nguyen NH (2016) Genetic improvement for important farmed aquaculture species with a reference to carp, tilapia and prawns in Asia: Achievements, lessons and challenges. *Fish Fish* 17:483–506. doi: 10.1111/faf.12122
- Nishida S, Dissanayaka DMSB, Honda S, Tateishi Y, Chuba M, Maruyama H, Tawaraya K and Wasaki J (2017) Identification of genomic regions associated with low phosphorus tolerance in japonica rice (*Oryza sativa* L.) by QTL-Seq. *Soil Sci Plant Nutr* 64:278–281. doi: 10.1080/00380768.2017.1412238

- Omasaki SK, Janssen K, Besson M and Komen H (2017) Economic values of growth rate, feed intake, feed conversion ratio, mortality and uniformity for Nile tilapia. *Aquaculture* 481:124–132. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.04.013
- Palaiokostas C, Bekaert M, Khan MGQ, Taggart JB, Gharbi K, McAndrew BJ and Penman DJ (2015) A novel sex-determining QTL in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *BMC Genomics* 16:1–10. doi: 10.1186/s12864-015-1383-x
- Pang M, Fu B, Yu X, Liu H, Wang X, Yin Z, Xie S and Tong J (2017) Quantitative trait loci mapping for feed conversion efficiency in crucian carp (*Carassius auratus*). *Sci Rep* 7:1–11. doi: 10.1038/s41598-017-17269-2
- Pelletier N and Tyedmers P (2010) Life Cycle Assessment of Frozen Tilapia Fillets From Indonesian Lake-Based and Pond-Based Intensive Aquaculture Systems. *J Ind Ecol* 14:467–481. doi: 10.1111/j.1530-9290.2010.00244.x
- Pineda H, Taborda M and Hernández A (2013) Selección por conformación de reproductores de tilapia roja *Oreochromis* sp., mediante prueba de progenie. *Rev MVZ Cordoba* 18:3626–3632.
- Ponzoni RW, Khaw HL and Yee H-Y (2010) GIFT : The Story Since Leaving ICLARM (now known as The WorldFish Center). Fridtjof Nansen Institute, Lysaker
- Ponzoni RW, Nguyen NH and Khaw HL (2007) Investment appraisal of genetic improvement programs in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 269:187–199. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.054
- Pulgarin C (2012) Estimación de los efectos aditivos y de heterosis para peso de cosecha, sobrevivencia y manchamiento en siete poblaciones de tilapia roja (*Oreochromis* sp) en Colombia. Universidad Nacional de Colombia
- Romana-Eguia MRR, Santos BS, Ikeda M, Basiao ZU and Kijima A (2018) Genetic assessment of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) stocks based on novel short tandem repeats for marker-aided broodstock management. *Aquac Res*. doi: 10.1111/are.13610
- Schmidt MH, Vogel A, Denton AK, Istace B, Wormit A, van de Geest H, Bolger

ME, Alseekh S, Maß J, Pfaff C et al. (2017) De novo Assembly of a New *Solanum pennellii* Accession Using Nanopore Sequencing. *Plant Cell* 29:2336–2348. doi: 10.1105/tpc.17.00521

Soto J, Rodriguez-Antolin C, Vallespín E, De Castro Carpeño J and Ibanez De Caceres I (2016) The impact of next-generation sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research. *Transl Res* 169:1–18. doi: 10.1016/j.trsl.2015.11.003

Sun Y-L, Jiang D-N, Zeng S, Hu C-J, Ye K, Yang C, Yang S-J, Li M-H and Wang D-S (2014) Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 433:19–27. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.035

Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S et al. (2013) QTL-seq: Rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J* 74:174–183. doi: 10.1111/tpj.12105

Tave D (1995) Selective breeding programmes for medium-sized fish farms. *FAO Fish Tech Pap.* doi: 10.1037/10824-001

Thodesen J, Rye M, Wang YX, Li SJ, Bentsen HB, Yazdi MH and Gjedrem T (2013) Genetic improvement of tilapias in China: Genetic parameters and selection responses in growth, survival and external color traits of red tilapia (*Oreochromis spp.*) after four generations of multi-trait selection. *Aquaculture* 416–417:354–366. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.047

Tsai HY, Hamilton A, Guy DR, Tinch AE, Bishop SC and Houston RD (2015) The genetic architecture of growth and fillet traits in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genet.* doi: 10.1186/s12863-015-0215-y

URPA UR de PA (2011) Zonificación agropecuaria, piscícola y forestal departamento de Antioquia 2011. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural, Gobernacion de Antioquia, Medellin

Wang M and Lu M (2016) Tilapia polyculture : a global review. *Aquac Res* 47:2363–2374. doi: 10.1111/are.12708

Westra HJ, Peters MJ, Esko T, Yaghootkar H, Schurmann C, Kettunen J, Christiansen MW, Fairfax BP, Schramm K, Powell JE et al. (2013) Systematic identification of trans-eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat Genet* 45:1238–1243. doi: doi:10.1038/ng.2756

Xue Y, Ankala A, Wilcox WR and Hegde MR (2015) Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: Single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med* 17:444–451. doi: 10.1038/gim.2014.122

Yáñez JM, Newman S and Houston RD (2015) Genomics in aquaculture to better understand species biology and accelerate genetic progress. *Front Genet* 6:1–3. doi: 10.3389/fgene.2015.00128

Yosef S (2009) Rich food for poor people genetically improved Tilapia in the Philippines.

Yue GH (2014) Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture. *Fish Fish* 15:376–396. doi: 10.1111/faf.12020

Objetivos

Objetivo general

Describir la diversidad genética, fenotípica, productiva y la respuesta transcripcional a temperaturas subóptimas de la tilapia como información base para el establecimiento de una población sintética en un posible programa de selección de tilapia para el departamento de Antioquia.

Objetivos específicos

1. Analizar la estructura y diversidad genética de reproductores de tilapia en el departamento de Antioquia mediante loci microsatélites.
2. Identificar molecularmente las especies de tilapia que se encuentran en estado feral en algunos embalses del departamento de Antioquia a partir de un fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I.
3. Caracterizar y comparar la forma del cuerpo de las tilapias cultivadas en diferentes granjas del departamento de Antioquia mediante morfometría geométrica.
4. Comparar el desempeño productivo de diferentes semillas comerciales de tilapia producidas en el departamento de Antioquia bajo condiciones constantes y variables de temperatura.
5. Identificar genes expresados diferencialmente en tilapia bajo condiciones subóptimas de temperatura mediante análisis del transcriptoma completo.

Capítulo 1

Genetic diversity of four broodstocks of tilapia (*Oreochromis* sp.) from Antioquia, Colombia

Objetivo específico:

Analizar la estructura y diversidad genética de reproductores de tilapia en el departamento de Antioquia mediante loci microsatélites

Aceptado para publicación en Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias

<http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp>

Genetic diversity of four broodstocks of tilapia (*Oreochromis* sp.) from Antioquia, Colombia

Diversidad genética de cuatro grupos de reproductores de tilapia (*Oreochromis* sp.) de Antioquia, Colombia

Diversidade genética de quatro estoques de reprodutores de tilápia (*Oreochromis* sp.) de Antioquia, Colombia

Andrés F Montoya-López^{1*}, Zoot; Ariel M Tarazona Morales², Zoot, MSc, PhD; Martha Olivera-Angel¹, MV, Dr, Sci agr; John J Betancur-López³, Zoot.

¹*Grupo Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. Carrera 75 # 65-87, Medellín, Colombia.*

²*Grupo Biogénesis, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. Calle 59ª # 63-20. Medellín, Colombia.*

³*Asociación Colombiana de Acuicultores ASOACUICOLA, Medellín, Colombia.*

Abstract

Background: Tilapia is the most farmed fish in Colombia. It is important to examine broodstock genetic diversity in hatcheries. **Objective:** To analyze the genetic diversity and structure of one Nile and three red tilapia broodstocks in Antioquia, Colombia. **Methods:** Fish were genotyped using 24 microsatellite markers of 13 linkage groups in five multiple reactions. Genetic diversity metrics were estimated and null alleles were detected. Analysis of Molecular Variance and analysis of number of clusters were used to describe the relationship between broodstocks. **Results:** Two microsatellites could not be amplified, and 22 were polymorphic. Average number of alleles per locus ranged 5.77 to 7.91. Locus UNH211 had the most alleles (17), whereas OMO032 had the fewest (4). Excepting GM234 and OMO032, the analyzed loci had at least one private allele per population. Average effective number of alleles (3.37–4.03) was always less than the number of observed alleles. Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium with heterozygote deficiencies were registered.

* Corresponding author: Andrés Montoya-López. Grupo Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. Email: andres.montoyal@udea.edu.co

Nine markers showed evidence of null alleles. Expected heterozygosity (0.65–0.67 per broodstock) was significantly higher than observed heterozygosity (0.601–0.649) in the four populations. Fixation index for all broodstocks (excluding null alleles) was 0.0766 (95% confidence interval, 0.05092–0.10289). According to molecular variance analysis, the greatest variation was between individuals, rather than between groups of broodstocks or individuals within broodstocks. Genetic distance between the Nile and red broodstocks ranged 0.43 to 0.54. **Conclusions:** Overall, these findings provide baseline information about genetic diversity and structure of tilapia broodstocks in Antioquia, Colombia and this information will be useful for the management of tilapia hatcheries.

Key Words: *aquaculture, assisted selection, molecular markers*

Resumen

Antecedentes: La tilapia es el pez más cultivado en Colombia. Es importante monitorear la diversidad genética de los reproductores. **Objetivo:** Analizar la diversidad y estructura genética de los reproductores de tres granjas rojas y una Nilótica en Antioquia, Colombia. **Métodos:** Se utilizaron 24 microsatélites de 13 grupos de ligamiento, amplificados en cinco reacciones múltiples. Se calcularon diferentes medidas de diversidad y se detectaron alelos nulos. Se utilizó un análisis de varianza molecular y uno de número de grupos para describir las relaciones entre las granjas de reproductores. **Resultados:** Dos marcadores no fueron amplificados y los 22 restantes fueron polimórficos. El promedio de alelos por locus varió entre 5.77 y 7.91. El mayor número de alelos (17), se encontró en el locus UNH 211, mientras que el menor se observó en OMO032 (cuatro). Veinte loci presentaron por lo menos un alelo privado. El número de alelos efectivos promedio fue menor al número de alelos observado y estuvo entre 3.37 y 4.03. Se registraron desviaciones significativas en el equilibrio Hardy-Weinberg, en su mayoría con deficiencias de heterocigotos. Se encontraron evidencias de alelos nulos en nueve marcadores. La heterocigosidad observada estuvo entre 0.601 y 0.649. El índice de fijación fue de 0.0766 (intervalo de confianza de 95%, 0.05092 -

0.10289). Según el análisis de varianza molecular, la mayor fuente de variación se encontró entre individuos. El valor de la distancia de Nei entre los reproductores Nilóticos y rojos se encontró entre 0.43 y 0.54. **Conclusión:** Los resultados de la presente investigación proveen una línea base acerca de la diversidad y estructura genética de los reproductores de tilapia en Antioquia, Colombia y son significativos para el manejo de granjas dedicadas a la reproducción de tilapia.

Palabras clave: *acuicultura, selección asistida, marcadores moleculares*

Resumo

Antecedentes: A tilápia é o peixe mais cultivado na Colômbia. É importante examinar a diversidade genética de peixes reprodutores. **Objetivo:** Avaliar a diversidade e estrutura genética de três estoques de reprodutores de tilápias vermelhas e um de tilápia Nilótica em Antioquia, Colômbia. **Métodos:** Utilizaram-se 24 microssatélites de 13 grupos de ligação em cinco reações múltiplas. Métricas de diversidade genética foram estimadas e alelos nulos foram detectados. Análise da Variância Molecular e análise do número de clusters foram utilizados para descrever a relação entre os estoques. **Resultados:** Vinte e dois microssatélites analisados mostraram-se polimórficos. O número médio de alelos por locus variou entre 5,77 e 7,91. O Locus UNH211 apresentou o maior número de alelos (17), enquanto o OMO032 apresentou o menor número (4). Exceto GM234 e OMO032, os loci analisados mostrou um pelo menos um alelo privado por população. O número efetivo médio de alelos (3.37-4.03) foi sempre menor do que o número de alelos observados. Foram observados desvios significativos do equilíbrio Hardy-Weinberg e deficiência de heterozigotos. Nove loci mostraram evidências de alelos nulos. A heterozigosidade esperada (0,6504-0,6748 por população) foi significativamente maior do que a heterozigosidade observada (0,601-0,649). O índice de fixação foi de 0,0766 (intervalo de confiança de 95%, 0,05092-0,10289). De acordo com a análise da variância molecular, a maior variação foi entre indivíduos. A distância genética entre o Nilo e os

reprodutores vermelhos variou de 0,43 a 0,54. **Conclusão:** No geral, esses resultados fornecem informação básica sobre diversidade e estrutura genética de reprodutores de tilápia em Antioquia, Colômbia, e são significativos para o manejo de plantéis de reprodutores.

Palavras chave: *aquicultura, marcadores moleculares, seleção assistida*

Introduction

Globally, tilapia is the second most important fish in aquaculture after carps, with total production of *Oreochromis niloticus* reaching 3,670,260 tons in 2014 (FAO, 2016). Furthermore, *Oreochromis* spp. are the most economically important species in the aquaculture of Colombia. According to estimates by Ministry of Agriculture and Rural Development of Colombia, (unpublished data) tilapias represent 62.5% of national aquaculture production and the state of Antioquia is the third largest tilapia producer with 5.5% of national production. In addition, Colombia is the second largest exporter of fresh tilapia fillet to the United States with 5,329 tons valued at USD \$44,119,211 in 2015 (NMFS, 2016).

Since the mid-20th century, Colombia has had a history of successive introductions of tilapia. Importation of *O. niloticus* began around 1979 to promote aquaculture, followed by red varieties of *Oreochromis mossambicus* and *Oreochromis urolepis*, Nile strains and red hybrids (Castillo, 2011; Gutiérrez et al., 2012). As a result, different species of tilapia are cultured in this country. However, maintaining genetic variation is important because: a. of its critical role in a population's adaptative potential to cope with variable environmental conditions and b. its usefulness when genetic improvement through selective breeding is anticipated (Lind et al., 2012).

Aquaculture stocks derived from small founder populations, show after few generations, loss of genetic diversity as well as depression from inbreeding (Doyle, 2016). Therefore, depending on breeding objectives, the gene pool may need to be refreshed periodically (McKinna et al., 2010). For tilapia, total female

fertility and male reproductive success are affected by the level of endogamy (Fessehaye et al., 2009). Thus, it is important to monitor broodstock genetic diversity in the aquaculture farms responsible for fry production (Petersen et al., 2012). Microsatellites are among the best genetic markers for analyzing pedigree, population structure, genomic variation, and evolutionary processes, as well as for verifying quality for selective breeding programs in aquaculture (Abdul-Muneer, 2014).

The genetic diversity of *Oreochromis* spp. has been extensively studied using microsatellites worldwide (Appleyard et al., 2001; Rutten et al., 2004; Petersen et al., 2012; Saad et al., 2013; Gu et al., 2014). Diversity metrics such as heterozygosity, allelic richness, inbreeding coefficient and fixation index are highly variable between studies. For example, Melo et al. (2006) characterized six commercial stocks of tilapias from Brazil using five microsatellite loci. These authors found a large genetic difference among the stocks and a considerable loss of heterozygosity. More recently, Shyamala et al. (2014) analyzed the genetic diversity of Nile and red hybrid tilapia stocks from India using nine microsatellite loci, they found mean heterozygosity ranged from 0.777 to 0.856 in Nile and 0.792 to 0.873 in red tilapia. Previous work by Brinez et al., (2011) evaluated the genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia from four different regions of Colombia and estimated mean expected heterozygosities ranging from 0.587 to 0.837 as well as fixation index between 0.105 and 0.239. However, the genetic diversity and structure of broodstocks from Antioquia region in Colombia remains unstudied.

Accordingly, the purpose of this study was to assess the genetic variability and population structure of broodstocks in the most important tilapia hatcheries in Antioquia, Colombia. In addition, we discuss current trends and directions for future research in the study of genetic diversity of tilapia using microsatellites.

Materials and Methods

Tissue sampling

Handling procedures followed the section seven of the Aquatic Animal Health Code about the welfare of farmed fish. Terminal tailfin fragments were collected from tilapia broodstocks at four fish fry farms in Antioquia state. Three farms were red tilapia and one farm was a Nile tilapia farm. Samples were stored in 98% ethanol until processing.

DNA isolation and amplification

Genomic DNA was extracted from samples using DNEasy® blood and tissue kits in the QIAcube® automated system (QIAGEN), in accordance with manufacturers' protocols. Total DNA was quantified, and its purity (260-nm/230-nm ratio) was determined using a NanoDrop® Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Next, DNA integrity was visualized with 1.2% agarose gel using SYBR® Safe gel stain (Thermo Fisher Scientific).

Twenty-four microsatellite loci located in 13 different linkage groups were analyzed with forward primers tagged with fluorochrome markers FAM, VIC, NED, or PET (Table 1). Five sets of primer tags in multiple reactions (Table 2) were amplified, such that all fragments could be uniquely marked and separated within a single capillary without overlap. PCR was carried out in reaction volumes of 10.0 to 12.3 µl with a thermal profile consisted of initial denaturing at 94 °C for 15 min, followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 90 s at 56 °C, 90 s at 72 °C, and 10 min at 72 °C. Fragment lengths were determined with a GeneScan® 500 ROX® Size Standard (Applied Biosystems) in an Applied Biosystems 3130 automated capillary genetic sequencer. DNA sizing and quality allele calls were analyzed with GeneMapper software version 4.0 (Applied Biosystems).

Data analysis

Data were transformed and alleles were grouped using TANDEM software version 2.0 (Matschiner and Salzburger, 2009). SPAGeDi software version 1.5 (Hardy and Vekemans, 2002) was used to calculate the number of alleles,

effective number of alleles, observed heterozygosity, expected unbiased heterozygosity (Nei, 1978), allelic richness, and individual endogamy coefficient. Genepop software version 4.2 was used to determine deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) across populations within loci and across loci within populations via the Markov chain method, with heterozygote deficit being specified as the alternative hypothesis. Markov chain length was 1,000 iterations plus 100 subsequent groups of 2,000 iterations. Genepop software was used to analyze allele fixation and linkage disequilibrium via the G-test with 10,000 dememorizations, 100 groups, and 5,000 iterations per group. Genetix software version 4.02 (Belkhir et al., 1996) was used to calculate the number of private alleles per locus, Wright’s fixation index (F_{ST}) (Weir and Cockerham, 1984), and Nei’s distance (Nei, 1972). To detect artifacts (“stuttering”), loss of alleles, and null alleles, Micro-Checker software version 2.2.3 was used (Van Oosterhout et al., 2004). Hierarchical subdivision of genetic diversity was determined via Analysis of Molecular Variance (AMOVA) using Arlequin software version 3.5.2.2 (Excoffier and Lischer, 2010). To determine the number of groups and to assign individuals to specific groups, Structure software version 2.3.4 was used (Pritchard et al., 2000). The analysis was performed in accordance with recommendations of Gilbert et al. (2012). For Markov chain Monte Carlo, 100,000 burn-in iterations and repetitions for each run, were used. To confirm parameter suitability, value convergence in the statistical summary was determined, as recommended in the Structure User Manual (Pritchard et al., 2010). Twenty independent replicas with one to seven groups were run in the Structure software program. To select the number of clusters (K), the method of Evanno et al., (2005) was applied by using the online software application Structure Harvester version 0.6.94 (Earl and vonHoldt, 2012).

Table 1. Microsatellites used in the present study

Locus	Repetition motif	Linkage group	Direction	Primer	GenBank access no.	Linkage group reference	
GM234	GT	22	Forward	5'ATCGCTGTGTATTTCTATCAC 3'	BV005371.1		
			Reverse	5'ATGCCACCCTATTCTGT 3'			
GM407	CA	12	Forward	5'GGCTCGTCCATCTCGT 3'	BV005443.1		
			Reverse	5'CTTGGCTCTTTGTTGGTTATT 3'			
OMO032	GAAAA	13	Forward	5' GGTAAGCGGTGCAAAGTTCA 3'	GR695143.1		
			Reverse	5' GTTGGCTAACCTCTGTTCCTCC 3'			
OMO039	ATT	11	Forward	5' CTGGCTGCCTCAGGACTCATCA 3'	JX204854		Liu <i>et al.</i> (2013)
			Reverse	5'GCACGGCCGCAGGTAAATG 3'			
OMO175	GT	4	Forward	5'CAACCTGCCTGAAAATCACCACAC 3'	JX204934		
			Reverse	5'AAACCCAAAACCCAGCAACACAA 3'			
OMO194	GT	2	Forward	5' TCAGGAAAGGGAACACCGAGATG 3'	JX204949		
			Reverse	5' GGACCTGGTTGGACGTGCTTCT 3'			
OMO228	CA	22	Forward	5' CCACGATTCTTCGCAGACCAT 3'	JX204972		
			Reverse	5'AACGCGCACATATTGCCTTTCAC 3'			
UNH104	CA	1	Forward	5'GCAGTATTTGTGGTCACTA 3'	G12257.1		
			Reverse	5'GGTATATGTCTAACTGAAATCC 3'			
UNH106	CA	3	Forward	5'CCTTCAGCATCCGTATAT 3'	G12259.1	Lee <i>et al.</i> (2005)	
			Reverse	5'GTCTCTTTCTCTCTGTCACAAG 3'			
UNH108	CA	2	Forward	5'GGGATCAGCTGTAAAGTTT 3'	G12261.1		
			Reverse	5'TGAGTTGATTATTAATTTCTGA 3'			

Locus	Repetition motif	Linkage group	Direction	Primer	GenBank access no.	Linkage group reference
UNH118	GT	-	Forward	5' CAGAAAGCCTGATCTAATATT 3'	G12271.1	N/A
			Reverse	5' TTTCAGATACATTTTATAGAGGG 3'		
UNH123	CA	12	Forward	5' CATCATCACAGACAGATTAGA 3'	G12276.1	Lee <i>et al.</i> (2005)
			Reverse	5' GATTGAGATTTCAATTCAAG 3'		
UNH124	GT	4	Forward	5' AATTTGGCAGCTTCTTTT 3'	G12277.1	Moen <i>et al.</i> (2004)
			Reverse	5' CCCACAAGCATAGTAAACT 3'		
UNH129	CA	8	Forward	5' AGAAGTCGTGCATCTCTC 3'	G12282.1	
			Reverse	5' TGTACATCATCTGTGGG 3'		
UNH159	CA	2	Forward	5' TTGTTTTAGGAGCTTCTTTTGTC 3'	G12311.1	
			Reverse	5' ATATTCATCTGGATTTGGCTCTAA 3'		
UNH160	CA	6	Forward	5' CCATTGGCTCTTACATC 3'	G12312.1	Lee <i>et al.</i> , (2005)
			Reverse	5' GATAGCATTCTGTAGTTATGG 3'		
UNH166	CA	9	Forward	5' CCCTCACACACACTCTT 3'	G12318.1	
			Reverse	5' GATAACGACACGACAGTAC 3'		
UNH172	CA	4	Forward	5' AATGCCTTTAAATGCCTTCA 3'	G12324.1	
			Reverse	5' CTTTTATAGTCGCCCTTTGTTA 3'		
UNH207	CA	6	Forward	5' ACACAACAAGCAGATGGAGAC 3'	G12358.1	
			Reverse	5' CAGGTGTGCAAGCAGAAGC 3'		
UNH208	CA	19	Forward	5' CTTCTTGGCCTACAATTT 3'	G12359.1	Cnaani <i>et al.</i> (2004)
			Reverse	5' CAGATGGGTGATAGCAA 3'		
UNH211	CA	19	Forward	5' GGGAGGTGCTAGTCATA 3'	G12362.1	Lee <i>et al.</i>

Locus	Repetition motif	Linkage group	Direction	Primer	GenBank access no.	Linkage group reference
			Reverse	5' CAAGGAAAACAATGGTGATA 3'		(2005)
UNH216	CA	23	Forward	5' GGGAAACTAAAGCTGAAATA 3'	G12367.1	
			Reverse	5' TGCAAGGAATATCAGCA 3'		
UNH222	CA	2	Forward	5' CTCTAGCACACGTGCAT 3'	G12373.1	
			Reverse	5' TAACAGGTGGGAACTCA 3'		
UNH231	CA	6	Forward	5' GCCTATTAGTCAAAGCGT 3'	G12382.1	
			Reverse	5' ATTTCTGCAAAAGTTTTCC 3'		

Table 2. Volumes and concentrations of components for multiple reactions.

Multiplex reaction	Locus	Primer (pmol μL^{-1})	Water ¹ (μL)	Buffer (μL)	Taq pol ² (μL)	Mix (μL)	DNA (μL)	Total (μL)
A	UNH208	6						
	UNH207	2.5						
	GM407	6	0.8	4.0	0.05	8.2	1.8	10
	OMO032	6						
	UNH123	13						
B	UNH104	6						
	UNH159	10						
	UNH108	6						
	UNH160	6	0	4.0	0.06	10.26	2	12.26
	UNH222	18						
	OMO194	6						

Multiplex reaction	Locus	Primer (pmol μL^{-1})	Water ¹ (μL)	Buffer (μL)	Taq pol ² (μL)	Mix (μL)	DNA (μL)	Total (μL)
C	UNH166	6						
	GM234	6						
	UNH118	6	2.65	4.0	0.05	8.5	1.5	10
D	UNH216	6						
	UNH172	6						
	UNH124	12						
	UNH106	3.5	1.1	4.0	0.05	8.5	1.5	10
E	UNH129	6						
	OMO039	6						
	UNH231	6						
	OMO175	8	1.85	4.0	0.05	8.5	1.5	10
	UNH211	6						

Multiplex reaction	Locus	Primer (pmol μL^{-1})	Water ¹ (μL)	Buffer (μL)	Taq pol ² (μL)	Mix (μL)	DNA (μL)	Total (μL)
	OMO228	6						

¹ Nuclease-free water from Applied Biosciences was used. Other manufacturers are as described in the Methods. ² Taq pol stock solution was 5 U μL^{-1}

version 4.02 (Belkhir *et al.*, 1996) was used to calculate the number of private alleles per locus, Wright's fixation index (F_{ST}) (Weir and Cockerham, 1984), and Nei's distance (Nei, 1972). To detect artifacts ("stuttering"), loss of alleles, and null alleles, Micro-Checker software version 2.2.3 was used (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Hierarchical subdivision of genetic diversity was determined via Molecular Analysis of Variance (AMOVA) using Arlequin software version 3.5.2.2 (Excoffier and Lischer, 2010).

To determine the number of groups and to assign individuals to specific groups, Structure Software program version 2.3.4 was used (Pritchard *et al.*, 2000). Analysis was performed in accordance with recommendations of Gilbert *et al.* (2012). For Markov chain Monte Carlo, 100,000 burn-in iterations and repetitions for each run, were used. To confirm parameter suitability, value convergence in the statistical summary was determined, as recommended in the Structure User Manual (Pritchard *et al.*, 2010). Twenty independent replicas with one to seven groups were run in the Structure software program. To select the number of clusters (K), the method of Evanno *et al.*, (2005) was applied by using the online software application Structure Harvester version 0.6.94 (Earl and vonHoldt, 2012). Results are reported graphically as change in the number of clusters (ΔK) and as a comparison of individual K assignments.

Results

Between 32 and 47 individuals per broodstock were genotyped. Two microsatellites (UNH208 and UNH222) could not be amplified. The remaining 22 microsatellites were polymorphic. Across the four broodstocks, the number of alleles per locus varied from 4 (locus OMO032 in all four broodstocks) to 12 (UNH118 in red 1 broodstock). Average number of alleles per locus was between 5.77 (Nile) and 7.91 (red 3). The highest total number of alleles was 17 in locus UNH211, and the lowest was 4 in locus OMO032. Allelic range was 101 to 143 (locus UNH207) and 303 to 359 (locus OMO175). Allelic range amplitude varied from 6 (locus GM234) to 88 (locus GM407). Average effective number of alleles was always lower than observed number of alleles and fell between 3.37 (red 3) and 4.03 (Nile) (Table 3).

Table 3. Molecular identification results per locus for four broodstocks tilapia in Antioquia, Colombia.

Red 1 (n = 42)								
Locus	Na	Nae	He	Ho	R	P	SD	Fi
GM234	6	3.23	0.6949	0.725	298–310	0.4981	0.0146	-0.051
GM407	9	4.55	0.7803	0.643	306–350	0.023	0.0047	0.1779
OMO032	4	2.87	0.6523	0.833	304–319	0.209	0.0063	-0.2818
OMO039	5	3.18	0.6861	0.475	316–331	0.02	0.0031	0.3104
OMO175	9	4.03	0.7519	0.525	303–349	0.000	0.000	0.3045
OMO194	7	2.72	0.6328	0.548	300–320	0.511	0.021	0.1361
OMO228	8	5.25	0.8097	0.902	316–350	0.4752	0.0172	-0.1161
UNH104	8	4.82	0.7929	0.405	124–182	0.000	0.000	0.4925
UNH106	9	3.5	0.7146	0.65	106–188	0.0253	0.0062	0.0914
UNH108	7	3.03	0.67	0.512	114–138	0.0057	0.0027	0.2377
UNH118	12	5.2	0.8079	0.7	154–224	0.05	0.0136	0.135
UNH123	8	4.67	0.786	0.643	150–206	0.0939	0.0111	0.1839
UNH124	8	4.7	0.7873	0.525	294–348	0.000	0.000	0.336
UNH129	8	5.43	0.8161	0.6	186–212	0.0026	0.0012	0.2673
UNH159	7	4.17	0.7602	0.595	217–257	0.0917	0.0074	0.219
UNH160	5	1.78	0.4386	0.357	165–185	0.0755	0.0059	0.1876
UNH166	8	3.83	0.739	0.667	154–194	0.0657	0.0097	0.0989
UNH172	8	3.76	0.7345	0.65	179–241	0.0201	0.0042	0.1163
UNH207	7	3.11	0.6784	0.714	103–143	0.0044	0.0023	-0.0535

UNH211	9	3.56	0.7192	0.667	112–156	0.0396	0.0072	0.0738
UNH216	6	2.67	0.6254	0.585	118–154	0.3088	0.013	0.0648
UNH231	5	3.09	0.677	0.643	161–175	0.3654	0.01	0.051
Red 2 (n = 47)								
Locus	Na	Nae	He	Ho	R	P	SD	Fi
GM234	6	3.49	0.7134	0.591	298–310	0.0149	0.0044	0.1734
GM407	10	5	0.8	0.851	262–350	0.1119	0.0137	-0.0645
OMO032	4	2.5	0.6003	0.617	304–319	0.4635	0.0085	-0.0281
OMO039	4	2.7	0.6295	0.512	319–331	0.0933	0.0047	0.1891
OMO175	8	4.11	0.7566	0.447	281–349	0.000	0.000	0.4121
OMO194	6	3.35	0.7012	0.745	300–334	0.1035	0.0075	-0.0627
OMO228	10	4.96	0.7987	0.745	316–356	0.0527	0.0088	0.0683
UNH104	7	4.46	0.7758	0.638	124–182	0.0928	0.0093	0.1788
UNH106	7	3.53	0.7168	0.814	108–188	0.6346	0.0146	-0.1373
UNH108	8	2.73	0.634	0.467	114–150	0.000	0.000	0.2661
UNH118	11	4.81	0.7923	0.477	150–214	0.000	0.000	0.4004
UNH123	10	4.27	0.766	0.822	154–206	0.0259	0.0057	-0.0742
UNH124	7	4.22	0.7633	0.55	294–348	0.0046	0.0027	0.282
UNH129	8	5.16	0.8066	0.535	186–212	0.003	0.0009	0.3395
UNH159	10	4.64	0.7847	0.745	215–257	0.1337	0.0171	0.0515
UNH160	5	1.85	0.4591	0.256	175–191	0.000	0.000	0.4457
UNH166	8	4.92	0.7971	0.596	154–180	0.0066	0.0033	0.2546
UNH172	9	3.66	0.7272	0.698	179–241	0.0968	0.0136	0.0411

UNH207	6	3.3	0.6969	0.511	103–143	0.0028	0.0011	0.2694
UNH211	13	4.86	0.7945	0.844	106–156	0.6576	0.0298	-0.0636
UNH216	7	3.57	0.7197	0.614	104–154	0.4054	0.0156	0.1488
UNH231	6	3.34	0.7005	0.511	161–175	0.0294	0.0041	0.2732

Red 3 (n = 32)

Locus	Na	Nae	He	Ho	R	P	SD	Fi
GM234	5	3.37	0.7034	0.531	298–310	0.0465	0.0042	0.2477
GM407	10	4.98	0.7996	0.629	306–350	0.0208	0.0057	0.2163
OMO032	4	2.41	0.5847	0.714	304–319	0.0816	0.0051	-0.2257
OMO039	4	2.76	0.6377	0.528	319–331	0.3502	0.007	0.1744
OMO175	11	5.52	0.8191	0.333	303–359	0.000	0.000	0.5968
OMO194	7	3.87	0.7418	0.639	300–320	0.0562	0.0078	0.1404
OMO228	5	3.92	0.7454	0.794	316–350	0.9113	0.0038	-0.0664
UNH104	9	2.9	0.6549	0.472	124–182	0.000	0.000	0.2818
UNH106	8	3.57	0.7199	0.639	108–188	0.1669	0.0176	0.1139
UNH108	11	2.84	0.6488	0.344	114–150	0.000	0.000	0.4742
UNH118	8	4.23	0.7639	0.594	150–188	0.0184	0.0036	0.2255
UNH123	9	5.73	0.8259	0.531	154–206	0.0003	0.0002	0.3604
UNH124	7	5.11	0.8048	0.583	294–348	0.0023	0.0008	0.278
UNH129	7	5.67	0.8239	0.667	186–208	0.0244	0.0032	0.1931
UNH159	8	4.22	0.7633	0.722	217–257	0.0892	0.01	0.0545
UNH160	6	1.32	0.2445	0.176	173–191	0.0865	0.0146	0.2813
UNH166	9	4.53	0.7793	0.389	154–200	0.000	0.000	0.5046

UNH172	10	5.89	0.8306	0.722	179–241	0.0023	0.0014	0.1321
UNH207	11	2.79	0.6414	0.743	101–143	0.8009	0.0242	-0.1609
UNH211	12	6.32	0.8423	0.75	110–156	0.000	0.000	0.1111
UNH216	6	3.71	0.7307	0.594	108–152	0.0459	0.0055	0.1898
UNH231	7	2.99	0.6662	0.636	161–187	0.4333	0.0199	0.0455

Nile (n = 36)

Locus	Na	Nae	He	Ho	R	P	SD	Fi
GM234	3	1.77	0.4367	0.471	302–308	1	0	-0.0802
GM407	6	2.91	0.6563	0.484	312–350	0.0218	0.005	0.2659
OMO032	4	3.24	0.692	0.563	304–319	0.1508	0.0052	0.1895
OMO039	3	1.8	0.4452	0.4	325–331	0.0228	0.0014	0.1031
OMO175	8	5.02	0.8011	0.563	297–349	0.0044	0.002	0.3012
OMO194	5	3.84	0.7401	0.625	302–336	0.0826	0.0052	0.1576
OMO228	7	3.01	0.6684	0.458	320–350	0.0082	0.0022	0.319
UNH104	6	3.29	0.6963	0.517	128–146	0.0093	0.0018	0.2606
UNH106	5	3.04	0.6718	0.567	102–148	0.4498	0.0126	0.1587
UNH108	8	3.46	0.7114	0.552	122–142	0.0192	0.0062	0.2276
UNH118	6	3.45	0.7112	0.706	160–224	0.3907	0.0142	0.0078
UNH123	4	3.26	0.6933	0.871	172–198	0.2242	0.0058	-0.2617
UNH124	6	2.66	0.6249	0.5	294–314	0.0866	0.0066	0.2026
UNH129	4	2.78	0.6401	0.633	186–202	0.9596	0.0017	0.0108
UNH159	7	4.65	0.7852	0.621	217–257	0.0742	0.0087	0.2125
UNH160	8	2.99	0.6655	0.724	165–191	0.3294	0.0252	-0.0899

UNH166	6	4.05	0.7538	0.517	154–200	0.0003	0.0002	0.3176
UNH172	5	2.86	0.6508	0.6	181–199	0.701	0.0096	0.0794
UNH207	6	3.34	0.7012	0.613	105–149	0.0938	0.0102	0.1278
UNH211	8	3.98	0.7489	0.69	104–154	0.0018	0.0009	0.0805
UNH216	4	3.53	0.7184	0.647	120–152	0.5727	0.0056	0.102
UNH231	8	5.15	0.8064	0.889	161–193	0.0665	0.0090	-0.104

Na - number of alleles; Nae - effective number of alleles; He - unbiased expected heterozygosity; Ho - observed heterozygosity; R - allelic range; P - Hardy–Weinberg test P value; SD - Hardy – Weinberg test standard deviation; Fi - individual endogamy coefficient.

Data in bold italic represent deviations from Hardy–Weinberg equilibrium.

Half of the loci (44/88) showed significant deviations from HWE, and 42 of these loci showed heterozygote deficiency. Loci OMO032, OMO194, and UNH159 were in HWE in all four broodstocks. Loci OMO228, UNH106, UNH160, and UNH216 were in HWE in three of the four broodstocks.

At least one private allele per broodstock was found for 20 loci (all loci except GM234 and OMO032). Locus OMO228 had seven private alleles. The Nile population had the highest number of private alleles (22). Micro-Checker analysis showed evidence of null alleles in loci GM407, OMO175, UNH104, UNH108, UNH118, UNH123, UNH124, UNH129, and UNH166.

Eliminating loci with null alleles, linkage disequilibrium analysis for all populations showed six loci pairs with $p < 0.05$. Loci pairs UNH159-OMO194 and UNH207-UNH231 had infinite x^2 values and highly significant p values. Thus, loci UNH159, OMO194, and UNH207 were excluded from further analysis. Table 4 shows the genetic diversity descriptors per broodstock for the 10 microsatellites, excluding loci with null alleles or linkage disequilibrium (GM234, OMO032, OMO039, OMO228, UNH106, UNH160, UNH172, UNH211, UNH216, and UNH231). The calculated value of unbiased expected heterozygosity varied depending on the microsatellite marker group (Table 5). Differences between calculations were generally smaller when 10 and 13 microsatellite markers were used than when 22 markers were used. Expected heterozygosity based on Hardy–Weinberg proportions ranged between 0.6504 (Nile) and 0.686 (red 2). Observed heterozygosity was different from the expected heterozygosity in all four broodstocks ($p = 0.000$, standard deviation = 0.000).

Table 4. Genetic diversity per broodstock from 10 microsatellites, excluding null alleles and loci with linkage disequilibrium

Broodstock	Na	Nae	AR (K = 34)	Fi
Red 1	6.5	3.29	5.4	0.039
Red 2	7.1	3.45	5.75	0.097
Red 3	6.7	3.63	5.68	0.094
Nile	5.5	3.14	4.96	0.078

Na - number of alleles; Nae - effective number of alleles; AR - allelic richness; Fi - individual endogamy coefficient.

Table 5. Expected heterozygosity (He) and observed heterozygosity (Ho) per population calculated from different microsatellite groups

Broodstock	22 Microsatellites		13 Microsatellites, no null allele loci		10 Microsatellites, no null allele and linkage disequilibrium loci	
	He	Ho	He	Ho	He	Ho
Red 1	0.7159	0.6166	0.6784	0.6419	0.6748	0.649
Red 2	0.7243	0.6174	0.6956	0.6308	0.686	0.62
Red 3	0.7169	0.5787	0.6809	0.6299	0.6705	0.609
Nile	0.6827	0.6004	0.6716	0.6051	0.6504	0.601

The F_{ST} value for all broodstocks together (excluding null alleles and linkage disequilibrium) was 0.0777 (95% confidence interval, 0.05763–0.09718), reflecting the low average substructuring. AMOVA results showed that the greatest variation was between individuals. Variation percentage from the source “between groups” was very low (0.80%). Sources “between broodstocks within groups” and “between individuals within broodstocks” showed negative variation percentages, because their values could be close to zero (Table 6).

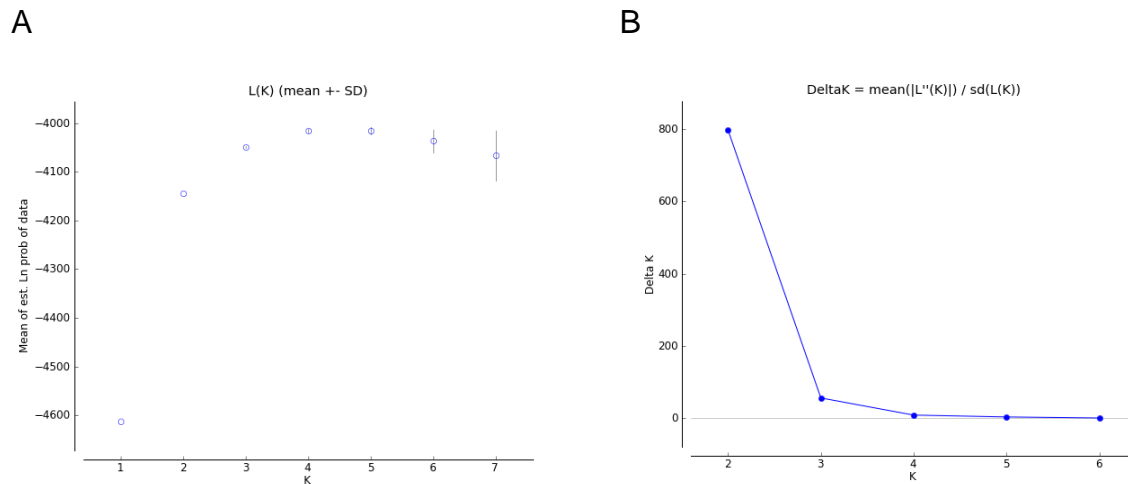


Figure 1. Structural population analysis to determine number of clusters (K) in tilapia broodstocks in Antioquia, Colombia. A. Average L probability (K) (\pm SD) in 20 replicas for each K value analyzed. B. ΔK curve, according to Evanno *et al.* (2005), for K values analyzed. Graphs obtained from Structure Harvester software package.

The trend of the logarithm curve of the probability of number of clusters K ($\ln(P(k))$) began to plateau at $K = 3$, with a value of -4049.155 (figure 1). However, the most appropriate number of clusters based on estimates of ΔK was two ($\Delta K = 798.053$). Figure 2 shows a graphical representation of the assignment of each individual to $K = 2, 3$ or 4. Nile tilapia was the only broodstock to retain an assignment proportion greater than 90% in only one cluster among all values of K evaluated (results for $K = 5, 6$, and 7 not shown). In red broodstocks, the maximum assignment proportion decreased with an increase in K value. Finally, red broodstocks were closer to each other (Nei’s distance: 0.03–0.08) than they were to the Nile broodstock (Nei’s distance: 0.433–0.54).

Table 6. Results of molecular variance analysis (AMOVA)

Comparison between:	DoF	SS	VC	VP	F index	P
Groups (Reds vs. Nile)	1	0.455	0.00248	0.80	F_{CT} 0.00795	$0.24735 \pm$ 0.00797
Broodstocks within Groups (Reds or Nile)	2	0.371	-0.00115	-0.37	F_{SC} - 0.00371	$0.55919 \pm$ 0.00956
Individuals within broodstocks	153	42.894	-0.03020	-9.68	F_{IS} - 0.09726	$0.97156 \pm$ 0.00349
All Individuals	157	53.500	0.34076	109.26	F_{IT} - 0.09257	$0.96825 \pm$ 0.00270

DoF - degrees of freedom; SS - sum of squares; VC - variance components; VP - variance percentage; F index - fixation index.

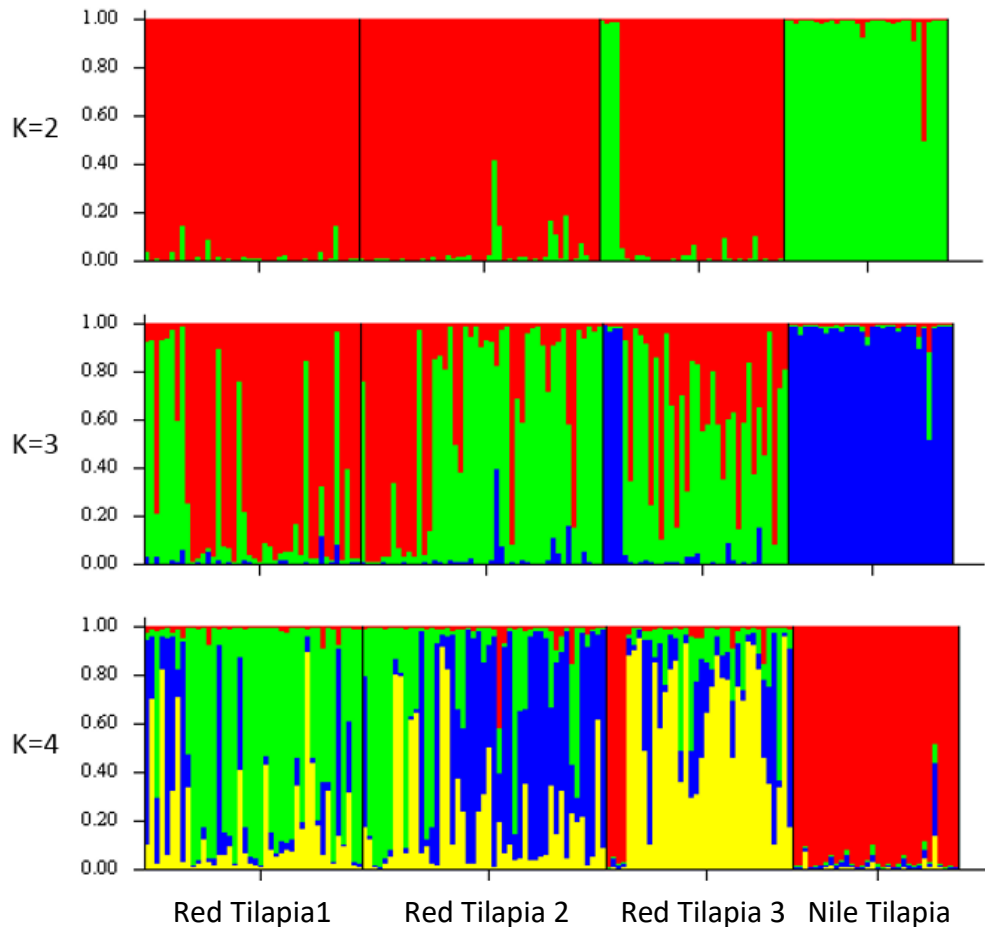


Figure 2. Assignment of each individual from the four broodstocks to K = 2, 3, or 4. Each color represents one cluster. Length of each bar is the estimated assignment proportion of a particular cluster.

Discussion

On a global level, different panels of microsatellites have been used for genetic diversity analysis of wild and farmed populations of *Oreochromis* sp. (particularly of *O. niloticus*, see table 6). However, these results are not comparable across studies. First, the estimation of levels of population genetic diversity (allelic richness, expected heterozygosity, coefficient of inbreeding), structure (F_{ST}) and genetic distances (Nei) from microsatellite data is depending on number of loci and the strategy of marker selection (Orozco-terWengel *et al.*, 2011; Blanco *et al.*, 2012; Queirós *et al.*, 2015).

Second, there are differences in detection and scoring of microsatellites between techniques such as: agarose gel, slab gel and capillary electrophoresis (Vemireddy *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2011). Third, most of the studies did not test the neutrality of markers, the occurrence of null alleles and linkage disequilibrium. Fourth, the comparisons among populations with appreciable size differences between alleles may be biased because longer microsatellite alleles mutate at a higher rate (Putman and Carbone, 2014). Finally, although some of the microsatellite loci used in the present study were also used in previous works, this is the first report using this panel. Our contrasts therefore need to be interpreted with caution.

A median of nine microsatellites have been used in genetic diversity studies for Nile and red tilapia populations (range: 4–20 markers see table 6), which represents a slightly smaller number than the number of microsatellites used in the present study (ten). According to Koskinen *et al.* (2004), a possible disadvantage of using a small number of loci is an increased standard deviation of genetic distances across populations.

The studies listed in the table 6 found that the mean number of alleles per locus per population ranged from three (Karuppanan *et al.*, 2013) to 50 (Bhassu *et al.*, 2004) with a median of 5.87, which is in accordance with the present results. However, we obtained decreased values of the mean number of alleles compared to previous studies in Colombia and Brazil (6.45 in the present study vs. 8.37 in Brinez *et al.*, 2011 and 10,46 in Petersen *et al.*, 2012 respectively). Nineteen different panels of microsatellite loci in several tilapia populations worldwide showed expected heterozygosity values between 0.170 (Bezault *et al.*, 2011) and 0.968 (Bhassu *et al.*, 2004) and observed heterozygosity values between 0.150 (Dias *et al.*, 2016) and 0.90 (Hassanien and Gilbey, 2005) with a median of 0.686 and 0.649 respectively (table 6). Our results of H_e (0.6504 - 0.686) and H_o (0.601 - 0.649) are consistent with these previous reports.

The farms sampled in the current study did not keep records of broodstocks origin and pedigree and the genetic background of broodstocks was unknown. Moreover, the farmers carry out replacement of broodstocks based on mass selection for coloration

and growth (red or Nile tilapia respectively) of some groups that are not sex-reversed derived mostly from their own farms. These practices could decrease the genetic diversity of broodstock after only a few generations. For example, Romana-Eguia *et al.* (2005) reported a reduction in the mean number of alleles (from 10 to 7.4) and mean H_e (from 0.752 to 0.691) in selected and control stocks of mass-selected Nile tilapia after four generations.

Comparisons of the deviations from HWE obtained in the present work with those of previous studies (table 6) confirms that some wild populations and unselected stocks of tilapia conformed to the HWE (Romana-Eguia *et al.*, 2004; Bezault *et al.*, 2011; Sukmanomon *et al.*, 2012), while departure from HWE equilibrium was detected in most of the farmed populations due to a significant deficit of heterozygotes. Deviation of the HWE in hatchery populations could be attributed to the aquaculture practices because a limited number of adults are spawned and an unequal sex ratio is applied (Napora-Rutkowski *et al.*, 2017). The F_{IS} values obtained in this study (0.031–0.121) indicate a deficit of observed heterozygotes. These results reflect those obtained previously by Rutten *et al.* (2004), Nyingi *et al.* (2009), some populations in Bezault *et al.* (2011) and Gu *et al.* (2014). In contrast, Melo *et al.* (2006), Moreira *et al.* (2007) and Dias *et al.* (2016) found negative values of F_{IS} (see table 6). Furthermore, our results are similar to the positive values of F_{IS} in tilapia populations from Colombia (F_{IS} = 0.345 in Brinez *et al.*, 2011) and Brazil (F_{IS} = 0.160–0.330 in Petersen *et al.* 2012; F_{IS} = 0.192–0.401 in Rodriguez-Rodriguez *et al.* 2013).

The F_{ST} value of 0.078 (95% confidence interval, 0.05763–0.09718) obtained in this study suggests a low level of genetic differentiation. This result is comparable with the F_{ST} values of tilapia populations from Philippines (F_{ST} = 0.069, Romana-Eguia *et al.*, 2004), Egypt (F_{ST} = 0.035, Hassanien and Gilbey, 2005), Africa (F_{ST} = 0.09, Bezault *et al.*, 2011), Thailand (F_{ST} = 0.087, Sukmanomon *et al.*, 2012) and India (F_{ST} = 0.089, Shyamala *et al.*, 2014). On the contrary, six commercial stocks of tilapia from Brazil exhibited large genetic difference (F_{ST} = 0.326, Melo *et al.* 2006).

The AMOVA results in the present study indicated that almost the entire variation occurred between individuals. These findings differ from those obtained by Brinez *et al.* (2011) for four states in Colombia, excluding Antioquia because they reported variation percentages of 17.32% between populations, 28.55% within populations, and 54.12% between individuals. The AMOVA results of the present study were similar to those of Romana-Eguia *et al.* (2004), who reported 99.33% variation between individuals and only 0.00331% between groups of red and Nile tilapia. In contrast, Bezault *et al.* (2011) found in natural populations of *O. niloticus* that 49.8% of the genetic variability was partitioned among hydrographic basins and 3.5% was detected among populations within basins.

We found evidence of null alleles at nine of 22 loci. This situation represents the absence of a PCR product due to a mutation in the region flanking the microsatellite. Also, it creates a false homozygosity reading in individuals that could be heterozygotes and, therefore, introduces biases in estimates of genetic diversity and differentiation across populations (Chapuis and Estoup, 2007). The presence of null alleles in microsatellite data of tilapia have been previously reported by Nyingi *et al.* (2009), McKinna *et al.*, 2010, and Sukmanomon *et al.*, (2012). Our result showed that after eliminating loci with null alleles the H_e values decreased. However, Bezault *et al.* (2011) identified in natural populations of tilapia that the exclusion of loci with potential null alleles had minor effects on F_{IS} .

Linkage disequilibrium is the non-random association of alleles at distinct loci. It creates pseudo-replication for analyses in which loci are assumed to be independent samples of the genome. In order to avoid increased Type I error, one locus in the pair should be discarded if significant disequilibrium is found consistently between loci (Selkoe and Toonen, 2006). Therefore, we discarded the loci UNH159, OMO194, and UNH207. Nevertheless, after eliminating these loci the H_e values slightly decreased. Sukmanomon *et al.* (2012) and Rodriguez-Rodriguez *et al.* (2013) observed linkage disequilibrium in different pairs of microsatellite loci in tilapia. However, these authors did not apply any correction to the data. Conversely, McKinna *et al.* (2010) found no

evidence to suggest that four microsatellite loci used in their tilapia study deviated from linkage equilibrium.

In the current study, the most appropriate number ΔK value was obtained for $K= 2$ (i.e. one red and one Nile cluster) and the values of Nei's distances were higher between the three red and the Nile broodstocks. This outcome is contrary to that of Shyamala *et al.* (2014) who found a Nile tilapia population clustered with red tilapias due to breeding management schemes. Nonetheless, our results are similar to those of Romana-Eguia *et al.* (2004) in which the Nile tilapias forming a distinct cluster from the red tilapias.

In conclusion, ten microsatellite loci allowed the characterization of the genetic diversity and structure of three red and one Nile tilapia broodstocks from Antioquia, Colombia. This molecular analysis suggests that the four broodstocks are not affected by major loss of genetic diversity and it shows a clear separation between three red and the Nile broodstocks. Our results provide basic information that may be helpful to the management of tilapia hatcheries and the design of future breeding schemes. We would encourage researchers to standardize and calibrate a panel of microsatellite loci (including adaptive and neutral markers) in multiplex PCRs for tilapia that helps the comparison of information.

Table 7. Comparison of results obtained by previous microsatellite studies in wild and cultivated tilapia populations. No. of popul – number of population; Ho - observed heterozygosity, He - unbiased expected heterozygosity; Fis inbreeding coefficient; F_{ST} - Wright's fixation index.

Loci	No. of popul.	Ho	He	F _{IS}	F _{ST}	Region	Reference
UNH 104, 106, 123, 132, 146, 168, 190, 212, 214	1	0.500	0.612	–	–	Fiji	Appleyard <i>et al.</i> (2001)
UNH 104, 106, 132, 146, 149,	4	0.612– 0.696	0.624– 0.711	0.007– 0.093	0.178 (95% CI:	Thailand- Germany	Rutten <i>et al.</i> (2004)

Loci	No. of popul.	Ho	He	F _{IS}	F _{ST}	Region	Reference
160, 178, 190, 208, 211, 212, 214, 222, 231					0.146– 0.218)		
UNH 123, 147, 172, 216, 222	6	0.636– 0.734	0.666– 0.813	–	–	Asia	Romana- Eguia <i>et al.</i> (2004)
UNH 106, 145, 146, 155, 160, 166, 168, 172, 188, 190, 207	5	0.651	0.968	–	–	Malaysia	Bhassu <i>et al.</i> (2004)
UNH 104, 106, 136, 178, 211, 222	5 (native wild)	0.493– 0.900	0.843– 0.886	–	0.035	Egypt	Hassanien and Gilbey (2005)
UNH 104, 108, 136, 160, 169	6	0.385– 0.815	0.416– 0.693	-0.344– 0.293	0.326	Brazil	Melo <i>et al.</i> (2006)
UNH 104, 108, 118, 222, 231	2	0.712– 0.763	0.794– 0.953	-0.324– (-0.07)	0.131	Brazil	Moreira <i>et al.</i> (2007)
UNH 860, 874, 887, 1003, <i>Prl1AC, Prl1GT</i>	4 (native wild)	0.346– 0.763	0.515– 0.813	0.071– 0.638	–	Kenya and Uganda	Nyingi <i>et al.</i> (2009)
UNH 115, 129, 142, 146, 154, 162, 189, 211, 216	10 (native wild)	0.175– 0.686	0.171– 0.736	-0.03– 0.16	0.09	Africa	Bezault <i>et al.</i> (2011)
UNH 106, 123, 172, 216, 222	6	–	0.586– 0.837	0.345	–	Colombia	Brinez <i>et al.</i> (2011)
UNH 104, 108, 136, 160	3	0.530– 0.660	0.590– 0.620	0.160– 0.330	0.130	Brazil	Petersen <i>et al.</i> (2012)
UNH 132, 138, 153, 160, 172, 173, 192, 211, 212, 213, 216,	3 (feral)	0.610– 0.740	0.620– 0.770	–	0.087 (99% CI, 0.066– 0.109)	Thailand	Sukmanomon <i>et al.</i> (2012)

Loci	No. of popul.	Ho	He	F _{IS}	F _{ST}	Region	Reference
222, 982, 1004 UNH 104, 111, 120, 145, 146, 149, 162, 166, 172, 173, 189, 190, 194, 207, 211, 213, 214, 216, 231, 233	4	0.704– 0.783	0.561– 0.585	–	–	Malaysia	Karuppanan <i>et al.</i> (2013)
UNH 140, 159, 160, 162, 163	1 (4 gen.)	0.391– 0.531	0.636– 0.716	0.192– 0.401	–	Brazil	Rodriguez- Rodriguez <i>et al.</i> (2013)
GM 211, 531, 538; UNH 104, 106, 123, 146, 185, 207, 995	1	0.755	0.839	–	–	Egypt	Saad <i>et al.</i> (2013)
UNH 104, 106, 123, 147, 172, 211, 213, 216, 222	9	0.663– 0.779	0.777– 0.873			India	Shyamala <i>et al.</i> (2014)
GM 024, 677, 119; UNH 178, 738, 860, 932, 954, 971, 995	6 (feral)	0.31– 0.583	0.397– 0.698	0.096– 0.282	–	China	Gu <i>et al.</i> (2014)
UNH 005, 009, 103, 104, 123, 203, 828, 829, 866; GM672	4	0.470– 0.580	0.620– 0.720	0.150– 0.350	–	Brazil	Dias <i>et al.</i> (2016)
GM234; OMO032, 039, 228; UNH106, 160, 172, 211, 216, 231	4	0.601– 0.649	0.6504– 0.686	0.031– 0.121	0.0777 (95% CI, 0.05763– 0.09718)	Colombia	Present Study

Acknowledgments

This research was funded by the “convenio 4600000970 Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia – ASOACUICOLA, Fondo de Ciencia Tecnología e Innovación, Sistema General de Regalías”. We want to thank to “Doctorado en Ciencias Animales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia” and “Programa Nacional de Formación de Investigadores - crédito educativo condonable de Colciencias convocatoria 567 de estudios de doctorado en Colombia”

Conflicts of interest

The authors declare they have no conflicts of interest with regard to the work presented in this report

References

Abdul-Muneer PM. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genet Res Int* 2014; 691759.

Appleyard SA, Renwick JM, Mather PB. Individual heterozygosity levels and relative growth performance in *Oreochromis niloticus* (L.) cultured under Fijian conditions. *Aquaculture Res* 2001; 32(4):287-296.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR, 5000, 1996. Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Bezault E, Balaesque P, Toguyeni A, Fermon Y, Araki H, Baroiller JF, Rognon X. Spatial and temporal variation in population genetic structure of wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) across Africa. *BMC Genetics* 2011; 12(1):102.

Bhassu S, Yusoff K, Panandam J, Embong WK, Oyyan S, Tan SG. The genetic structure of *Oreochromis* spp.(Tilapia) populations in Malaysia as revealed by microsatellite DNA analysis. *Biochem Genet* 2004; 42(7-8):217-229.

Blanco E, Aritaki M, Taniguchi N. Microsatellite multiplex panels for population genetic analysis of red sea bream *Pagrus major*. *Fish Sci* 2012; 78:603-611.

Brinez BR, Caraballo X, Salazar M. Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellites genetic markers. *RevMVZ Cordoba* 2011; 16(2):2491-2498.

Castillo LF. La importancia de la Tilapia Roja en el desarrollo de la Piscicultura en Colombia. 2011. [access date: 11/23/2016] URL: <https://ag.arizona.edu/azaqua/ista/new/TilapiaColombia.pdf>

Chapuis MP, Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 2007; 24(3):621-631.

Cnaani A, Zilberman N, Tinman S, Hulata G, Ron M. Genome-scan analysis for quantitative trait loci in an F2 tilapia hybrid. *Mol Genet Genomics* 2004; 272(2):162-72.

Dias MA, de Freitas RT, Arranz SE, Villanova GV, Hilsdorf AWS. Evaluation of the genetic diversity of microsatellite markers among four strains of *Oreochromis niloticus*. *Anim Genet* 2016;47(3):345-353.

Doyle RW. Inbreeding and disease in tropical shrimp aquaculture: A reappraisal and caution. *Aquaculture Res* 2016; 47:21-35.

Earl DA, vonHoldt BM. Structure harvester: A website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Cons Genet Res* 2012; 4(2):359-361.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: A simulation study. *Mol Ecol* 2005; 14(8):2611-2620.

Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 2010; 10(3):564-567.

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. Rome: FAO; 2016.

Fessehaye Y, Bovenhuis H, Rezk MA, Crooijmans R, van Arendonk JA, Komen H.. Effects of relatedness and inbreeding on reproductive success of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 2009; 294(3-4):180-186.

Gilbert KJ, Andrew RL, Bock DG, Franklin MT, Kane NC, Moore JS, Vines TH. Recommendations for utilizing and reporting population genetic analyses: The reproducibility of genetic clustering using the program structure. *Mol Ecol* 2012; 21(20): 4925-4930.

Gu D, Mu X, Song H, Luo D, Xu M, Luo J, Hu Y. Genetic diversity of invasive *Oreochromis* spp. (tilapia) populations in Guangdong province of China using microsatellite markers. *Biochem Syst Ecol* 2014; 55:198-204.

Gutiérrez F, Lasso CA, Baptiste MP, Sánchez-Duarte P, Díaz AM, editors. VI. Catálogo de la biodiversidad acuática exótica y trasplantada en Colombia: moluscos, crustáceos, peces, anfibios, reptiles y aves. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Bogotá D.C.: Instituto de Investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; 2012.

Hardy OJ, Vekemans X. Spagedi: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2002; 2(4):618-

620.

Hassanien HA, Gilbey J. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquaculture Res* 2005; 36(14):1450-1457.

Karuppannan KV, Noraida I, Oyyan S. An assessment on red tilapia stocks in Malaysia using microsatellite markers. *Int J Fis Aquaculture* 2013; 5(5):78-82. 7

Koskinen MT, Hirvonen H, Landry PA, Primmer CR. The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: An empirical perspective. *Hereditas* 2004; 141(1):61-67.

Lee BY, Lee WJ, Streelman JT, Carleton KL, Howe AE, Hulata G, Kocher TD. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics* 2005; 170(1):237-244.

Lind CE, Ponzoni RW, Nguyen NH, Khaw HL. Selective breeding in fish and conservation of genetic resources for aquaculture. *Reprod Domest Anim* 2012; 47(Suppl 4):255-63.

Liu F, Sun F, Li J, Xia JH, Lin G, Tu RJ, Yue GH. A microsatellite-based linkage map of salt tolerant tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis* spp.) and mapping of sex-determining loci. *BMC Genomics* 2013; 14:14-58.

Matschiner M, Salzburger W. Tandem: Integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics* 2009; 25(15):1982-1983.

McKinna EM, Nandlal S, Mather PB, Hurwood DA. An investigation of the possible causes for the loss of productivity in genetically improved farmed tilapia strain in Fiji: Inbreeding versus wild stock introgression. *Aquaculture Res* 2010; 41(11):e730-e742.

Melo DC, Oliveira DA, Ribeiro LP, Teixeira CS, Sousa AB, Coelho EG, Teixeira EA. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006; 58(1):87-93.

Moen T, Agresti JJ, Cnaani A, Moses H, Famula TR, Hulata G, May B. A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23. *Aquaculture Res* 2004; 35(9):893-904.

Moreira AA, Hilsdorf AW, Da Silva JV, De Souza VR. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. *Pesq Agropec Bras* 2007; 42 (4): 521-526.

Napora-Rutkowski Ł, Rakus K, Nowak Z, Szczygieł J, Pilarczyk A, Ostaszewska T, Irnazarow I. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains breed in Poland based on microsatellite, AFLP, and mtDNA genotype data. *Aquaculture* 2017; 473: 433–442

NMFS National Marine Fisheries Service Fisheries Statistics and Economics Division. Annual Trade Data by Product, Country/Association 2016. [access date: 11/20/2016] URL:
https://www.st.nmfs.noaa.gov/pls/webpls/trade_prdct_cntry_ind.results?qtype=IMP&qyearfrom=2015&qyearto=2016&qprod_name=TILAPIA&qcountry=%25&qsort=COUNTRY&qoutput=TABLE

Nei M. Genetic Distance between Populations. *Am Nat* 1972; 106(949):283-292.

Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 1978; 89(3):583-590

Nyingi D, De Vos L, Aman R, Agnèsè JF. Genetic characterization of an unknown and endangered native population of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

(Cichlidae; Teleostei) in the Loboï Swamp (Kenya). *Aquaculture* 2009; 297(1-4):57-63.

OIE World Organisation for Animal Health. *Aquatic Animal Health Code*. Paris: OIE; 2016.

Orozco-terWengel P, Corander J, Schlötterer C. Genealogical Lineage sorting leads to significant, but incorrect Bayesian multilocus inference of population structure. *Mol Ecol* 2011; 20(6):1108-1121.

Petersen RL, Garcia JE, Mello G, Liedke AM, Sincero TC, Grisard EC. Análise da diversidade genética de tilápias cultivadas no estado de Santa Catarina (Brasil) utilizando marcadores microssatélites. *Bol Inst Pesca* 2012; 38(4):313-321.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000; 155(2):945-959.

Pritchard JK, Wen X, Falush D. Documentation for structure software: version 2.3 2010. [access date: 11/20/2016] URL: http://pritchardlab.stanford.edu/structure_software/release_versions/v2.3.4/structure_document.pdf

Putman AI, Carbone I. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecol Evol* 2014; 4(22):4399-428.

Queirós J, Godinho R, Lopes S, Gortazar C, de la Fuente J, Alves PC. Effect of microsatellite selection on individual and population genetic inferences: an empirical study using cross-specific and species-specific amplifications. *Mol Ecol Resour* 2015; 15:747–760.

Rodriguez-Rodriguez MD, Lopera-Barrero NM, Vargas L, Albuquerque DM, Goes ES, Prado OP, Ribeiro RP. Caracterização genética de gerações de tilápia GIFT por meio

de marcadores microssatélites. *Pesq Agropec Bras* 2013; 48(10):1385-1393.

Romana-Eguia MR, Ikeda M, Basiao ZU, Taniguchi N. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture* 2004; 236(1-4):131-150.

Romana-Eguia MR, Ikeda M, Basiao ZU, Taniguchi N. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. *Aquaculture Res* 2005; 36(1):69-78.

Rousset F. Genepop'007: A complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 2008; 8(1):103-106.

Rutten MJ, Komen H, Deerenberg RM, Siwek M, Bovenhuis H. Genetic characterization of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using microsatellite markers. *Anim Genet* 2004; 35(2):93-97.

Saad YM, Rashed MA, Atta AH, Ahmed NE. The efficiency of microsatellite DNA markers for estimating genetic polymorphism in some Tilapia species. *Life Sci J* 2013; 10(3):2230-2234.

Selkoe KA, Toonen RJ. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 2006; 9:615–629

Shyamala G, Karal Marx K, Jeyasekaran G. Genetic diversity in farmed Nile and Red hybrid Tilapia stocks in India using microsatellite genetic markers. Master Thesis. Fisheries college and Research Institute, Tamil Nadu Fisheries University. Nagapattinam (India).

Stewart S, Wickramasinghe D, Dorrance A, Robertson A. Stewart, S., Wickramasinghe, D., Dorrance, A.E. Comparison of three microsatellite analysis

methods for detecting genetic diversity in *Phytophthora sojae* (Stramenopila: Oomycete). *Biotechnol Lett* 2011; 33:2217.

Sukmanomon S, Senanan W, Kapuscinski AR, Na-Nakorn U. Genetic diversity of feral populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand and evidence of genetic introgression. *Kasetsart J (Nat. Sci.)* 2012; 46:200-216.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P. Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Resour* 2004; 4(3):535-538.

Vemireddy LR, Archak S, Nagaraju J. Capillary electrophoresis is essential for microsatellite marker based detection and quantification of adulteration of Basmati rice (*Oryza sativa*) L. *J Agric Food Chem* 2007; 55:8112–8117

Weir B, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure Evolution 1984; 38(6):1358-1370.

Capítulo 2

Identificación de tilapias (Cichliformes:Cichlidae) ferales en embalses del norte de los Andes mediante código de barras de ADN

Objetivo específico:

Identificar molecularmente las especies de tilapia que se encuentran en estado feral en algunos embalses del departamento de Antioquia a partir de un fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I

Montoya-López et al. Identificación tilapias norte Andes COI

Identificación de tilapias (Cichliformes:Cichlidae) ferales en embalses del norte de los Andes mediante código de barras de ADN.

DNA Barcoding of feral tilapias from reservoirs in northern Andes

Andrés Montoya-López^{a,*}, Ariel Tarazona Morales^b, Martha Olivera-Angel^a, James Betancur-López^c.

^aGrupo Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. Carrera 75 # 65-87, Medellín, Colombia *andres.montoyal@udea.edu.co, martha.olivera@udea.edu.co

^bGrupo Biogénesis, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. Calle 59^a # 63-20. Medellín, Colombia amtarazonam@unal.edu.co

^cAsociación Colombiana de Acuicultores ASOACUICOLA, Medellín, Colombia asincronix@gmail.com

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo identificar mediante un fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I, individuos ferales de tilapia en los embalses: Peñol-Guatapé, Playas, San Lorenzo, Punchiná, Porce II y Porce III. La identificación se realizó mediante características morfológicas, herramientas en línea BLASTn y BOLD, además de una reconstrucción filogenética a partir del método Neighbor-Joining con el modelo de Kimura 2-parametros así como la delimitación de especies con el modelo mixto generalizado de coalescencia de Yule, agrupando 81

secuencias originales y 28 de referencia. Fue posible identificar cinco haplotipos de tilapias: *Oreochromis urolepis*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* y *Coptodon rendalli*. En el embalse Peñol-Guatapé, se registraron cuatro de los cinco haplotipos de tilapia hallados en todos los embalses muestreados, mientras que *Coptodon rendalli*, fue la especie con mayor distribución geográfica. Morfológicamente, los individuos se identificaron como *Oreochromis niloticus* (agrupando individuos con haplotipos *O. niloticus*, *O. aureus* y *O. urolepis*), *Oreochromis mossambicus* (haplotipos *O. mossambicus*) y *Coptodon rendalli* (sólo haplotipos de *C. rendalli*). Morfológicamente, no fue posible identificar ningún individuo como *O. aureus* o como *O. urolepis*. No es claro si la aparente hibridación introgresiva de *O. aureus* y *O. urolepis* hacia *O. niloticus* ocurrió antes o después de la introducción de estas especies a algunos embalses del norte de los Andes.

Palabras clave: Coptodon, especies introducidas, Oreochromis, taxonomía molecular

Abstract

The objective of this study was to identify the tilapias from six reservoirs in North Andean region: Peñol-Guatapé, Playas, San Lorenzo, Punchiná, Porce II and Porce III, using a fragment of the mitochondrial gene Cytochrome C Oxidase subunit I. Fish were identify by morphological characters and the sequences were analyzed using BLASTn, BOLD tools and constructing a Neighbor-Joining tree using the Kimura 2-Parameter method. This tree incorporated 81 original and 28 reference sequences. It was possible to identify five haplotypes of tilapia belonging to: *Oreochromis urolepis*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* and *Coptodon*

rendalli. Four of the five haplotypes were found on Peñol-Guatapé reservoir, and *Coptodon rendalli* haplotype was found on five of the six sampled reservoirs. Morphologically, the tilapias captured were identified as *Oreochromis niloticus* (grouping *O. niloticus*, *O. aureus* and *O. urolepis* haplotypes), *Oreochromis mossambicus* (only *O. mossambicus* haplotypes) and *Coptodon rendalli* (only *C. rendalli* haplotypes). None of the fish were identified as *O. aureus* or *O. urolepis* by morphological traits. It is unclear if the apparent introgressive hybridization from *O. aureus* and *O. urolepis* to *O. niloticus* occurred before or after the introduction of tilapias to reservoirs in some reservoirs in North Andean region.

Key words: Coptodon, introduced species, molecular taxonomy, Oreochromis

Introducción

Después de las carpas, las tilapias son el grupo de peces más cultivado en el mundo, principalmente la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (FAO, 2016). Diferentes estudios indican que las tilapias, han colonizado exitosamente una gran parte de las áreas tropicales y subtropicales del planeta (por ejemplo, FISHBASE enumera 96 países diferentes donde se ha registrado a *O. niloticus* como especie nativa o introducida), existiendo poblaciones ferales en todas las regiones donde se cultivan o se han importado (Canonico et al., 2005; Gu et al., 2015; Froese y Pauly, 2016).

La introducción de distintas especies de los géneros *Coptodon* y *Oreochromis* nativos de África y el oriente medio, a Colombia, Perú y Ecuador se ha registrado desde mediados del siglo XX (Alvarez, 1983; Baltazar, 2007). En el caso

particular de Colombia, la introducción de las especies *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852), *Coptodon rendalli* (Boulenger, 1897) y *O. niloticus*, en los años 1953, 1960 y 1979 respectivamente, se realizan con el propósito de fomentar la acuicultura de autoconsumo. Posteriormente, en 1982, se importan variedades rojas de *O. mossambicus* así como *Oreochromis urolepis* (Norman, 1922) para piscicultura intensiva comercial. Para el año 1989, se tiene evidencia de la introducción de *Oreochromis aureus* (Steindachner, 1864). Con el aumento de la producción piscícola en la década de 1990, se amplía también la distribución de híbridos rojos de *Oreochromis* en Colombia. Los países identificados como orígenes de los individuos introducidos de estas especies, fueron: Panamá, Estados Unidos, México y Brasil (Castillo, 2001; Gutiérrez-bonilla y Álvarez-león, 2011; Gutiérrez et al., 2012; INPA, 2001; Larrahondo, 1992; Rodríguez et al., 2001). En el año 2008, la Resolución 0848 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia, declaró la tilapia (*O. niloticus* y *O. mossambicus*) como especie exótica invasora, con lo que disminuyó la importación legal de variedades adicionales. Sin embargo, la Resolución 2287 del año 2015 de la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca, cambia el estatus de la tilapia a pez doméstico.

En Colombia, la tilapia (*Oreochromis* sp.) es la especie más importante en la piscicultura, aportando más de 65.000 toneladas anuales en la producción acuícola. Las introducciones voluntarias, tanto estatales como privadas o a partir de escapes de tilapia provenientes de cultivos a lo largo de la cuenca Cauca-Magdalena, ha generado el establecimiento de poblaciones ferales de estas especies en ambientes naturales tanto lenticos como loticos y en embalses dedicados a la producción de energía,

algunas de las cuales soportan pesquerías artesanales con productividades variables (Blanco et al., 2007; Caraballo, 2009; Caraballo y Gandara, 2010; Gutiérrez-bonilla y Álvarez-león, 2011; Jiménez-Segura et al., 2015; Lasso et al., 2011; Valderrama, 2015). La correcta identificación así como el monitoreo regular de estas poblaciones, son necesarios para asegurar un manejo apropiado, el cual es diferente para cada cuerpo de agua (Maranan et al., 2015).

La identificación mediante caracteres morfológicos de las especies de tilapias pertenecientes a los géneros *Oreochromis* y *Sarotherodon*, por fuera de su rango natural de distribución, se dificulta por la fácil hibridación entre sus diferentes especies (Bbole et al., 2014; Yereima, 2015). De acuerdo con los trabajos de Nagl et al. (2001) y Van der Bank et al. (1989) la distinción entre especies en estos géneros, es notoriamente difícil, debido a que sus descripciones están basadas en caracteres merísticos y morfométricos que presentan variación intraespecífica y solapamiento interespecífico. En este contexto, existe un beneficio en el uso de técnicas basadas en ADN, para la identificación debido a la falta de resolución apoyada en caracteres morfológicos.

Desde la propuesta de Hebert et al. (2003) de la identificación a nivel de especie a partir de una secuencia corta y estandarizada del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa I (COI) como el centro del sistema mundial de bio-identificación animal, así como la subsiguiente campaña: “FISH-BOL” que tenía como objetivo reunir los códigos de barras de ADN de todas las especies de peces del planeta (Hanner y Hebert, 2009), la información disponible para identificación de peces utilizando código de barras ha crecido exponencialmente (Becker et al., 2011; Victor et al., 2015).

En los embalses del norte de los Andes dedicados a la producción de energía, como son: Peñol-Guatapé, Playas, San Lorenzo, Punchiná, Porce II y Porce III, se han registrado previamente las especies *O. niloticus*, *O. mossambicus* y *C. rendalli* (Jiménez-Segura et al., 2015; Pareja-Carmona y Ospina-Pabón, 2014). Sin embargo, no se han realizado investigaciones sobre la identificación molecular de estos individuos. El presente estudio tuvo como objetivo identificar mediante un fragmento de COI, las especies ferales de tilapia que se encuentran en seis embalses al norte de los Andes.

Materiales y métodos

Área de estudio, toma de muestras e identificación morfológica

Los métodos siguieron lo descrito en Steinke y Hanner (2011) como se especifica a continuación. Entre septiembre de 2014 y junio de 2015, 137 individuos de la familia Cichlidae fueron capturados mediante diferentes artes de pesca como fueron trasmallo, atarraya y líneas de anzuelos, en los embalses: Peñol-Guatapé (n=12), Playas (n=44), San Lorenzo (n=17), Punchiná (n=12), Porce II (n=17), y Porce III (n=35), del Departamento de Antioquia, Colombia (figura 1). A cada individuo, le fue asignado un código único y fueron fotografiados con una cámara Canon EOS 7D. Posteriormente, a cada pez se le tomó una muestra de aleta y branquia, las cuales fueron conservadas en etanol 96%, transportadas al laboratorio y almacenadas hasta su procesamiento a -80°C. Una vez se tomaron las muestras de tejido, los individuos fueron fijados en formol 10%. Después, los peces fueron lavados y almacenados en

etanol 70%. Los peces fueron identificados morfológicamente a partir de lo descrito por Carpenter y Niem (2001) y Maldonado-Ocampo et al. (2005). La identificación morfológica de los individuos del género *Oreochromis* se basó en lo descrito por Trewavas (1983). Como se observa en la tabla 1, la mayoría de los caracteres diagnósticos tanto merísticos como morfométricos, se superponen entre las especies. Es por esto que se siguió el criterio tomado por Maranan et al. (2015) y Gu et al. (2016) para la identificación de especies de *Oreochromis* a partir del patrón de coloración de la aleta caudal. Adicionalmente, los individuos de *O. mossambicus* se identificaron en todos los casos, por el menor número de branquiespinas en la parte inferior del primer arco branquial.

Extracción de ADN, amplificación, secuenciación

El ADN total, fue extraído de las muestras mediante el kit DNeasy para sangre y tejido en el sistema automatizado QIACUBE, ambos de QIAGEN, según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el ADN total fue cuantificado, su pureza fue registrada a partir del índice 260/230 mediante Nanodrop (Thermo Scientific) y su integridad fue visualizada mediante geles de agarosa al 1.2% con SYBR safe (Thermo Scientific) como intercalante. Los cebadores utilizados para amplificar una región de 650 pares de bases de COI fueron FishF1 (TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC) y FishR1 (TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA) (Ward et al., 2005). La mezcla para la PCR fue: 10 uL de PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific), 1 µL de cada Primer (0.01mM), DNA 2 µL (concentración promedio de 122 ng/µl), Agua libre de nucleasas (Thermo Scientific) 6 µL para un volumen total de reacción de 20 µL. El perfil térmico aplicado fue: 2 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 52°C,

1 minuto a 72 °C y un ciclo final de 10 minutos a 72°C. Los productos visibles de alta integridad, fueron enviados a secuenciación a Macrogen (Corea).

Análisis de las secuencias de ADN

La obtención de las secuencias consenso y la edición manual de las mismas, se realizaron en el programa Geneious versión 8.1.5. El programa Mega versión 6.0 se utilizó para identificar deleciones, inserciones y codones de parada. La identificación de los haplotipos, se realizó mediante DnaSP versión 5.0. Las secuencias fueron comparadas con las registradas en las bases de datos mediante las herramientas en línea de identificación de BOLD (<http://boldsystems.org/>) y BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en las cuales, se consideró la identificación a nivel de especie con una similitud total de 100%. Las distancias genéticas, se calcularon mediante comparación por pares (Pairwise) usando 10.000 repeticiones de bootstrap con el modelo de Kimura 2-parametros y se construyó un árbol a partir del método Neighbor-Joining con secuencias originales y de referencia obtenidas de las bases de datos antes mencionadas, usando el programa Mega versión 6.0. Se consideró como grupo externo para el análisis de las tilapias, las secuencias obtenidas de los ciclidos neotropicales capturados en los embalses. El programa Kakusan4 se utilizó para identificar el mejor modelo de sustitución de nucleótidos. BEAST versión 2.5.1 se empleó para construir un árbol ultramétrico utilizando un reloj estricto. En el árbol, se implementó un modelo de Yule con una distribución gamma. La longitud de la Cadena de Markov Monte Carlo fue de 10^8 con un período de “*burn-in*” del 10% y almacenamiento cada 1.000 generaciones. El programa Tracer versión 1.6 se utilizó para evaluar la convergencia mediante el tamaño de muestra efectivo (ESS) de cada

parámetro (≥ 200). Para la delimitación de especies se utilizó el modelo mixto generalizado de coalescencia de Yule (GMYC) implementado en el paquete splits para el programa R versión 3.5.1. Las localidades tipo y la distribución original de las diferentes especies, para esclarecer la posible identidad de los clúster se obtuvieron de Eschmeyer et al. (2016) y Trewavas (1983)

Resultados

Fue posible obtener secuencias de alta calidad provenientes de 81 individuos de la familia Cichlidae y cuya longitud varió entre 600 y 611 pares de bases (pb). Se identificaron siete haplotipos diferentes, cinco de cíclidos introducidos y dos pertenecientes a especies nativas. En total, 77 individuos capturados en los seis embalses correspondieron a haplotipos de tilapias pertenecientes a dos géneros y cinco especies: *O. urolepis*, *O. mossambicus*, *O. niloticus*, *O. aureus* y *C. rendalli*. En el embalse Peñol-Guatapé, fue posible registrar cuatro de los cinco haplotipos de tilapia hallados en los seis embalses muestreados, mientras que *C. rendalli*, fue el haplotipo con mayor distribución geográfica, ya que fue registrado en cinco de los seis embalses. Las tilapias capturadas, fueron identificadas morfológicamente como *O. niloticus* (esta identificación agrupó a individuos con haplotipos *O. niloticus*, *O. aureus* y *O. urolepis*), *O. mossambicus* (los cuales solo tuvieron haplotipos de *O. mossambicus*) y *C. rendalli* (sólo haplotipos de *C. rendalli*). Morfológicamente, no fue posible identificar ningún individuo como *O. aureus* o como *O. urolepis*. En la tabla 2, se pueden encontrar los

registros en GenBank de algunas secuencias representativas obtenidas en el presente estudio.

Un total de 109 secuencias (81 originales y 28 provenientes de bases de datos) fueron utilizadas para el análisis de distancias genéticas y construcción del árbol Neighbor-Joining, como se muestra en la figura 2. Las secuencias de referencia obtenidas de las bases de datos, tuvieron una longitud entre 563 y 707 pb. La proporción media de nucleótidos de estas 109 secuencias fueron: C 29,96%, T 28.68%, A 23.93% y G 17.43%, mostrando 211 sitios variables y 174 parsimoniosamente informativos. En el árbol, se pueden apreciar cinco grupos donde se encuentran los haplotipos de las especies de tilapia caracterizados en el presente estudio. El grupo A, que fue nombrado *O. urolepis* debido a la presencia única de esta especie, estuvo conformado por secuencias de individuos capturados en los embalses Peñol-Guatapé y Punchiná (haplotipo 1) junto con secuencias provenientes de Brasil e Israel. El grupo B, fue denominado como *O. mossambicus* y allí se encontró el haplotipo 2 que se registró para los embalses Porce II y Porce III. El grupo C, estuvo conformado por 8 secuencias de referencia identificadas como *O. niloticus*, *O. mossambicus*, y *O. aureus* x *O. niloticus* junto con dos individuos del haplotipo 3 provenientes del embalse Peñol-Guatapé. Este grupo, se denominó *O. niloticus* debido a la presencia de la secuencia KJ443695 proveniente de Egipto y a que la localidad tipo de esta especie es el río Nilo. El grupo D, fue denominado como *O. aureus* debido a que allí se encontraron las secuencias KJ553805 y FJ348093 colectadas en Marruecos e Israel respectivamente. Si bien la localidad tipo de esta especie es el occidente de África, su rango de

distribución natural se extendía por el norte de África hasta el medio oriente. El clúster D, agrupó a secuencias de individuos identificados como *Oreochromis leucostictus* (Trewavas, 1933), *O. aureus* y *O. niloticus*, así como al haplotipo 4 encontrado en los embalses: Playas, Peñol-Guatapé, Porce II, Porce III y Punchiná. En este grupo, se identificaron tres subgrupos denominados como D1, D2 y D3. El subgrupo D1 estuvo formado por una sola secuencia, mientras que los subgrupos D2 y D3 estuvieron conformados por tres y cinco secuencias respectivamente. En el subgrupo D3 se encontró el haplotipo 4, al igual que secuencias de individuos identificados como *O. niloticus* provenientes de México y Brasil, junto a una secuencia identificada como *O. aureus* originaria de Marruecos. El grupo E fue denominado como *C. rendalli* y allí se encontraron individuos capturados en los seis embalses donde se tomaron muestras para el presente estudio. Los valores bootstrap de estos cinco grupos fue 100. El haplotipo 6 correspondió a individuos identificados como *Andinoacara latifrons* (Steindachner, 1878) capturados en los embalses Porce II y Porce III. Este haplotipo tuvo una similitud de 100% con la secuencia KJ669374 proveniente del comercio de peces ornamentales en Australia e identificada como *Andinoacara pulcher* (Gill, 1858). Sin embargo, es muy probable que debido a la falta de información sobre el origen geográfico del individuo de donde fue aislada la secuencia KJ669374, este fuera identificado como *A. pulcher*. El haplotipo 7 se encontró en individuos de *Kronoheros umbrifer* (Meek & Hildebrand, 1913) provenientes de los embalses Playas y San Lorenzo.

Las distancias genéticas K2P generales, estuvieron entre 0.000 y 0.244 con un promedio de 0.105 y un error estándar a partir del bootstrap de 0.009 (ver tabla 3). El Grupo D, obtuvo la mayor distancia entre las secuencias al interior de un grupo, con un promedio de 0.005 y un error estándar de 0.002. Entre los grupos constituidos por las diferentes especies de *Oreochromis* analizadas, los grupos A y B presentaron la menor distancia (0.045), mientras que los grupos C y D obtuvieron la mayor distancia (0.084). Las distancias promedio entre los grupos de *Oreochromis* y el grupo E (*C. rendalli*) se encontraron entre 0.134 (grupos D y E) y 0.145 (grupos B y E). Dentro del grupo C, el haplotipo 3 tuvo una distancia de 0.006 con la secuencia KJ443695 procedente de Egipto, así como unas distancias de 0.002 y 0.004 con las secuencias HM345942 (Indonesia) y JX260932 (India) respectivamente. Por otro lado, las secuencias FJ348108, DQ426666, Q654743, JQ742041 y JX173758 fueron iguales al haplotipo 3. D2 y D3 fueron más similares (distancia promedio 0.004) entre los subgrupos de D, mientras que D1 y D3 fueron los subgrupos más distantes (0.017). Al interior del grupo E, el haplotipo 5 fue igual a la secuencia KT193036 proveniente de Congo pero presentó una distancia de 0.004 con la secuencia JN989250 originaria de Brasil.

A partir del análisis de delimitación de especies mediante GMYC, fue posible identificar 17 unidades taxonómicas operativas (UTOs) (tabla 4 y figura 3). Las secuencias de *O. niloticus* KJ443695 (Egipto), JX260932 (India) y HM345942 (Indonesia) representaron cada una diferentes UTOs. Las secuencias FJ348093 (*O. aureus*, Israel), FJ348063 (*O. aureus*, Israel) y HM882898 (*O. niloticus*, Nigeria) formaron un UTO diferente al de las secuencias FFMBH1432, EU751883, GU702174, GU702137 y el haplotipo cuatro.

Discusión

Los análisis realizados en el presente estudio, se llevaron a cabo con secuencias de COI con una longitud mínima de 563 pares de bases, la cual según Hubert y Hanner (2015) es aceptable para el método de código de barras de ADN para la delimitación de especies. La proporción media de nucleótidos de las secuencias analizadas, la diferenciación entre especies mediante definición de grupos en el árbol Neighbor-Joining, los valores bootstrap así como las distancias genéticas K2P medias entre los grupos establecidos, fueron similares a los reportados por Maranan et al. (2015). Sin embargo, difieren de lo descrito por Wu y Yang (2012) debido a que estos autores no encontraron diferencias en las secuencias de COI entre *O. aureus* y *O. niloticus* por las secuencias de referencia utilizadas.

Diversos estudios, han evidenciado la transferencia de material genético de una especie al acervo de otra diferente, como resultado de la hibridación y el retrocruzamiento (introgresión) entre especies del género *Oreochromis*, tanto al interior como por fuera de su rango natural de distribución. Gregg et al. (1998) establecieron que, debido al trasplante de especies, *O. mossambicus*, *Oreochromis mortimeri* (Trewavas, 1966) y *Oreochromis macrochir* (Boulenger, 1912) se han encontrado en la misma localidad en Zimbabue, mostrando señales de hibridación introgresiva. D'Amato et al. (2007) y Firmat et al. (2013) hallaron individuos identificados morfológicamente como *O. mossambicus*, en localidades de distribución natural de esta especie, con

haplotipos en la región control del ADN mitocondrial iguales a los de *O. niloticus*, *O. mortimeri*, *Oreochromis andersonii* (Castelnau, 1861) y *Oreochromis karongae* (Trewavas, 1941). Por su parte, Nyingi y Agnèse (2007) registraron en el lago Baringo en Kenia, individuos identificados mediante microsatelites como *O. niloticus* con haplotipo en el D-Loop mitocondrial idéntico al de *O. leucostictus*.

En poblaciones naturales de *O. niloticus* en Africa occidental, se han registrado haplotipos en el ADN mitocondrial idénticos al de *O. aureus* (Agnèse et al., 1997). De acuerdo con Rognon y Guyomard (2003) la hipótesis más consistente con el patrón de variación nuclear y mitocondrial observado en *O. niloticus* y *O. aureus* en la región Sudano-Saheliana en Africa occidental, es la introgresión unidireccional y completa del ADN mitocondrial de *O. aureus* a *O. niloticus*. Según estos autores, aunque esta introgresión podría ser antigua, su aparición reciente es apoyada por la falta de diferenciación entre las secuencias de ADN mitocondrial de las dos especies. Por otro lado, se ha reportado que los registros del pedigrí materno de algunas variedades de *Oreochromis* sp. utilizadas para la piscicultura, no corresponden con su identificación mediante COI (Ordoñez et al., 2016).

En el presente trabajo, fue posible identificar cinco haplotipos de tilapias (cuatro del género *Oreochromis* y uno del género *Coptodon*) en seis embalses del Norte de los Andes. Estos resultados son consecuentes con los registros históricos de importación de tilapias a Colombia, como se expuso previamente. La falta de

identificación morfológica de individuos con haplotipos *O. aureus* y *O. urolepis* registrada en el presente estudio y su caracterización como *O. niloticus*, se puede explicar a partir de dos hipótesis: i. la hibridación introgresiva hacia *O. niloticus*, ocurrió antes de la introducción a los embalses de Antioquia o ii. la hibridación introgresiva ocurrió después de la introducción. El caso de *O. aureus*, puede ser explicado por ambos escenarios, debido a los reportes antes mencionados de haplotipos idénticos a los de esta especie en poblaciones naturales de *O. niloticus* en África, sin descartar la posibilidad adicional de liberaciones y/o escapes de individuos de *O. aureus* que se hayan hibridado con *O. niloticus*. Acorde con la revisión de Eknath y Hulata (2009) casi todos los grupos “domesticados” que se usan en la acuicultura de *O. niloticus*, proceden de poblaciones fundadoras muy pequeñas que han experimentado introgresión de genes de otras especies. Estos autores, afirman que es el caso del envío a Brasil en 1971 de cerca de 60 individuos de *O. niloticus* de origen desconocidos, de donde posteriormente, la Universidad de Auburn (Estados Unidos) recibió una población fundadora de aproximadamente 100 alevinos que fue importante en la diseminación de la especie por el continente Americano. Por otra parte, la identificación morfológica de solo dos especies de *Oreochromis* (*O. niloticus* y *O. mossambicus*) en el presente estudio, es semejante a los registros de colecciones ictiológicas de Colombia, en las cuales no se reporta ninguna otra especie para este género en el país (ICN, 2017; SIB, 2017).

La diferencia entre la identificación morfológica y la obtenida mediante COI que se registró en algunos individuos, podría mostrar la presencia de híbridos de

Oreochromis en las poblaciones ferales de tilapia en embalses del norte de los Andes. En el presente estudio sólo se empleó un marcador mitocondrial, por lo cual no se puede evidenciar el linaje paterno de los individuos. Sin embargo, es posible que las poblaciones ferales de *Oreochromis* presentes en los seis embalses de donde se obtuvieron muestras, provengan del cruce de más de dos especies debido a la presencia de más de tres haplotipos distintos en un mismo embalse. Agresti et al., (2000) reportaron descendencia viable de cruces tri híbridos y tetra híbridos de tilapias, por ejemplo, *O. mossambicus* hembra x (*O. niloticus* x *O. aureus*) macho o (*Sarotherodon galilaeus* (Linnaeus, 1758) x *O. niloticus* rojo) hembra x (*O. mossambicus* x *O. aureus*) macho. Según Maranan et al. (2015) en las poblaciones interespecíficas que exhiben múltiples linajes mitocondriales, la identificación más frecuente a partir de mtADN, será aquella que tenga la mayor proporción de hembras relacionado con su éxito reproductivo.

En conclusión, se registraron cinco haplotipos de tilapia en seis embalses del norte de los Andes en Colombia: *Oreochromis urolepis*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* y *Coptodon rendalli*. De estos, solo fue posible la identificación morfológica de *O. mossambicus*, *O. niloticus* y *C. rendalli*. No es claro si la aparente hibridación introgresiva de *O. aureus* y *O. urolepis* hacia *O. niloticus* ocurrió antes o después de la introducción de estas especies a estos embalses.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de la Gobernación de Antioquia en el marco del convenio 4600000970 SADRA-ASOACUICOLA del fondo de Ciencia Tecnología e innovación del Sistema General de Regalías. Queremos agradecer al Doctorado en Ciencias Animales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia y al Programa Nacional de Formación de Investigadores - crédito educativo condonable de Colciencias convocatoria 567 de estudios de doctorado en Colombia.

Referencias

- Agnès, J. F., Adepo-Gourene, B., Abban, E. K. y Fermon, Y. (1997). Genetic differentiation among natural populations of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Heredity*, 79, 88–96.
- Agresti, J. J., Seki, S., Cnaani, A., Poompuang, S., Hallerman, E. M., Umiel, N. y May, B. (2000). Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture*, 185, 43–56.
- Alvarez, M. (1983). Informe sobre el desarrollo de la acuicultura en el Ecuador. *Informes nacionales sobre el desarrollo de la acuicultura en América latina. FAO Informe de Pesca No 294*. Roma: FAO.
- Baltazar, P. M. (2007). La tilapia en el Perú: acuicultura, mercado, y perspectivas. *Revista Peruana de Biología*, 13, 267–273.
- Bbole, I., Katongo, C., Deines, A. M., Shumba, O. y Lodge, D. M. (2014). Hybridization between non-indigenous *Oreochromis niloticus* and native *Oreochromis* species in the lower Kafue River and its potential impacts on fishery. *Journal of Ecology and The Natural Environment*, 6, 215–225.
- Becker, S., Hanner, R. y Steinke, D. (2011). Five years of FISH-BOL: brief status report. *Mitochondrial DNA*, 22, 3–9.
- Blanco, J. A., Narváez Barandica, J. C. y Vilorio, E. A. (2007). ENSO and the rise and

- fall of a tilapia fishery in northern Colombia. *Fisheries Research*, 88, 100–108.
- Canonico, G. C., Arthington, A., Mccrary, J. K. y Thieme, M. L. (2005). The effects of introduced tilapias on native biodiversity. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15, 463–483.
- Caraballo, P. (2009). Efecto de Tilapia *Oreochromis niloticus* sobre la producción pesquera del embalse el Gaujaro Atlántico - Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 14, 1796–1802.
- Caraballo, P. y Gandara, M. (2010). El sector pesquero en el departamento de Sucre, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Animales*, 2, 153–162.
- Carpenter, K. E. y Niem, V. H. (2001). *FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 5. Bony fishes part 3 (Menidae to Pomacentridae)*. Roma: FAO.
- Castillo, L. F. (2001). La importancia de la Tilapia roja en el desarrollo de la piscicultura en Colombia. Recuperado el 01 abril, 2016 de:
<https://ag.arizona.edu/azaqua/ista/new/TilapiaColombia.pdf>
- D'Amato, M. E., Esterhuysen, M. M., Van Der Waal, B. C. W., Brink, D. y Volckaert, F. A. M. (2007). Hybridization and phylogeography of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* in southern Africa evidenced by mitochondrial and microsatellite DNA genotyping. *Conservation Genetics*, 8, 475–488.
- Eknath, A. E. y Hulata, G. (2009). Use and exchange of genetic resources of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Reviews in Aquaculture*, 1, 197–213.
- Eschmeyer, W. N., Fricke, R. y van der Lan, R. (2016). Catalog of Fishes. Genera, species and references. Recuperado el 05 enero, 2017 de:
<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). *Fishery and Aquaculture Statistics*. Roma: FAO.
- Firmat, C., Alibert, P., Losseau, M., Baroiller, J. F. y Schlieuwen, U. K. (2013). Successive invasion-mediated interspecific hybridizations and population structure in the endangered cichlid *Oreochromis mossambicus*. *PLoS ONE*, 8, e63880.
- Froese, R. y Pauly, D. (2016). FishBase. World wide web electronic publication. Recuperado el 10 junio, 2016 de: www.fishbase.org, version (06/2016).
- Gregg, R. E., Howard, J. H. y Shonhiwa, F. (1998). Introgressive hybridization of tilapia in Zimbabwe. *Journal of Fish Biology*, 52, 1–10.
- Gu, D. E., Ma, G. M., Zhu, Y. J., Xu, M., Luo, D., Li, Y. Y. y Hu, Y. C. (2015). The impacts of invasive Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the fisheries in the main rivers of Guangdong Province, China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 59, 1–

7.

- Gu, D. E., Mu, X. D., Xu, M., Luo, D., Wei, H., Li, Y. Y. y Hu, Y. C. (2016). Identification of wild tilapia species in the main rivers of south China using mitochondrial control region sequence and morphology. *Biochemical Systematics and Ecology*, 65, 100–107.
- Gutiérrez-bonilla, F. y Álvarez-león, R. (2011). Los cíclidos (Pisces: Cichlidae) en Colombia: introducciones, trasplantes y repoblaciones. *Luna Azul*, 33, 154–177.
- Gutiérrez, F., Lasso, C., Baptiste, M., Sánchez-Duarte, P. y Díaz, A. (Eds.). (2012). *VI. Catálogo de la biodiversidad acuática exótica y trasplantada en Colombia: moluscos, crustáceos, peces, anfibios, reptiles y aves. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia*. Bogotá D.C.: Instituto de Investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt .
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. y DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Hubert, N. y Hanner, R. (2015). DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. *DNA Barcodes*, 3, 44–58.
- INPA, Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (2001). *Boletín estadístico pesquero colombiano*. Bogotá: INPA.
- ICN, Instituto de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Colombia. (2017). Colecciones Científicas en línea. Recuperado el 23 enero, 2017 de: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/result/genus/oreochromis/>
- Jiménez-Segura, L., Álvarez, J., Ochoa, L., Loaiza, A., Londoño, J., Restrepo, D. y Jaramillo-Villa, U. (2015). *Guía ilustrada de peces cañon del rio Porce, Antioquia*. Medellín: EPM. Universidad de Antioquia, Herbario Universidad de Antioquia.
- Larrahondo, M. (1992). *Aprovechamiento acuicola de embalses en colombia. Avances en el manejo y aprovechamiento acuicola de embalses en america latina y el caribe documento de campo*. Mexico D.F.: FAO.
- Lasso, C., Gutiérrez, F., Morales-Betancourt, M., Agudelo, E., Ramírez-Gil, H. y Ajiaco-Martínez, R. (2011). *Pesquerías continentales de Colombia: cuencas del Magdalena-Cauca, Sinú, Canalete, Atrato, Orinoco, Amazonas y vertiente del Pacífico. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia*. Bogotá D.C.: Instituto de Investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Maldonado-Ocampo, J. A., Ortega-Lara, A., Usma, J. S., Galvis, V. G., Villa-Navarro, F. A., Vásquez, G. L. y Ardila, C. (2005). *Peces de los Andes de Colombia*. Bogotá D.C.: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

- Maranan, J. B. D., Basiao, Z. U. y Quilang, J. P. (2015). DNA barcoding of feral tilapias in Philippine lakes. *Mitochondrial DNA*, 1736, 1–12.
- Nagl, S., Tichy, H., Mayer, W. E., Samonte, I. E., McAndrew, B. J. y Klein, J. (2001). Classification and phylogenetic relationships of African tilapiine fishes inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20, 361–374.
- Nyingi, D. W. y Agnèse, J. F. (2007). Recent introgressive hybridization revealed by exclusive mtDNA transfer from *Oreochromis leucostictus* (Trewavas, 1933) to *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in Lake Baringo, Kenya. *Journal of Fish Biology*, 70, 148–154.
- Ordoñez, J. F., Ventolero, M. F. y Santos, M. D. (2016). Maternal mismatches in farmed tilapia strains (*Oreochromis* spp.) in the Philippines as revealed by mitochondrial COI gene. *Mitochondrial DNA*, 1394, 1–10.
- Pareja-Carmona, M. y Ospina-Pabón, J. (2014). Listado taxonómico de especies ícticas de importancia pesquera en tres embalses del Oriente antioqueño, cuenca del río Magdalena, Colombia. *Biota Colombiana*, 15, 54–60.
- Rodríguez, H., Victoria, P. y Carrillo, M. (Eds.). (2001). *Fundamentos de Acuicultura Continental*. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura INPA.
- Rognon, X. y Guyomard, R. (2003). Large extent of mitochondrial DNA transfer from *Oreochromis aureus* to *O. niloticus* in West Africa. *Molecular Ecology*, 12, 435–445.
- SIB. (2017). Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia. Recuperado el 23 enero, 2017 de: <http://datos.biodiversidad.co/>
- Steinke, D. y Hanner, R. (2011). The FISH-BOL collaborators' protocol. *Mitochondrial DNA*, 22, 10–14.
- Trewavas, E. (1983). *Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia*. Londres: British Museum.
- Valderrama, M. (2015). La pesca en la cuenca Magdalena-Cauca: análisis integral de su estado y su problemática y discusión de la estrategia de manejo. En Rodríguez, M (Ed), *¿Para Dónde va El Río Magdalena? Riesgos Sociales, Ambientales Y Económicos Del Proyecto de Navegabilidad*. Bogotá D.C.: Friedrich-Ebert-Stiftung, Foro Nacional Ambiental.
- Van der Bank, F. H., Ferreira, J. T. y Grant, W. S. (1989). An evaluation of morphometric and meristic characters frequently used in identification keys for fifteen cichlid fish species endemic to southern Africa. *Madoqua*, 16, 77–86.
- Victor, B. C., Valdez-Moreno, M. y Vásquez-Yeomans, L. (2015). Status of DNA barcoding coverage for the tropical western atlantic shorefishes and reef fishes, 3, 85–93.

- Ward, R. D., Hanner, R. y Hebert, P. D. N. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74, 329–356.
- Ward, R., Zemlak, T., Innes, B., Last, P. y Hebert, P. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360, 1847–1857.
- Wu, L. y Yang, J. (2012). Identifications of captive and wild tilapia species existing in Hawaii by mitochondrial DNA control region sequence. *PLoS ONE*, 7, 1–9.
- Yeremia, C. (2015). *Assessment of changes in genetic diversity of Nile Tilapia, Oreochromis niloticus (Linnaeus , 1758), of lake Baringo. Tesis de Maestria.* Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad de Nairobi. Nairobi

Tabla 1. Caracteres diagnósticos morfométricos y merísticos para la identificación de cuatro especies de *Oreochromis* según (Trewavas, 1983). LS, longitud estándar.

Especie	Profundidad % LS	Escamas en la línea lateral	Profundidad preorbital % cabeza	Longitud de la mandíbula inferior % cabeza	Branquias en el lóbulo inferior del primer arco branquial	Longitud faríngea % cabeza	Espinas aleta anal	Espinas de la aleta dorsal	Vertebras	Patrón de coloración de la aleta caudal
<i>O. niloticus</i>	36.5-50	31-34	16-22	29-36	18-28	28-33.4	III	XV-XVII	26-32	-Franjas verticales estrechas con muy poca o ninguna anastomosis
<i>O. aureus</i>	35-49	30-33	16-23	29.5-37	18-22	23.8-31.1	III	XIV-XVII	28-31	-Nunca presenta las rayas verticales regulares oscuras características de <i>O. niloticus</i> , pero tiene un amplio margen distal rosa a rojo brillante
<i>O. urolepis</i>	41.5-48	30-31	23-28.5	31.5-47	20-27	28.2-34.6	III	XV-XVIII	29-30	-Franjas verticales estrechas en la primera mitad con margen rojo brillante, rosa o

<i>O. mossambicus</i>	36-49.5	30-32	20-24.5	32-45.5	14-20	28.1-33.8	III	XV-XVII	28-31	naranja -En machos reproductores, negro con margen escarlata
-----------------------	---------	-------	---------	---------	-------	-----------	-----	---------	-------	---

Tabla 2. Identificadores de acceso a GenBank de las secuencias originales obtenidas en el presente estudio.

Haplotipo	Identificación mediante BLASTn, BOLD y reconstrucción filogenética	Identificación morfológica	Localidad	Identificador de acceso GenBank
Haplotipo 1	<i>Oreochromis urolepis</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Punchiná	KY454449
Haplotipo 2	<i>Oreochromis mossambicus</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Porce II	KY454450
Haplotipo 3	<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Peñol-Guatapé	KY454448
Haplotipo 4	<i>Oreochromis aureus</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Peñol-Guatapé	KY454447
Haplotipo 5	<i>Coptodon rendalli</i>	<i>Coptodon rendalli</i>	Playas	KY454444
Haplotipo 5	<i>Coptodon rendalli</i>	<i>Coptodon rendalli</i>	San Lorenzo	KY454445
Haplotipo 5	<i>Coptodon rendalli</i>	<i>Coptodon rendalli</i>	Porce III	KY454446
Haplotipo 6	<i>Andinoacara pulcher*</i>	<i>Andinoacara latifrons</i>	Porce II	KY454452
Haplotipo 7	<i>Caquetaia umbrifera</i>	<i>Kronoheros umbrifer</i>	Playas	KY454451

*Similitud del 100% con la secuencia KJ669374 proveniente del comercio de peces ornamentales en Australia, pero probablemente un individuo de *A. latifrons*.

Tabla 3. Resumen de las distancias genéticas totales, adentro y entre los grupos utilizando el método de dos parámetros de Kimura.

Comparación	Mínimo (comparación por pares)	Máximo (comparación por pares)	Promedio	Error estándar obtenido del bootstrap
Todas las secuencias	0.000	0.244	0.105	0.009
Al interior del Grupo A	0.000	0.000	0.000	0.000
Al interior del Grupo B	0.000	0.000	0.000	0.000
Al interior del Grupo C	0.000	0.009	0.003	0.001
Al interior del Grupo D	0.000	0.017	0.005	0.002
Al interior del Grupo D2	0.000	0.000	0.000	0.000
Al interior del Grupo D3	0.000	0.000	0.000	0.000
Al interior del Grupo E	0.000	0.004	0.003	0.002
Entre Grupos A y B	0.045	0.045	0.045	0.009
Entre Grupos A y C	0.065	0.072	0.067	0.012
Entre Grupos A y D	0.080	0.091	0.081	0.012
Entre Grupos A y E	0.141	0.141	0.140	0.018
Entre Grupos B y C	0.059	0.063	0.060	0.011
Entre Grupos B y D	0.076	0.082	0.079	0.012
Entre Grupos B y E	0.145	0.145	0.145	0.019
Entre Grupos C y D	0.078	0.096	0.084	0.018
Entre Grupos C y E	0.134	0.144	0.138	0.018
Entre Grupos D y E	0.130	0.142	0.134	0.018
Entre subgrupos D1 y D2	0.013	0.013	0.013	0.005
Entre subgrupos D1 y D3	0.017	0.017	0.017	0.005
Entre subgrupos D2 y D3	0.004	0.004	0.004	0.003

Tabla 4. Unidades taxonómicas operativas (UTO) obtenidas mediante el análisis GMYC

UTO	Secuencia	UTO	Secuencia
1	FISH055-08 <i>O. urolepis</i> Brasil	4	Haplotipo 4
	Haplotipo 1		FISH001-08 <i>O. aureus</i> Israel
	<i>O. urolepis</i> KM438541	5	<i>O. aureus</i> Israel FJ348063
	TSM007-14 <i>O. urolepis</i> Israel		<i>O. niloticus</i> Nigeria HM882898
2	Haplotipo 2	6	<i>C. rendalli</i> Brasil JN989250
	<i>O. mossambicus</i> Australia KF228005		<i>C. rendalli</i> Congo KT193036
	<i>O. mossambicus</i> JQ431946		Haplotipo 5
3	FISH065-08 <i>O. niloticus</i> Sudafrica-Israel	7	AMCC227432 <i>O. lepidurus</i> Congo
	Haplotipo 3	8	DCF755-15 <i>O. leucostictus</i>
	<i>O. aureus</i> x <i>O. niloticus</i> China DQ426666	9	DSFRE019-08 <i>C. umbrifera</i>
	<i>O. mossambicus</i> JX173758	10	FFMBH1408-14 <i>C. zillii</i>
	<i>O. niloticus</i> Tailandia JQ742041	11	FISH044-08 <i>O. mossambicus</i> Sudáfrica-Israel
4	<i>O. niloticus</i> Filipinas HQ654743	12	GBGC7450-09 <i>A. pulcher</i>
	FFMBH1432 <i>O. aureus</i> Marruecos	13	Haplotipo 6
	<i>O. niloticus</i> México EU751883	14	Haplotipo 7
	<i>O. niloticus</i> Brasil GU702174	15	<i>O. niloticus</i> Egipto KJ443695
	<i>O. niloticus</i> Brasil GU702137	16	<i>O. niloticus</i> India JX260932
		17	<i>O. niloticus</i> Indonesia HM345942

Una UTO puede agrupar diferentes secuencias como en el caso de las UTOs 1 a 6 o una sola secuencia como en el caso de las UTOs 7 a 16.

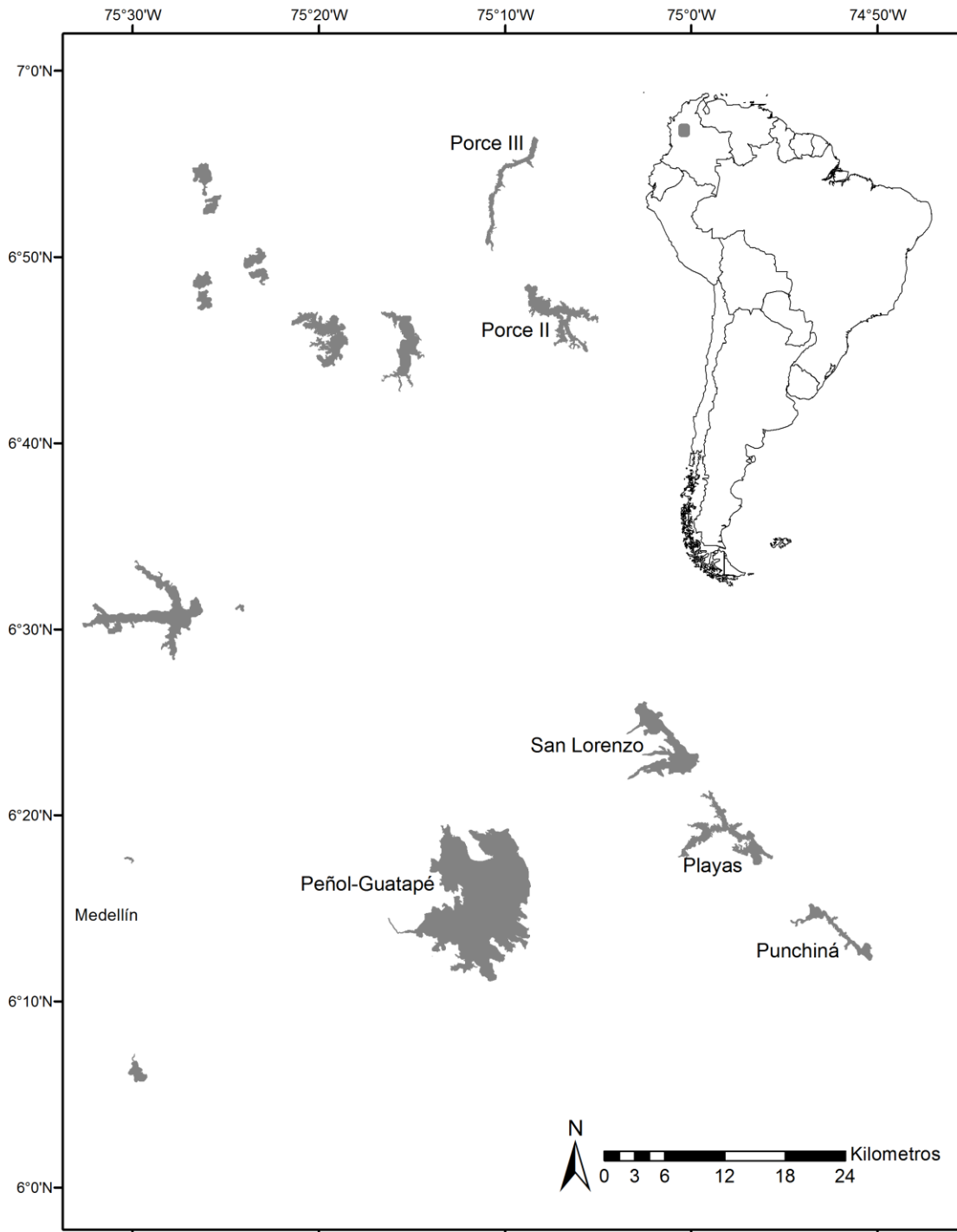


Figura 1. Ubicación de los embalses donde se tomaron las muestras para el presente estudio

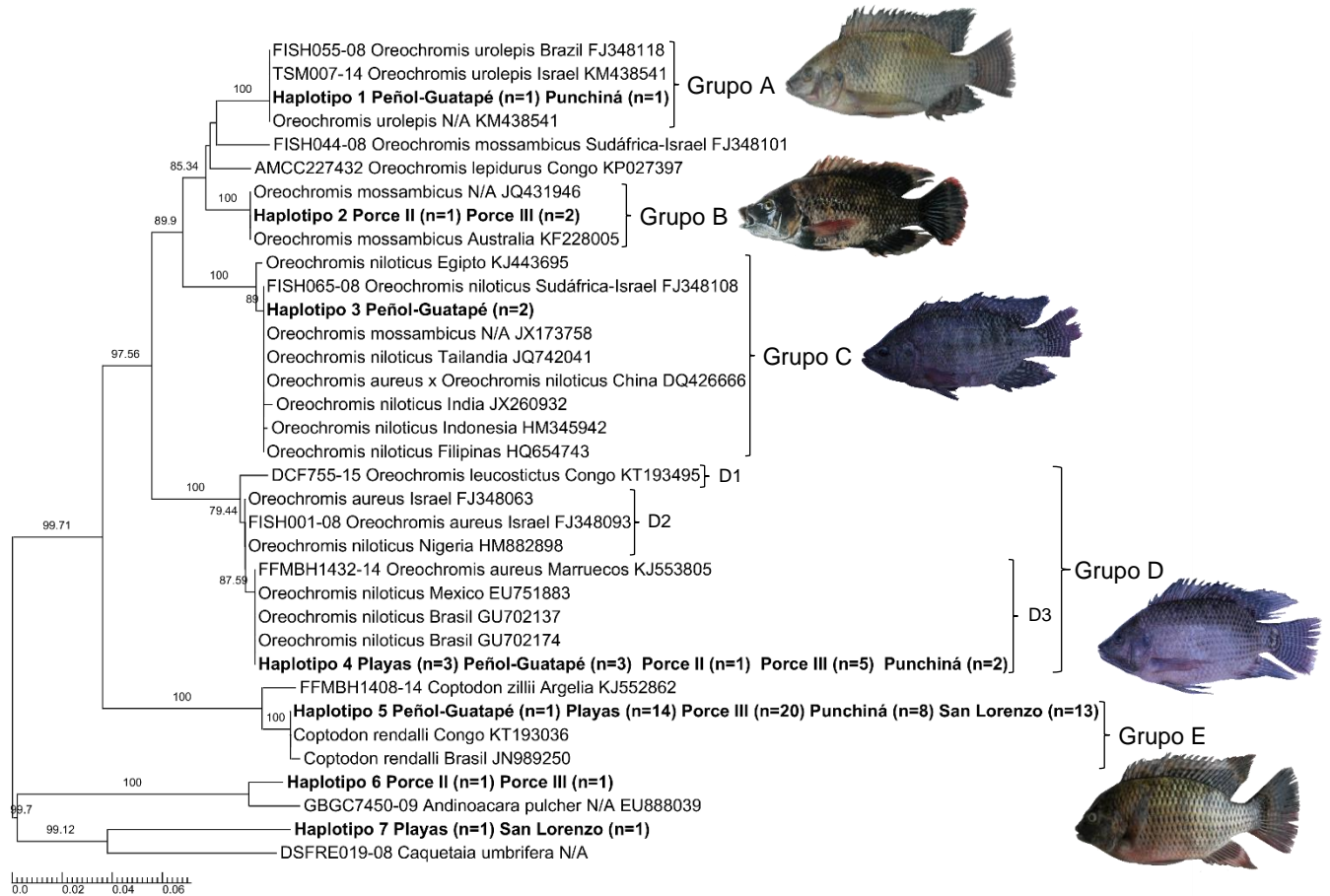


Figura 2. Árbol Neighbor-Joining a partir del método de dos parámetros de Kimura que incorporó 81 secuencias originales y 28 secuencias de referencia de un fragmento del gen mitocondrial, Citocromo C oxidasa subunidad I. El código antes de nombre científico corresponde al registro en BOLD. El código después del nombre científico es el identificador de acceso a GenBank. N/A significa que no fue posible obtener el país de origen de la secuencia. Las fotografías, muestran peces capturados en el presente estudio correspondientes a cada uno de los grupos delimitados. Sólo se muestran soportes de Bootstrap mayores de 50.

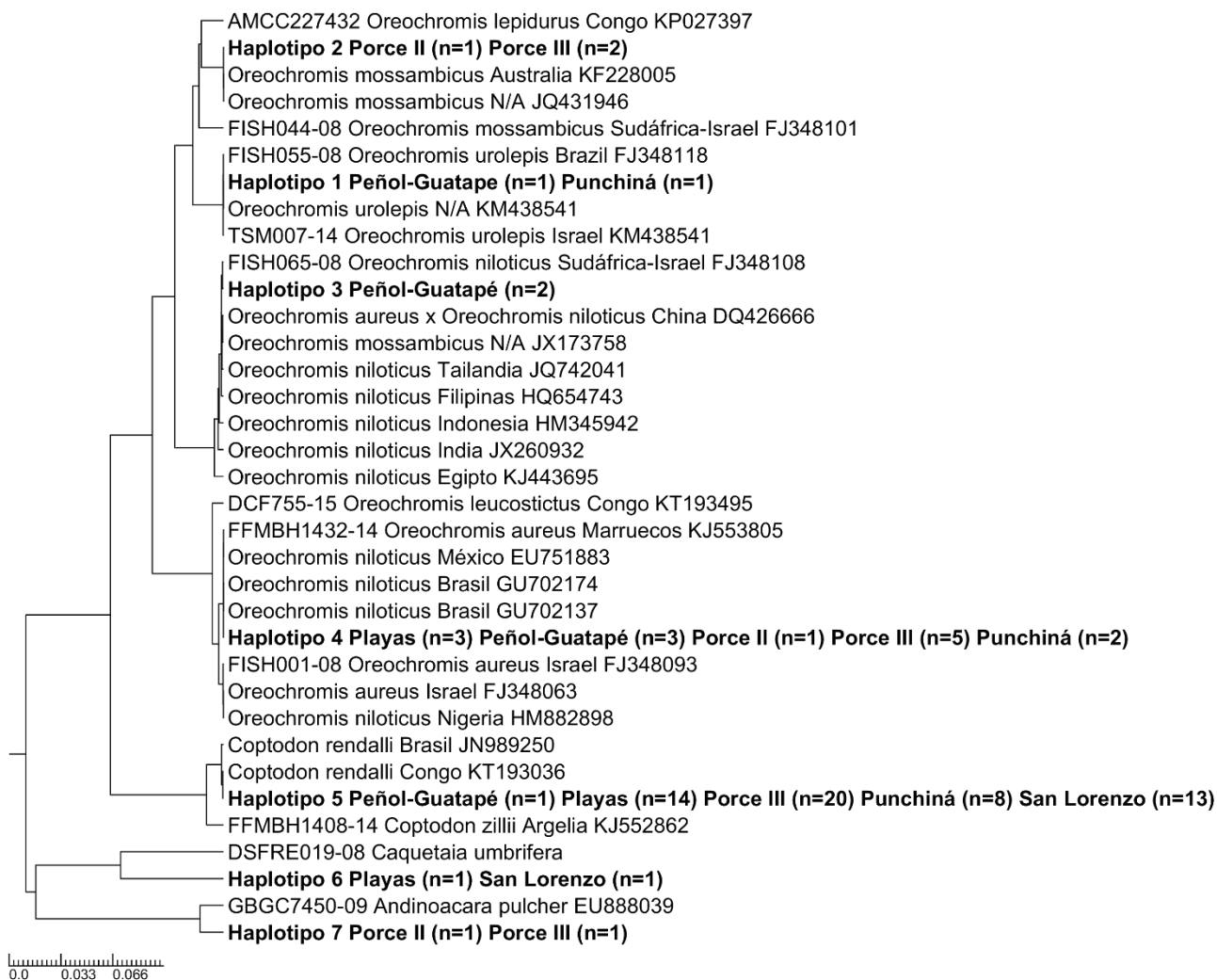


Figura 3. Árbol ultramétrico que incorporó 81 secuencias originales y 28 secuencias de referencia de un fragmento del gen mitocondrial, Citocromo C oxidasa subunidad I. El código antes de nombre científico corresponde al registro en BOLD. El código después del nombre científico es el identificador de acceso a GenBank. N/A significa que no fue posible obtener el país de origen de la secuencia

Capítulo 3

Body shape variation between farms of tilapia (*Oreochromis* sp.) in colombian Andes using landmark-based geometric morphometrics

Objetivo específico:

Caracterizar y comparar la forma del cuerpo de las tilapias cultivadas en diferentes granjas del departamento de Antioquia mediante morfometría geométrica

Aceptado para publicación en Latin American Journal of Aquatic Research

<http://www.lajar.cl/>

**Body shape variation between farms of tilapia (*Oreochromis* sp.) in
colombian Andes using landmark-based geometric morphometrics**

Geometric morphometrics tilapia

**Andrés Montoya-López¹, Cintia Moreno-Arias², Ariel Tarazona-Morales³,
Martha Olivera-Angel¹ & James Betancur⁴.**

¹Grupo Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.
Medellín, Colombia.

²Laboratorio de Ictiología, Unidad de Ecología y Sistemática (UNESIS),
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.
Bogotá, Colombia.

³Grupo Biogénesis, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias
Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

⁴Asociación Colombiana de Acuicultores ASOACUICOLA, Medellín, Colombia
Corresponding author: Andrés Montoya-López (andres.montoyal@udea.edu.co)

ABSTRACT. Tilapia is the most economically important fish in the aquaculture of different countries from the Americas. This species exhibits morphological plasticity under different conditions. In this study, we used landmark-based geometric morphometric to describe the shape variation of two red and one Nile tilapia farmed populations in Colombian Andes. We recorded significant morphological differences between all studied farms ($p < 0.001$ in the multivariate analysis of variance). In this way, individuals from the Nile farm were more elongated and had a more ventral position of the posterior extreme of the orbit and the insertion of pectoral fin than red tilapias. Moreover, the Nile group showed a shorter space between the mouth profile and the posterior extreme of the orbit, compared to red groups. On the other hand, individuals from farm red 2 were deep bodied and had a smaller head compared to tilapias from farm red 1. Our results provide evidence that tilapias from different farms in Colombian Andes display differences in body shape. This can be applied to selective breeding programs after establishing the

contribution of genetic and environmental effects on tilapia shape as well as the preferences of consumers for the body shape of Tilapia.

Keywords: anatomic landmarks, aquaculture, morphology, tilapia, variation

Tilapia is one of the most important fish in aquaculture worldwide (FAO, 2016). Likewise, this species is the most economically important fish in the freshwater production of different countries from the Americas (CONAPESCA, 2013; ACEB, 2014; FAO, 2014). In Colombia, Tilapia accounted for 62.5% of national fish farming production. Furthermore, Colombia is the second largest exporter of fresh tilapia fillet to the United States. In 2015, US imported 5.329 tons of this product from Colombia, valued at US\$ 44.119.211 (NMFS, 2016).

Variation in the shape of the body has been extensively studied in fish and particularly in Cichlids (Clabaut *et al.*, 2007; Kassam *et al.*, 2007; Kerschbaumer & Sturmbauer, 2011). An essential element of these studies is their focus on natural populations in the context of evolutionary biology. By contrast in aquaculture, the differences in morphology between farmed populations are of great concern for selective breeding because the shape is a commercially important trait that contributes to the market value of the product (Colihueque & Araneda, 2014; de Oliveira *et al.*, 2016).

One way to describe quantitatively the shape is by geometric morphometrics (GM) instead of traditional methods based on linear measurements between reference points. Landmark-based GM involves summarizing shape in terms of a constellation of discrete anatomical loci, each described by Cartesian coordinates (Webster & Sheets, 2010). Key advantages of GM include: a. emphasis on the complete retention of geometric information throughout the research process, b. much higher statistical power to detect shape differences with sufficient sample sizes, c. localization of the spatial morphological variation and d. visualization of

the shape differences directly as illustrations (Zelditch *et al.*, 2004; Slice, 2007; Klingenberg, 2013).

The morphological plasticity of Tilapia (*Oreochromis* spp.) has been characterized previously by GM. For example, Lorenz *et al.* (2014) determined that after an eradication attempt with rotenone, tilapia were deeper in body and head shape than pre-management individuals. Similarly, Ndiwa *et al.* (2016) found variations in the head, caudal peduncle and anal fin base of Nile tilapia from extreme environmental conditions compared to populations experiencing less extreme conditions. These authors also registered morphological differences between populations with similar genetic background. In addition, Firmat *et al.* (2012) described that invasive populations of Mozambique tilapia exhibited a more elongated body shape, a shorter caudal peduncle and a more expanded anterior region relative to native populations. With respect to shape changes during growth, Fujimura & Okada (2008) assessed the developmental trajectory that leads to the adult lower jaw shape in Nile tilapia and concluded that differences in adult shapes may be due to differences arising early in development.

Differences in shape between lines, farms or rearing conditions have been found previously using GM on aquaculture species such as: European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), seabream (*Sparus aurata*), brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Costa *et al.*, 2010; Vehanen & Huusko, 2011; Pulcini *et al.*, 2013; Fragkoulis *et al.*, 2016). Therefore, we hypothesized that a phenotypic variable species as Tilapia (*Oreochromis* spp.) would show differences in shape between separate rearing sites.

In this study, morphological variation between 265 fishes from one Nile (*Oreochromis niloticus* n = 87) and two red farms (mainly *Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis aureus*, red 1 n= 89, red 2 n = 89) was analyzed using landmark-based GM (Fig. 1). All three farms are land-based aquaculture

systems. Red 1 is geographically separated from red 2 by 5.45 km, red 1 from Nile by 120.65 km and finally, red 2 from Nile by 116.5 km. The Nile farm is a raceway system of export-oriented production of fillets. This intensive farm uses high water flow rate and high stocking densities. Red farms are semi intensive productions oriented to national market. In the three farms the water demand is calculated from an oxygen mass balance and no supplemental oxygen is used. The farms were chosen according to the following criteria: a. their relative high contribution to Tilapia production in Antioquia region (Colombia), b. they had their own breeders and hatcheries and c. they had their own processing facilities. Although the broodstocks have been kept in these farms for more than five generations, specific sources and pedigree information was not registered by the farmers. In the three farms, fry sex reversal was accomplished by oral administration of 17 α -methyltestosterone.

General methods followed those of Kavembe *et al.* (2016) and the handling procedures followed the section seven of the Aquatic Animal Health Code about the welfare of farmed fish (OIE, 2016). Images of the left side of fish with a scale included were taken after harvesting and before stunning at each one of the processing facilities, using an 18-megapixel EOS 7D digital camera with a 50 mm 1:2.5 lens (Canon USA, Inc.) mounted on a tripod stand. The coordinates of 11 landmarks (Fig. 2) were digitalized in the same order on each image after setting the scale factor using TPSDIG2 v2.30 (Rohlf, 2015). For shape analysis, the data set containing the x–y coordinates was then imported into MORPHOJ v1.06d (Klingenberg, 2011). In order to translate, rotate and uniformly scale the specimens relative to each other so as to minimize a total sum of squares, a full Procrustes fit and a projection of the data to the tangent space (Dryden & Mardia, 1998) was conducted. Next, an inspection for outliers of the new dataset was performed.

To examine the statistical association between size and shape, a regression analysis with Procrustes coordinates as the dependent variable and log-

transformed centroid size as the independent variable with a permutation test against the null hypothesis of independence including 10.000 randomization rounds (Klingenberg, 2016) was carried out. A Canonical variate analysis (CVA) of the covariance matrix of the shape coordinates (Mitteroecker & Bookstein, 2011) was used to assess body shape differences between farmed populations of tilapia.

Shape changes were visualized using a wireframe graph as well as a transformation grid superimposed with their respective warped outline drawing for each canonical variate. To test the significance of the shape differences between farmed populations, a multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed using PAST v3.15 (Hammer *et al.*, 2001). To assess the accuracy of the morphometric classification, a random permutation of individuals testing the significance of each pair-wise Mahalanobis distance among groups with cross-validation was performed using the module PAD of the CLIC package (Dujardin, 2008).

The regression analysis with the group centered scores of Procrustes coordinates as the dependent variable and log-transformed centroid size as an independent variable (Fig. 3) showed: a. superimposition of the values of the majority of the three groups of tilapia examined, b. high range of values of the regression score for a small range of log-transformed centroid sizes for each group of tilapia, c. only 2.28% of shape variation in the tilapias studied covaried with size (P -value < 0.0001 at 10.000 permutations) and d. in the present study, a small range of sizes were examined (no fingerlings or juveniles were measured and the range of values of centroid size in Fig. 3 was small), therefore only a short section of growth trajectory were covered by our data. Consequently, no further size correction was applied.

The canonical variate analysis displayed a distinct separation between the three tilapia farms. In this analysis, the first and second axes accounted for 70.68% and

29.32% of the total shape variation respectively (Fig. 4). Also, the CVA indicated significant differences among farms of tilapia (P -value < 0.0001 in all cases). The Nile group in this defined morphospace was entirely separated by the first CV from the red groups, while red 1 and red 2 were mainly separated along the second CV.

As illustrated by the wireframe graphs and transformation grids, individuals from the Nile farm were more elongated and had a more ventral position of the posterior extreme of the orbit and the insertion of pectoral fin than red tilapias. Moreover, the Nile group showed a shorter space between the mouth profile (defined by the landmarks one and two) and the posterior extreme of the orbit, compared to red groups. On the other hand, individuals from farm red 2 were deep bodied and had a smaller head compared to tilapias from farm red 1.

Finally, the MANOVA detected significant differences in shape variables among farms of tilapia (Wilk's lambda: 0,03775, F : 56,45, $P < 0.001$) and the cross-validated classification, correctly reassigned 91%, 97% and 100% of the individuals from the farms red 1, red 2 and Nile respectively.

We found that individuals from different farms of tilapia from Antioquia showed significant differences in body shape. Prior research has identified that both environmental and genetic factors influence the body shape of fishes. For example, Crichigno *et al.* (2012) achieved plastic induction of body shape of *Odontesthes hatchery* by manipulation of incubation temperature and diet. In the same fashion Staszny *et al.* (2013) reared under identical environmental conditions or under different diets two inbred lines of *Danio rerio*. These authors found that genetic and environmental factors markedly determined the shape of scales. Divanach & Koumoundouros (2014) concluded that developmental temperature significantly affected the position of the bases of some head bones and fins of *Sparus aurata* juveniles.

Environmental factors such as water velocity, depth, rearing density, diet, farming method (*i.e.* pond or cage) and temperature as well as genetics would affect the shape of fishes under culture conditions (Pakkasmaa & Piironen, 2001; Kause *et al.*, 2003; Ramler *et al.*, 2014). In this way, individuals from the same gene pool but reared in different conditions show differences in body shape (Costa *et al.*, 2010; Vehanen & Huusko, 2011; Fragkoulis *et al.*, 2016). Recently, Montoya-Lopez (unpublished data) characterized the genetic diversity and population structure of the broodstocks from the three farms analyzed in this study using short tandem repeats. This author found that broodstocks from both red farms belonged to a single genetic cluster. In contrast, the Nile broodstocks formed a separated cluster. However, an important difference between the two red farms was the presence and number of private alleles, particularly in the farm red 2. The tables 1 and 2 show the water quality of the three tilapia farms evaluated. Dissolved oxygen, oxygen saturation, pH, phosphate, ammoniacal nitrogen and total solids, show no significant difference between farms. Conversely, temperature was significantly lower in the Nile farm than in red 1, alkalinity and nitrate was significantly lower in Nile than in red 2 and dissolved solids were significantly higher in red 1 and red 2 than in Nile. However, the contribution of both genetic and environmental effects on tilapia shape remains to be experimentally determined.

We found that Nile individuals were more elongated and had a more ventral position of the posterior extreme of the orbit while individuals from the two red farms were separated by differences in body depth and head shape. These findings are similar to previous studies in *Tilapia* by GM, which identified changes in body depth and head shape as the main variable characteristics (Firmat *et al.*, 2012; Lorenz *et al.*, 2014). In like manner, Clabaut *et al.* (2007) compared specimens from 45 species of Lake Tanganyika cichlids and concluded that the most important differences in body shape between species were related to body length as well as the proportion of sizes of head and caudal peduncle.

Our results provide clear evidence that tilapias from different farms in Colombia display differences in body shape. This can be applied to selective breeding programs after establishing the preferences of consumers for the body shape of tilapia because consumer perceptions and public attitudes toward specific characteristics of shape in this species remain unclear in Colombia. Therefore, future work should include experiments such as progeny tests to clarify the influence of genetics, environment and their interaction in body shape of this species.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by “Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia” agreement 4600000970 SADRA-ASOACUICOLA from “Fondo de Ciencia Tecnología e Innovación - Sistema General de Regalías”. We want to thank to “Doctorado en Ciencias Animales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia” and “Programa Nacional de Formación de Investigadores - crédito educativo condonable de Colciencias convocatoria 567 de estudios de doctorado en Colombia”

REFERENCES

- Associação Cultural e Educacional Brasil (ACEB). 2014. 1º Anuário brasileiro da pesca e aquicultura. ITAIPU Binacional, Ministério da Pesca e Aquicultura, Florianópolis, 133 pp.
- Betancur, J.J., L. Correa-Agudelo & A.F. Montoya-López. 2016. Programa de monitoreo sanitario - ambiental y diagnóstico molecular de infecciones bacterianas como herramienta estratégica para la certificación sanitaria de centros de producción de trucha arcoíris y tilapia. Informe Final Convenio 4600000970. Asociación Colombiana de Acuicultores - ASOACUICOLA, Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia, Fondo de Ciencia Tecnología e Innovación, Sistema General de Regalías, Medellín, 59 pp.

- Blonk, R.J., J. Komen, A. Tenghe, A. Kamstra & J.A. van Arendonk. 2010. Heritability of shape in common sole , *Solea solea* , estimated from image analysis data. *Aquaculture*, 307: 6-11.
- Clabaut, C., P.M. Bunje, W. Salzburger & A. Meyer. 2007. Geometric morphometric analyses provide evidence for the adaptive character of the Tanganyikan cichlid fish radiations. *Evolution*, 61: 560-578.
- Colihueque, N. & C. Araneda. 2014. Appearance traits in fish farming: Progress from classical genetics to genomics, providing insight into current and potential genetic improvement. *Front. Genet.*, 5: 1-8.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). 2013. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013. CONAPESCA, Mazatlán, 296 pp.
- Costa, C., M. Vandeputte, F. Antonucci, C. Boglione, P. Menesatti, S. Cenadelli, K. Parati, H. Chavanne & B. Chatain. 2010. Genetic and environmental influences on shape variation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol. J. Linn. Soc. Lond.*, 101: 427-436.
- Crichigno, S.A., M.A. Battini & V.E. Cussac. 2012. Early morphological variation and induction of phenotypic plasticity in Patagonian pejerrey. *Neotrop. Ichthyol.*, 10: 341-348.
- de Oliveira, C.A., R.P. Ribeiro, G.M. Yoshida, N.M. Kunita, G.S. Rizzato, S.N. de Oliveira, A.L. Dos Santos & N.H. Nguyen. 2016. Correlated changes in body shape after five generations of selection to improve growth rate in a breeding program for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in Brazil. *J. Appl. Genet.*, 57: 487-493.
- Divanach, P. & G. Koumoundouros. 2014. Thermally-induced phenotypic plasticity in gilthead seabream *Sparus aurata* L. (Perciformes, Sparidae). *Aquaculture*, 432: 383-388.
- Dryden, I.L. & K.V. Mardia. 1998. *Statistical Shape Analysis*. Wiley, Chichester, 376 pp.
- Dujardin, J. 2008. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect. Genet. Evol.*, 8: 875-890.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. Contribución de la pesca y la acuicultura a la seguridad alimentaria y el ingreso familiar en Centroamérica. FAO, Panamá, 91 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016, Contributing to food security and nutrition for all. FAO, Rome, 200 pp.
- Firmat, C., U.K. Schliewen, M. Losseau & P. Alibert. 2012. Body shape differentiation at global and local geographic scales in the invasive cichlid *Oreochromis mossambicus*. Biol. J. Linn. Soc., 105: 369-381.
- Fragkoulis, S., M. Christou, R. Karo, C. Ritas, C. Tzokas, C. Batargias & G. Koumoundouros. 2016. Scaling of body-shape quality in reared gilthead seabream *Sparus aurata* L. Consumer preference assessment, wild standard, and variability in reared phenotype. Aquacult. Res., 48: 2402-2410.
- Fujimura, K. & N. Okada. 2008. Shaping of the lower jaw bone during growth of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a Lake Victoria cichlid *Haplochromis chilotes*: A geometric morphometric approach. Dev. Growth Differ., 50: 653-663.
- Hammer, D., T. Harper & P. Ryan. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4: 1-9.
- Kassam, D., K. Yamaoka, B. Rusuwa, & M. Hori. 2007. The robustness of geometric morphometrics in testing the morphological equivalence hypothesis among cichlid species from East African Great Lakes. Biol. J. Linn. Soc. Lond., 91: 1-9.
- Kause, A., O. Ritola, T. Paananen, U. Eskelinen & E. Mantysaari. 2003. Big and beautiful? Quantitative genetic parameters for the appearance of large rainbow trout. J. Fish Biol., 62: 610-622.
- Kavembe, G.D., A.F. Kautt, G. Machado-Schiaffino & A. Meyer. 2016. Eco-morphological differentiation in Lake Magadi tilapia, an extremophile cichlid fish living in hot, alkaline and hypersaline lakes in East Africa. Mol. Ecol., 25:

1610-1625.

- Kerschbaumer, M. & C. Sturmbauer. 2011. The utility of geometric morphometrics to elucidate pathways of cichlid fish evolution. *Int. J. Evol. Biol.*, 2011: 290-245.
- Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.*, 11: 353-357.
- Klingenberg, C.P. 2013. Visualizations in geometric morphometrics: How to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix*, 24: 15-24.
- Klingenberg, C.P. 2016. Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Dev. Genes Evol.*, 226: 113-137.
- Lorenz, O., P. Smith & L. Coghill. 2014. Condition and morphometric changes in tilapia (*Oreochromis* sp.) after an eradication attempt in Southern Louisiana. *NeoBiota*, 20: 49-59.
- Mitteroecker, P. & F. Bookstein. 2011. Linear Discrimination, Ordination, and the Visualization of Selection Gradients in Modern Morphometrics. *Evol. Biol.*, 38: 100-114.
- Ndiwa, T.C., D.W. Nyingi, J. Claude & J.F. Agnese. 2016. Morphological variations of wild populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) living in extreme environmental conditions in the Kenyan Rift-Valley. *Environ. Biol. Fish.*, 99: 473-485.
- Pakkasmaa, S. & J. Piironen. 2001. Water velocity shapes juvenile salmonids. *Evol. Ecol.*, 14: 721-730.
- Pulcini, D., P.A. Wheeler, S. Cataudella, T. Russo & G.H. Thorgaard. 2013. Domestication shapes morphology in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Biol.*, 82: 390-407.
- Ramler, D., P. Mitteroecker, L.N. Shama, K.M. Wegner & H. Ahnelt. 2014. Nonlinear effects of temperature on body form and developmental canalization in the threespine stickleback. *J. Evol. Biol.*, 27: 497-507.
- Rohlf, F.J. 2015. The tps series of software. *Hystrix*, 26: 1-4.
- Slice, D.E. 2007. Geometric Morphometrics. *Annu. Rev. Anthropol.*, 36: 261-281.

- Staszny, A., E. Havas, R. Kovács, B. Urbányi, G. Paulovits, D. Bencsik & Z. Csenki. 2013. Impact of environmental and genetic factors on the scale shape of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton 1822): a geometric morphometric study. *Acta Biol. Hung.*, 64: 462-475.
- Vehanen, T. & A. Huusko. 2011. Brown trout *Salmo trutta* expresses different morphometrics due to divergence in the rearing environment. *J. Fish Biol.*, 79: 1167-1181.
- Webster, M. & H.D. Sheets. 2010. A practical introduction to landmark-based geometric morphometrics. *Paleontol. Soc. Papers*, 16: 163-188.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2016. Aquatic Animal Health Code. OIE, Paris.
- Zelditch, M.L., D.L. Swiderski, H.D. Sheets & W.L. Fink. 2004. Geometric morphometrics for biologists : A primer. Elsevier Academic Press, New York, 437 pp.

Table 1. Water quality parameters of the three farms evaluated in the present study from Betancur *et al.* (2016). Data is shown as mean \pm standard deviation; different letters indicate significant ($P < 0.05$) differences among the farms.

Farm	Dissolved oxygen (mg/L)		Oxygen saturation (%)		Temperature (°C)	pH
	In	Out	In	Out		
Nile	7.16 \pm 1.0	5.59 \pm 1.49	93.61 \pm 10.17	70.75 \pm 18.50	24.88 \pm 1.35b	7.39 \pm 0.60
Red 1	7.5 \pm 1.78	6.02 \pm 2.12	94.83 \pm 25.59	78.41 \pm 28.79	27.21 \pm 4.46a	7.54 \pm 0.43
Red 2	5.81 \pm 1.42	4.8 \pm 1.95	72.71 \pm 16.77	60.43 \pm 24.16	26.84 \pm 1.12ab	7.71 \pm 0.71

Table 2. Water quality parameters of the three farms evaluated in the present study from Betancur *et al.* (2016). Data is shown as mean \pm standard deviation; different letters indicate significant ($P < 0.05$) differences among the farms.

Farm	Alkalinity (mg/L)	Phosphate (mg/L)	Ammoniacal		Total solids (mg/L)	Dissolved solids (mg/L)
			nitrogen (mg/L)	Nitrate (mg/L)		
Nile	14.88 \pm 9.17a	0.08 \pm 0.04	0.70 \pm 0.84	1.50 \pm 0.58a	91.02 \pm 46.38	55.13 \pm 27.07a
Red 1	54.38 \pm 20.76a	0.10 \pm 0	1.14 \pm 1.92	3.05 \pm 1.32ab	187.63 \pm 59.81	132.88 \pm 35.38b
Red 2	101.63 \pm 9.23b	0.10 \pm 0	1.17 \pm 2.02	4.10 \pm 1.82b	213.63 \pm 13.46	145.01 \pm 22.80b



Figure 1. Representative images for each group of tilapia examined. Top-left, Nile; top-right, red 1; bottom, red 2. Scale bars represent 1 cm.

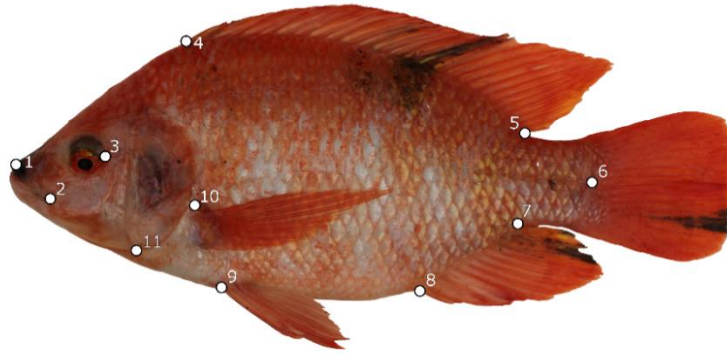


Figure 2. Position of landmarks used in the present study. (1) intersection between upper lip and body outline in the nasal-palatine anterior area. (2) most posterior corner of the maxilla when the mouth is closed. (3) posterior extreme of the orbit. (4) anterior insertion of the first dorsal spine. (5) posterior insertion of the last dorsal ray. (6) last pore of the lateral line. (7) posterior insertion of the last anal ray. (8) anterior insertion of the first anal spine. (9) anterior insertion of the first pelvic spine. (10) upper insertion of pectoral fin. (11) most ventral corner of interoperculum-suboperculum joint

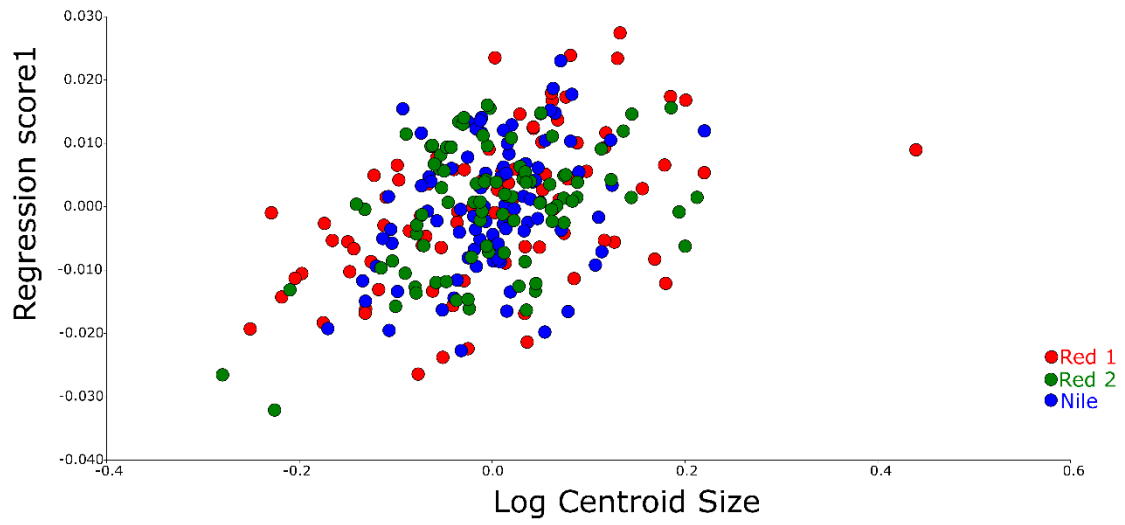


Figure 3. Group centered scores of the regression between Procrustes coordinates and log-transformed centroid size.

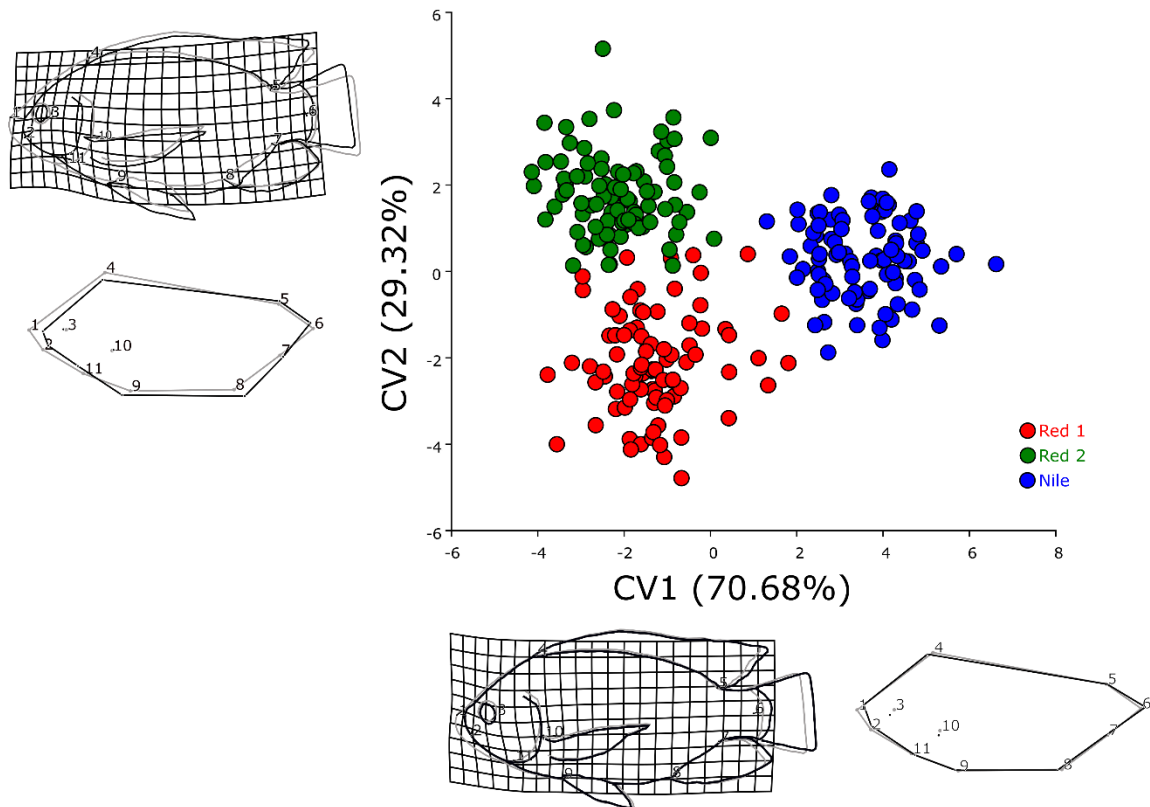


Figure 4. Canonical variate analysis (CVA) of the covariance matrix of the shape coordinates. The axis represent the canonical variates 1 and 2 (CV1 and CV2) with their respective graphs for visualizations of shape changes.

Capítulo 4

Desempeño productivo de cuatro procedencias de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) de Antioquia (Colombia) en condiciones subóptimas constantes de temperatura y temperatura variable en zona de montaña

Objetivo específico:

Comparar el desempeño productivo de diferentes semillas comerciales de tilapia producidas en el departamento de Antioquia bajo condiciones constantes y variables de temperatura

Desempeño productivo de cuatro procedencias de tilapia roja de Antioquia en condiciones de pequeños productores

Andrés Felipe Montoya-López¹, Ariel Marcel Tarazona Morales², Martha Olivera-Angel¹, James Betancur-López³.

¹*Grupo Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.*

²*Grupo Biogénesis, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.*

³*Asociación Colombiana de Acuicultores ASOACUICOLA, Medellín, Colombia.*

andres.montoyal@udea.edu.co

RESUMEN: El objetivo del presente estudio fue comparar el crecimiento, consumo de alimento y sobrevivencia de cuatro procedencias de tilapia roja de Antioquia (Colombia) en dos condiciones: 1. Temperatura subóptima y 2. Granjas de pequeños productores. Primero, se comparó el desempeño productivo de alevinos comerciales a temperatura constante de 22.65°C durante 26 días. Segundo, se realizó seguimiento a los parámetros productivos de cuatro procedencias de tilapia en seis granjas de pequeños productores durante 165 días. Los resultados muestran que bajo condiciones constantes subóptimas o variables de temperatura en campo, algunas procedencias de tilapia roja presentan diferencias en su sobrevivencia y tasa específica de crecimiento. Lo anterior sugiere que el comportamiento productivo de la semilla de tilapia producida en el departamento de Antioquia es heterogéneo entre granjas de pequeños productores por lo cual es necesario evaluar detalladamente que procedencia de tilapia obtiene los mejores resultados en las condiciones particulares de cada productor. |

Palabras clave: acuicultura, pequeño productor, tilapia

Survival and growth performance of four local red tilapia strains from Antioquia in conditions of smallholders farmers

ABSTRACT: The aim of this study was to compare the growth, feed consumption and survival of four local red tilapia strains from Antioquia (Colombia) in two conditions: 1. Constant sub-optimal temperature and 2. Farms of smallholders. First, the productive performance of commercial fingerlings cultivated at $22.65\pm 0.74^{\circ}\text{C}$ for 26 days was evaluated. Second, we monitored the growth, feed consumption and survival of four red tilapia strains for 165 days in six farms of smallholders. Our results showed that under constant sub-optimal temperature or variable temperature conditions in the field, some local strains of red tilapia from Antioquia exhibited differences in the survival and specific growth rate. This suggests that the productive performance of the tilapia seed produced in Antioquia is heterogeneous among farms of smallholders. Therefore, it is necessary to assess in detail which tilapia strain obtains the best results under the particular conditions of each farmer.

Keywords: aquaculture, smallholder, tilapia

Introducción

La tilapia es uno de los peces más cultivados en el mundo. Según estimaciones de la FAO la producción mundial de *Oreochromis niloticus* es superior a 3,5 millones de toneladas anuales (FAO, 2016). En Colombia, la tilapia es la especie más importante en la acuicultura, aportando el 61.25% de las 103.114 toneladas totales producidas en el país (Ministerio de Agricultura, datos no publicados).

Diferentes estudios señalan que el desempeño productivo de *O. niloticus* es dependiente de la temperatura. Esto quiere decir, que el crecimiento y la sobrevivencia se ven afectados negativamente en temperaturas del agua por debajo de 24°C o superiores a 32°C (Baras et al., 2001; Azaza et al., 2008; Abdel-Tawwab & Wafeek, 2014).

Antioquia, ocupa el tercer lugar como departamento productor en la acuicultura de Colombia (CCI & MADR, 2012). Subregiones de este departamento como son el bajo Cauca, Magdalena medio y Urabá, tienen condiciones geográficamente aptas para el cultivo de tilapia por sus suelos con pendientes menores a 3%, altura sobre el nivel del mar menor a 1.000 metros (URPA, 2011) y temperatura del agua superior a 25°C. Sin embargo, existe un número importante de pequeños productores localizados en zonas de montaña donde la temperatura ambiental es cálida pero la temperatura del agua puede ser subóptima (menor a 22°C) y presentar grandes variaciones. Adicionalmente, los productores de Antioquia enfrentan el reto de utilizar semilla de tilapia sin información sobre su comportamiento productivo en sus condiciones particulares.

Distintas líneas de *O. niloticus* responden de manera diferente a bajas temperaturas. Por ejemplo, la línea GIFT fue menos tolerante a baja temperatura comparada con las líneas Sudan 78 y Egipto 88 (Sifa et al., 2002). Adicionalmente se han registrado diferencias en la tolerancia a baja temperatura entre familias de *O. niloticus* derivadas de línea egipcia, sugiriendo la existencia de variación genética para esta característica (Charo-Karisa et al., 2005).

El objetivo del presente estudio fue comparar el crecimiento, consumo de alimento y sobrevivencia de cuatro orígenes de tilapia roja en condiciones constantes subóptimas de temperatura y bajo condiciones de campo en zona de montaña de pequeños productores.

Materiales y Métodos

La presente investigación fue dividida en dos experimentos: 1. Condiciones controladas y 2. Condiciones de campo. Durante todo el estudio, el manejo de los individuos siguió el capítulo de bienestar de peces de cultivo del Código Sanitario para Animales Acuáticos (OIE, 2016).

Experimento 1 condiciones controladas a temperaturas sub óptimas.

El experimento consistió en comparar la sobrevivencia, consumo de alimento y crecimiento de tilapias rojas reversadas sexualmente procedentes de tres granjas

productoras de alevinos del departamento de Antioquia (identificadas como Til1, Til2 y Til3) en condiciones subóptimas constante de temperatura (22.65 ± 0.74 °C) durante 26 días. Esta evaluación, se llevó a cabo en acuarios de 400 litros de capacidad total. Cada acuario contaba con un filtro biológico independiente, acoplado a una bomba Resun SP5200 con capacidad de recircular 2800 litros/hora. En cada acuario, se instaló un sensor sumergible de temperatura Hobo Pro V2, programado para realizar registros cada 30 minutos. Se realizaron recambios diarios del 10% del volumen total de los acuarios con agua no tratada con temperatura media de 22.50 °C. La iluminación de los acuarios se realizó mediante lamparas Resun T5 de 22 vatios, programadas mediante un controlador para iluminar durante 12 horas al día entre las 6:00 y las 18:00 horas.

Se introdujeron 100 individuos de una misma procedencia en un solo acuario con tres replicas por procedencia. Se midieron el peso húmedo inicial y final individual, así como la sobrevivencia al final del periodo experimental. Se suministró un alimento comercial de 45% de proteína bruta, siguiendo las instrucciones del fabricante para el peso de los individuos y la temperatura experimental. Lo anterior, se calculó como el 13% de la biomasa con una reducción del 30% por la temperatura. Sin embargo, debido al bajo consumo observado, se redujo el alimento ofrecido hasta en 50% de la recomendación del fabricante.

Diariamente, se registraron el consumo de alimento y las mortalidades. Cada tres días, se midieron en cada uno de los acuarios el amoníaco total (NH_3 y NH_4^+) y amoníaco libre (NH_3) mediante pruebas Seachem Multitest Ammonia. Dos veces durante el experimento se realizaron mediciones nictemerales del oxígeno disuelto y pH mediante un medidor multiparamétrico Hanna HI98194.

Experimento 2 condiciones de campo de pequeños productores

En este experimento, se realizó seguimiento a los parámetros productivos de cuatro procedencias de tilapia roja reversada sexualmente producidas en Antioquia (identificadas como Til1, Til2, Til3 y Til4) en seis granjas de pequeños productores de los municipios de Cocorná (n=3, designadas como A, B y C) y San Carlos (n=3, granjas D, E, F). Los municipios fueron seleccionados al ser representativos del tipo

de acuicultura de aguas cálidas que se realiza en zonas montañosas en el oriente de Antioquia (Colombia). La caracterización, se llevó a cabo en dos fases. La primera fase, tuvo una duración de 73 días y en cada granja se sembró una sola procedencia de Tilapia a una densidad de entre 15 y 90 alevinos/m² conforme a los manejos previos de cada granja. Por lo tanto en esta fase, se sembraron entre 4,000 y 4,750 individuos por procedencia en cada granja. La segunda fase tuvo una duración promedio de 92 días y en cada granja se redistribuyeron los individuos de las tres procedencias diferentes de tilapia, con una densidad de entre 3 a 7 individuos/m² según el manejo propio de cada pequeño productor. En la segunda fase, se sembraron entre 271 y 1050 individuos por procedencia en cada granja. Se suministró alimento comercial de 45%, 38% o 32% de proteína bruta, siguiendo las instrucciones del fabricante para el tamaño de la ración expresada como porcentaje de biomasa por día según el peso de los individuos y la temperatura de cultivo. Cada 30 días, se realizaron pesajes del 5% de la población de los estanques para ajustar el tipo y cantidad de alimento ofrecido. Durante todo el periodo experimental, se realizaron tres mediciones nictemerales del pH, potencial de óxido reducción, conductividad eléctrica, sólidos y oxígeno disuelto mediante un medidor multiparamétrico Hanna HI98194. La temperatura del agua se midió mediante sensores sumergible de temperatura Hobo Pro V2, programados para realizar mediciones cada hora. Diariamente, se registraron el consumo de alimento y mortalidad. La sobrevivencia se midió al final de cada una de las dos etapas. La procedencia Til3 no se sembró en el municipio de San Carlos por falta de oferta de este proveedor de semilla, por lo cual se utilizó otra procedencia adicional denominada como Til4 (ver figura 1).

Análisis estadístico

La tasa específica de crecimiento, se calculó como:

$$\text{Tasa específica de crecimiento } TEC = \frac{\ln(Pf) - \ln(Pi)}{T} \times 100$$

Donde:

Ln(Pf) = Logaritmo natural peso medio final húmedo en gramos

Ln(Pi) = Logaritmo natural peso medio inicial húmedo en gramos

T = duración del experimento en días

Mientras que la tasa de conversión alimenticia se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Tasa de conversión alimenticia } TCA = \frac{AI}{Bi}$$

Donde:

AI = Alimento consumido en durante el experimento en gramos de peso seco

Bi = Incremento de la biomasa en el experimento en gramos de peso húmedo

Para evaluar las diferencias entre las medias de la tasa específica de crecimiento, el costo del alimento por kg de biomasa ganada y el factor de conversión alimenticia por procedencia y por procedencia por municipio, se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA) con pruebas de Tukey, teniendo en cuenta los supuestos de este método como son: independencia de los residuos mediante análisis gráfico, distribución normal de los residuales mediante prueba de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianza mediante prueba de Bartlett. Lo anterior, se realizó en el programa R versión 3.3.1. Para analizar las diferencias entre la sobrevivencia por procedencia se llevó a cabo un Análisis Gráfico de Medias (ANOM) mediante el programa Statgraphics Centurion XVII versión 17.1.12.

Resultados y Discusión

Experimento 1.

La tasa de conversión alimenticia no presentó diferencias significativas entre las procedencias ($p = 0.0699$). Sin embargo, TIL3 obtuvo una menor tasa de conversión alimenticia (3.72) comparada con Til1 y Til2 (11.76 y 6.99 respectivamente). Adicionalmente, la tasa específica de crecimiento de TIL3 fue superior ($p = 0.00928$). Por otro lado, Til2 obtuvo una sobrevivencia mayor (23.67%, límites de decisión del 99% = 0.02-0.22, límite central 0.12, p Chi-cuadrado = 0.0000) comparada con Til1 y Til3 que obtuvieron 7% y 4.67% respectivamente (ver tabla 1).

En el presente estudio, se utilizaron alevinos de tilapia que un piscicultor pequeño puede encontrar comercialmente en el departamento de Antioquia. El peso de entrega inicial de los alevinos registró una variación máxima de 7.7 veces entre los diferentes orígenes (0.18 a 1.4 gramos). Para un piscicultor, es importante la

consistencia en el tamaño inicial de los alevinos ya que esta variable afecta el tiempo total de engorde y puede resultar en diferencias en la sobrevivencia en la primera fase del ciclo productivo en condiciones de montaña, ya que los individuos más pequeños pueden ser menos tolerantes a las bajas temperaturas (Atwood, Tomasso, Webb, & Gatlin, 2003; Charo-Karisa, Rezk, Bovenhuis, & Komen, 2004). Los resultados del experimento 1, muestran que Til3 tuvo un peso inicial promedio menor a las otras dos procedencias evaluadas. Sin embargo, al final de este experimento, la sobrevivencia de Til3 no tuvo diferencia ($p > 0.05$) con Til1 que tuvo un peso inicial promedio 2.95 veces superior. Adicionalmente, la TCA de Til3 fue menor y la TEC mayor comparada con Til1 y Til2.

Los altos valores obtenidos en la tasa de conversión alimenticia, así como los bajos valores registrados para la tasa específica de crecimiento en este experimento son similares a lo encontrado por Abdel-Tawwab & Wafeek (2014) quienes registran para *O. niloticus* un menor crecimiento y utilización del alimento en temperaturas inferiores a 22°C. Sin embargo, la sobrevivencia (7.00 – 23.67%) fue menor a lo encontrado por (Azaza et al., 2008). Estos autores, reportan sobrevivencias entre 62 y 74% en *O. niloticus* con peso inicial promedio de 0.254 gramos durante 28 días de cultivo a una temperatura promedio entre 19.15 y 19.54°C.

Experimento 2.

La temperatura y el oxígeno disuelto presentaron variaciones durante el ciclo de día y noche (ver tabla 2 y figuras 2 y 3). La mediana de la temperatura del agua, agrupando las granjas de los municipios de Cocorná y San Carlos fue de 25.81 °C y 25.79°C respectivamente. En algunos días, se registraron variaciones superiores a 10 °C entre la temperatura diurna y nocturna en ambos municipios. La menor y mayor temperatura (20.1 y 37.76 °C respectivamente) se midieron en el municipio de San Carlos. Para las granjas de ambos municipios, el pH se encontró entre 6.57 y 9.98. Los rangos del potencial de óxido reducción, conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales fueron: -339 a 385.7 mV, 26 a 375 μ S/cm, y 0.01 a 0.19‰ respectivamente, con variaciones espaciales y temporales. El porcentaje de saturación y el Oxígeno disuelto se encontraron entre 0 y 128% así como 0 y 9.9 mg/L respectivamente (ver tabla 2).

Durante la primera etapa del experimento 2, la procedencia Til3 registró la menor TCA en Cocorná (1.79), mientras que Til1 obtuvo la menor TCA en San Carlos (1.51). La tasa específica de crecimiento de TIL2 y TIL4 fueron superiores en Cocorná y San Carlos respectivamente (4.61 vs 5.72). La sobrevivencia de Til1 y Til2 fue similar en ambos municipios (70.32 vs 69.34% para Til1 y 36.25 vs 25.87% para Til2 en Cocorná y San Carlos respectivamente) mientras que Til3 y Til4 obtuvieron 65.9 y 53.9% respectivamente. El costo del alimento por Kg de biomasa ganada estuvo entre \$3,919.40 (Til1 en San Carlos) y \$9,772 (Til1 en Cocorná) como se muestra en la tabla 3.

En la segunda etapa del experimento 2, la tasa de conversión alimenticia, la sobrevivencia y el costo por Kg de biomasa ganada, no presentaron diferencias ($p > 0.05$) entre las procedencias por municipio. La TCA se encontró entre 1.22 para TIL1 en la granja C de Cocorná y 3.62 para esta misma procedencia en la granja F de San Carlos. La sobrevivencia estuvo entre 32.4% para TIL2 en la granja B de Cocorná y 86.7% encontrado en esta misma procedencia en la granja F de San Carlos. El costo por Kg de biomasa ganada varió entre \$2,922.03 para TIL1 en la granja C de Cocorná y \$8,615.01 para esta misma procedencia en la granja F de San Carlos (ver tabla 4).

La tasa específica de crecimiento para la segunda etapa del experimento 2, se encontró entre 0.92 para Til2 en la granja F de San Carlos y 2.5 para TIL4 en esta misma granja. La TEC registró diferencias ($p = 0.002$) entre las procedencias por municipio (ver figura 4). La TEC de Til2 en San Carlos fue menor a la Til1 en Cocorná y a la registrada en Til4 en San Carlos.

Los resultados del presente estudio muestran que durante la primera fase del experimento dos la menor y mayor TCA (1.51 y 3.86) se registraron para la misma procedencia (Til1) en dos granjas diferentes: D-San Carlos y A-Cocorná respectivamente. Igualmente, para la segunda fase de este mismo experimento, la TCA se encontró entre 1.22 y 3.62 para la misma procedencia (TIL1) en las granjas: C-Cocorná y F-San Carlos respectivamente. En la primera fase del experimento dos, La TEC varió entre 2.74 para Til1 en la granja A-Cocorná y 5.72 para Til4 en la granja F-San Carlos. En la segunda fase de este experimento, la TEC estuvo entre 0.92 para Til2 y 2.5 para Til4 en la misma granja (F en el municipio de San Carlos).

En este mismo sentido, la sobrevivencia en la segunda fase del experimento 2, se registró entre 32.44% y 86.72% para la misma procedencia (TIL2) en las granjas: B-Cocorná y F-San Carlos respectivamente. Estos resultados de TCA y TEC en la segunda fase del experimento dos, son similares a lo encontrado por El-Sheriff & El-Feky (2009) quienes trabajaron con *O. niloticus* con pesos inicial de 19 ± 1 g y reportan TCA media de 3.3 y 2.6 a temperaturas de 20 y 25°C respectivamente, así como TEC media de 0.97 y 1.23 a temperaturas de 20 y 25°C respectivamente.

Dos posibles explicaciones para las variaciones en la TCA, TEC y sobrevivencias entre granjas pueden ser: 1. Las variaciones en parámetros fisicoquímicos del agua afectan el desempeño entre granjas y 2. La existencia de la interacción entre genotipo y ambiente. Los resultados que soportan la primera hipótesis son: la granja A-Cocorná donde se registraron altos valores de TCA y baja sobrevivencia, presentó los menores valores para pH, potencial de óxido reducción, saturación de oxígeno y oxígeno disuelto, mientras que en la granja F-San Carlos, donde se encontraron altos valores de TCA, TEC y sobrevivencia en dos de los tres orígenes, se registraron los mayores valores de pH, saturación de oxígeno y oxígeno disuelto, así como los menores valores de conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales. Por otro lado, se ha reportado que las interacciones de genotipo por ambiente para el desempeño en crecimiento en *O. niloticus*, pueden ocurrir si los entornos de cultivo son suficientemente divergentes (Bentsen et al., 2012), lo cual sería argumento para la segunda hipótesis.

La sobrevivencia durante ambas fases del experimento dos fue baja y muestra pérdidas importantes para los pequeños productores en condiciones de montaña del departamento de Antioquia. Los menores valores de sobrevivencia, combinando ambas fases del experimento 2 se encontraron en la procedencia Til2 en las granjas B-Cocorná y E-San Carlos, con valores de 11.76% (0.3625×0.3244) y 12.72% (0.2587×0.4916) respectivamente. Al igual que lo reportado para otros pequeños productores agropecuarios (Furtado et al., 2013; Macías, 2013) la mayoría de pequeños productores piscícolas en Antioquia no llevan registros de su producción, por lo que se dificulta el análisis y comparación de su desempeño productivo y económico.

Al final del experimento dos, luego de 165 días en promedio de cultivo los peces tuvieron un peso promedio entre 73.9 y 192.2 g en los municipios de Cocorná y San Carlos respectivamente. Los individuos en este rango de pesos regularmente no son comercializados para carne o pesca deportiva ya que el peso de venta inicia en 250 g. El costo total del alimento para el experimento dos (teniendo en cuenta ambas fases) estuvo entre \$3,981.44 y \$9,550.73 (tabla 5). El costo de producción promedio de tilapia en Colombia es de aproximadamente \$5.300/Kg (MINCIT, 2015). Por lo tanto, nuestros resultados indican que, para las condiciones de pequeños productores de montaña en Antioquia, sólo el costo del alimento representó entre 75 a 180% del costo total promedio de producción de tilapia en Colombia.

Conclusiones

Bajo condiciones constantes subóptimas de temperatura (22.65 ± 0.74 °C) existieron diferencias en la sobrevivencia y tasa específica de crecimiento entre tres procedencias de Tilapia producidas en el departamento de Antioquia. En condiciones de cultivo en montaña de pequeños productores donde se registraron altas variaciones en las variables ambientales, existieron diferencias en la TEC de algunas procedencias. Los resultados del presente estudio provienen de mediciones de individuos comerciales, que son el producto de cruzamientos entre diferentes grupos de reproductores en las granjas orígenes. Creemos que es importante realizar experimentos con la conformación de familias y realizando cruces dialélicos con evaluación de un número apropiado de individuos medio hermanos y hermanos completos con marcación individual, para estimar parámetros y correlaciones genéticas de la tilapia en las condiciones de montaña de pequeños productores.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de la Gobernación de Antioquia en el marco del convenio 4600000970 SADRA-ASOACUICOLA del fondo de Ciencia Tecnología e innovación del Sistema General de Regalías

Referencias bibliográficas

Abdel-Tawwab, M.; Wafeek, M. Influence of water temperature and waterborne

cadmium toxicity on growth performance and metallothionein-cadmium distribution in different organs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Thermal Biology**, v.45, p.157–162, 2014.

Atwood, H.L.; Tomasso, J.R.; Webb, K.; Gatlin, D.M. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of environmental and dietary factors. **Aquaculture Research**, v.34, n.3, p.241–251, 2003.

Azaza, M.S.; Dhraïef, M.N.; Kraïem, M.M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, v.33 n.2, p.98–105, 2008.

Baras, E.; Jacobs, B.; Melard, C. Effect of water temperature on survival , growth and phenotypic sex of mixed (XX – XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.192, n.2-4, p.187–199, 2001.

Bentsen, H.B.; Gjerde, B.; Nguyen, N.H.; Rye, M.; Ponzoni, R.W.; Palada de Vera, M. et al. Genetic improvement of farmed tilapias: genetic parameters for body weight at harvest in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during five generations of testing in multiple environments. **Aquaculture**, v.338–341, p.56–65, 2012.

CCI, Coporación Colombia Internacional; MADR, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. **Encuesta nacional piscícola 2012a informe de resultados**. Bogotá, Colombia: CCI, 2012.

Charo-Karisa, H.; Rezk, M.A.; Bovenhuis, H.; Komen, H. Effects of rearing conditions on low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. En **Proceedings of the 6th international symposium on tilapia in aquaculture**, Manila, p.30–41, 2004.

Charo-Karisa, H.; Rezk, M.A.; Bovenhuis, H.; Komen, H. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. **Aquaculture**, v.249, n.1–4, p.115–123, 2005.

El-Sheriff, M.S.; El-Feky, A.M. Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fingerlings . II . Influence of Different Water Temperatures. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.11, n.3, 301–305.

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 Contributing to food security and nutrition for all**. Roma, Italia: FAO, 2016.

Furtado, A.; Rosadilla, D.; Franco, G.; Piaggio, J.; Puentes, R. Leucosis Bovina

Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. **Veterinaria (Montevideo)**, n.49, p.29–37, 2013.

Macías, A.M. Los pequeños productores agrícolas en México. **Carta Economica Regional**, n.25, v.111–112, p.7–18, 2013.

MINCIT, Ministerio de Comercio, Industria y Turismo de Colombia. **Plan de Negocios Sectorial de la Piscicultura de Colombia**. Bogotá, Colombia: MINCIT, 2015.

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. **Aquatic Animal Health Code**. Paris, Francia: OIE, 2016.

Sifa, L.; Chenhong, L.; Dey, M.; Gagalac, F.; Dunham, R. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. **Aquaculture**, v.213, n.1–4, p.123–129.

URPA, Unidad regional de planificación agropecuaria. **Zonificación agropecuaria, piscícola y forestal departamento de Antioquia**. Medellín, Colombia: URPA, 2011.

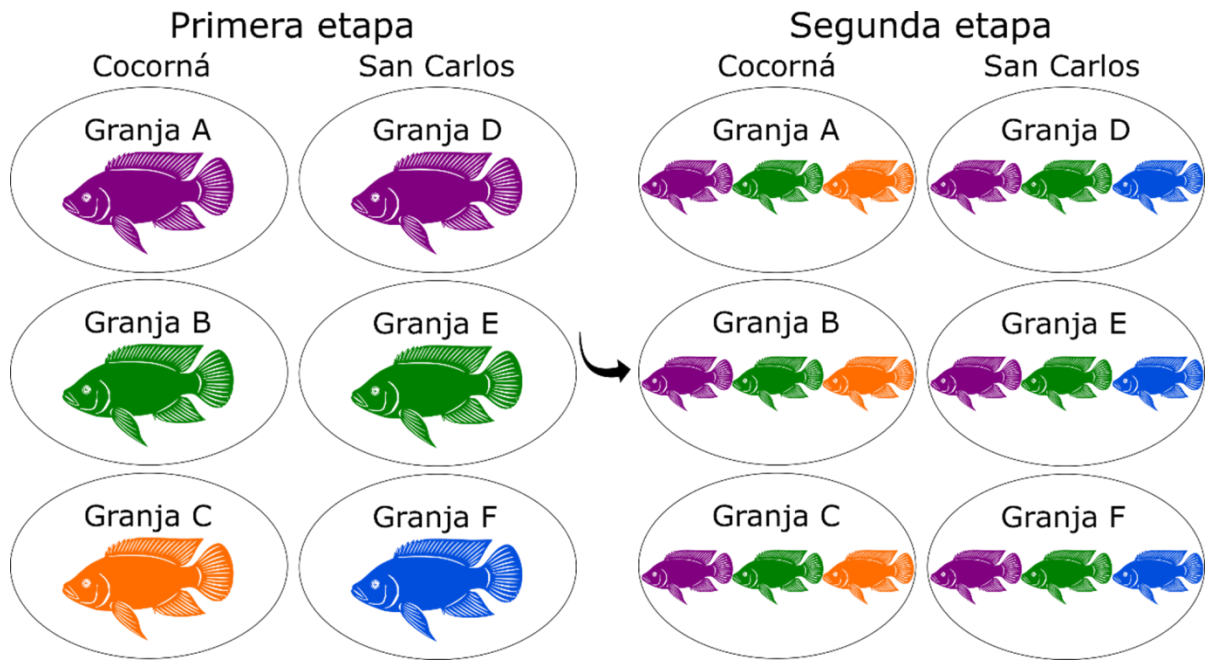


Figura 1. Experimento 2. Cada pez de color representa una procedencia diferente de los alevinos. Púrpura Til1, verde Til2, naranja Til3 y azul Til4.

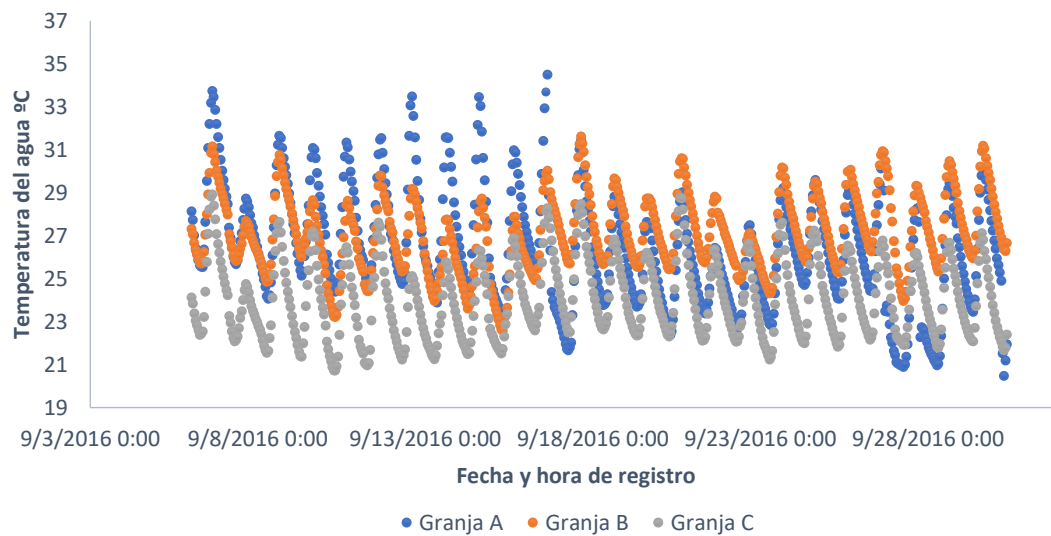


Figura 2. Variación temporal de la temperatura del agua en las tres granjas del municipio de Cocorná.

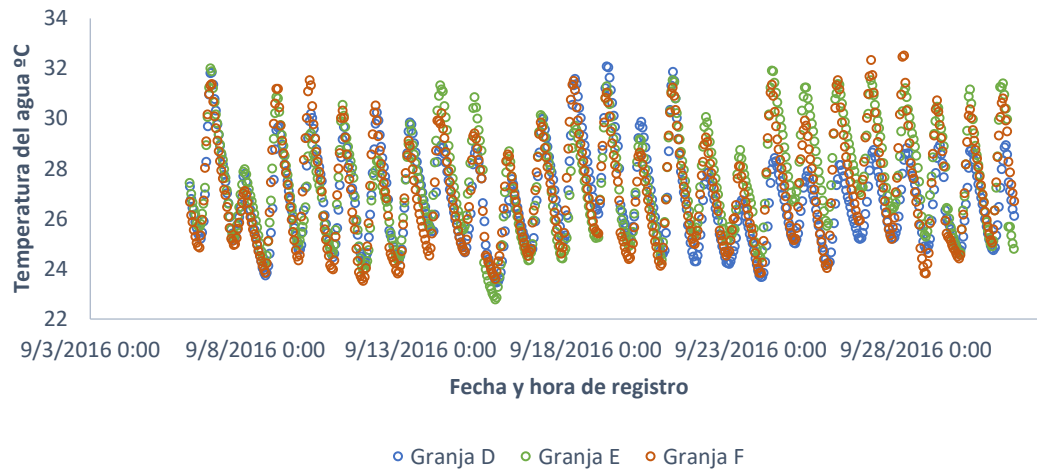


Figura 3. Variación temporal de la temperatura del agua en las tres granjas del municipio de San Carlos.

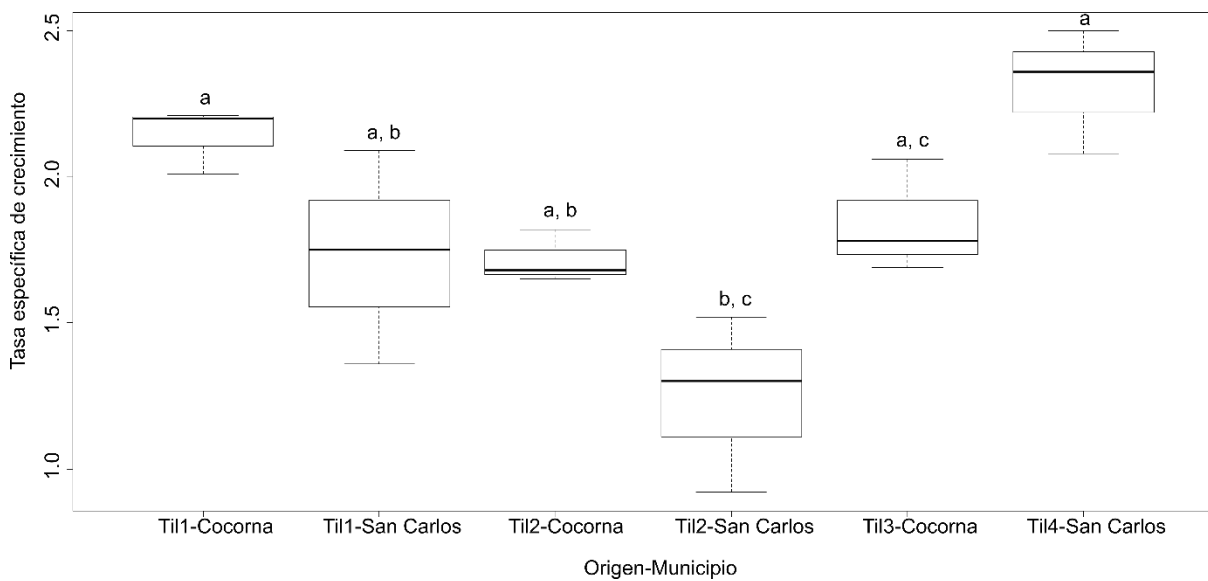


Figura 4. Diagrama de caja para la tasa específica de crecimiento en la segunda fase del experimento 2. Las letras diferentes indican diferencias ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

Tabla 1. Resultados experimento 1, temperatura subóptima constante.

Procedencia	Peso inicial (gramos)	Peso final (gramos)	Ganancia de peso (gramos)	TCA	TEC	Sobrevivencia (%)
Til1	1.24±0.17	1.79±0.51	0.60±0.20	11.76±2.43	1.71±0.40a	7.00±3.00b
Til2	0.93±0.18	1.59±1.02	0.61±0.07	6.99±5.02	1.94±0.28a	23.67±13.43a
Til3	0.42±0.07	1.18±0.42	0.77±0.26	3.72±1.81	3.91±0.97b	4.67±0.58b

Media ± desviación estándar. TCA: tasa de conversión alimenticia; TEC: tasa específica de crecimiento. Las letras diferentes indican diferencias ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos del agua durante el experimento 2.

Municipio	Granja	Medida	T (°C)	pH	Redox (mV)	CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	SDT (‰)	SOD (%)	OD (mg/L)	
Cocorná	A	min	20.46	6.57	-	339.90	98.00	0.05	0.00	0.00
		max	34.49	8.76	332.50	341.00	0.17	77.80	5.17	
		mediana	26.16	6.99	109.30	200.00	0.10	16.20	1.11	
	B	min	22.56	6.85	-	208.80	59.00	0.03	16.6	1.15
		max	31.61	9.14	306.30	235.00	0.12	87.20	6.00	
		mediana	26.97	7.23	234.55	126.50	0.06	48.80	3.67	
	C	min	20.72	7.11	103.60	63.00	0.03	26.80	2.05	
		max	28.92	9.38	284.10	189.00	0.09	105.90	7.27	
		mediana	23.74	7.54	242.85	134.50	0.07	50.20	3.71	
	San Carlos	D	min	21.44	6.86	242.40	39.00	0.02	24.50	1.87
			max	32.07	8.91	385.70	104.00	0.05	117.30	8.61
			mediana	24.94	7.21	307.60	67.00	0.03	59.95	4.50
E		min	20.10	7.06	161.90	83.00	0.04	12.80	0.91	
		max	37.76	9.47	297.20	375.00	0.19	128.70	8.69	
		mediana	26.26	7.27	216.10	343.00	0.17	55.60	3.93	
F		min	23.21	6.81	107.40	26.00	0.01	14.70	1.07	
		max	34.60	9.98	315.90	110.00	0.05	91.60	9.90	
		mediana	26.11	9.12	235.85	61.00	0.03	62.35	4.66	

T: temperatura; Redox: potencial de óxido reducción; CE: conductividad eléctrica; SDT: sólidos disueltos totales; SOD: saturación de Oxígeno; OD: Oxígeno disuelto.

Tabla 3 . Resultados de la primera etapa del experimento 2.

Municipio	Granja	Procedencia	Peso inicial (gramos)	Peso final (gramos)	TCA	TEC	Sob (%)	Costo (Pesos colombianos)
Cocorná	A	Til1	1.40±0.35	11.58±2.08	3.86	2.74	70.32	\$9,772
	B	Til2	1.30±0.23	32.8±1.8	2.45	4.61	36.25	\$6,414.53
	C	Til3	0.86±0.23	13.49±2.3	1.79	3.93	65.91	\$4,663.84
San Carlos	D	Til1	1.34±0.1	27.02±2.9	1.51	3.66	69.34	\$3,919.40
	E	Til2	1.24±0.21	64.87±3.7	2.68	4.83	25.87	\$6,648.29
	F	Til4	0.18±0.08	19.11±2.56	1.66	5.72	53.93	\$4,224.97

TCA: tasa de conversión alimenticia; TEC: tasa específica de crecimiento; Sob: sobrevivencia; Costo: costo del alimento por Kg de biomasa ganada

Tabla 4. Resultados de la segunda etapa del experimento 2.

Municipio	Granja	Procedencia	Peso inicial (gramos)	Peso final (gramos)	TCA	TEC	Sob (%)	Costo
Cocorná	A	Til1	12.5	121.8	1.86	2.21	59.61	\$4,367.97
		Til2	30.3	174	1.53	1.82	80.03	\$3,586.03
		Til3	14.3	119.6	3.24	2.06	35.52	\$7,626.29
	B	Til1	12.47	99.2	2.32	2.01	53.41	\$5,630.75
		Til2	31.9	180.1	2.94	1.68	32.44	\$6,945.28
		Til3	14.96	85.6	2.88	1.69	54.67	\$7,009.54
C	Til1	12.5	115.3	1.22	2.2	59.68	\$2,922.03	
	Til2	34.16	180.4	1.39	1.65	48.09	\$3,282.84	
	Til3	12.2	73.9	1.62	1.78	54.73	\$3,692.06	
San Carlos	D	Til1	26.75	83.7	2.88	1.36	60.26	\$6,774.43
		Til2	64.51	192.2	1.41	1.3	49.65	\$3,284.75
		Til4	18.95	108.7	1.84	2.08	45.38	\$4,479.98
	E	Til1	28.3	163.7	2.23	2.09	55.67	\$5,227.88
		Til2	50.66	181.7	3.11	1.52	49.16	\$7,188.06
		Til4	19.8	144	2.29	2.36	49.77	\$5,443.23
F	Til1	26.57	113.6	3.62	1.75	46.14	\$8,615.01	
	Til2	71.5	153.7	2.79	0.92	86.72	\$6,458.00	
		Til4	18.78	149.7	1.96	2.5	52.69	\$4,758.75

TCA: tasa de conversión alimenticia; TEC: tasa específica de crecimiento; Sob: sobrevivencia; Costo: costo del alimento por Kg de biomasa ganada

Tabla 5. Costo del alimento por Kg de biomasa húmeda para el experimento 2 completo

Municipio	Granja	Procedencia	Costo alimento / Kg peso húmedo
Cocorná	A	Til1	\$5,370.84
		Til2	\$4,703.04
		Til3	\$8,183.92
	B	Til1	\$6,859.15
		Til2	\$8,081.45
		Til3	\$7,824.62
	C	Til1	\$3,981.44
		Til2	\$4,497.48
		Til3	\$4,462.00
San Carlos	D	Til1	\$8,027.05
		Til2	\$5,516.18
		Til4	\$5,216.53
	E	Til1	\$5,905.45
		Til2	\$9,041.68
		Til4	\$6,024.16
	F	Til1	\$9,531.72
		Til2	\$9,550.73
		Til4	\$5,288.78

Capítulo 5

Transcriptome analysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to suboptimal temperatura

Objetivo específico:

Identificar genes expresados diferencialmente en tilapia bajo condiciones subóptimas de temperatura mediante el análisis del transcriptoma completo

Transcriptome analysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to suboptimal temperature

Andrés Montoya-López^{a,*}, Ariel Tarazona Morales^b, Martha Olivera-Angel^a, James Betancur-López^c.

^aGrupo Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.

Carrera 75 # 65-87, Medellín, Colombia *andres.montoyal@udea.edu.co,

martha.olivera@udea.edu.co

^bGrupo Biogénesis, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias

Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. Calle 59^a # 63-20. Medellín, Colombia

amtarazonam@unal.edu.co

^cAsociación Colombiana de Acuicultores ASOACUICOLA, Medellín, Colombia

asincronix@gmail.com

Abstract

To gain insight to the response of tilapia to suboptimal temperature, we compared the transcriptomic profile of Nile tilapias ($2.03 \pm 0.31\text{g}$) exposed to water temperature of $22.40 \pm 1.76\text{ C}$ (treatment) and $30.32 \pm 1.02\text{ °C}$ (control) for 13 days. Five individuals from treatment and control groups were sacrificed and liver samples from each fish were collected. Total RNA was isolated, sequencing libraries were prepared and paired end sequencing was performed on a NextSeq 500 system (Illumina). Transcript quantification was performed using Salmon SMEM-based mapping. An index was built separately for two reference transcriptomes: Oreonil1.0 and ASM185804v2. Differential gene expression was analyzed for each of the reference transcriptomes data sets by the DESeq2 package in R. The final number of paired-end reads per sample ranged from 40,567,285 to 47,803,640. A total of 973 (813 up-/ 160 down-regulated) and 1,554 (1,257 up-/ 297 down-regulated) differentially expressed genes with p -value adjusted < 0.05 and a fold change ≥ 2 (DEGs) were found in treatment compared with the control for Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively. Furthermore, 613 DEGs were identified by

both indexes. Among the 20-top ranked DEGs (by fold change) six and ten were uncharacterized in Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively. Top ranked Gene Ontology (GO) terms (by p value) in the enrichment analysis for upregulated DEGs included: “cell cycle”, “cell cycle process”, “mitotic cell cycle” and “DNA-dependent DNA replication”. In contrast, top ranked GO terms for downregulated DEGs included: “lipid biosynthetic process”, “organic hydroxy compound metabolic process”, “isoprenoid biosynthetic process” and “isoprenoid metabolic process”. Our results provide new evidence concerning differences in the expression of uncharacterized genes in low suboptimal temperature in Nile tilapia. Additional studies are required to validate and understand the role of the uncharacterized DEGs identified in this study in thermal stress.

Keywords: aquaculture, differential expressed genes, high-throughput sequencing technology, thermal stress

Introduction

Temperature is a key environmental factor in the life history of ectotherm fishes. This variable affects the kinetic energy of molecules and modifies the rates of diffusion and molecular interactions as well as macromolecular and membrane properties (Guderley, 2004). Therefore, temperature affects virtually all biochemical, physiological and behavior traits of fishes (Beitinger, Bennett, & McCauley, 2000). Additionally, the adaptation to temperature above or below the optimum range of different farmed species has been an important issue for aquaculture because thermal stress affects the biological performance including growth and susceptibility to pathogens (Ibarz et al., 2010).

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the most important fish in aquaculture worldwide (FAO, 2016). The growth rate and survival of *O. niloticus* is temperature dependent, reaching their optimal between 26 to 30°C, and decline significantly beyond this range (Abdel-Tawwab & Wafeek, 2014; Azaza, Dhraïef, & Kraïem, 2008; Baras, Jacobs, & Melard, 2001)

The development of high-throughput sequencing technology (HTST), and its related bioinformatic analyses has enabled significant advances in the understanding of a variety of biochemical and physiological processes (Zhao & Zhang, 2015) including the profiling of transcriptional changes induced by thermal stress, which makes

possible the identification of genes that are likely to be targets of selection (Smith, Bernatchez, & Beheregaray, 2013).

In recent years, there has been a surge of interest in the transcriptomic responses to thermal stress of *Oreochromis niloticus*. However, most of the studies have focused on the short-term responses to acute thermal stress, lethal temperature limit or exposition to variable temperature conditions. For example, in the study of Yang et al. (2015a) *O. niloticus* was treated at 30 °C to lethal temperature of 10°C in decrement of 1°C per day and differentially expressed genes were identified in the liver at 30°C, 26°C, 20°C, 16°C, and 10°C; Hu et al. (2016) identified differentially expressed genes in the gills of *O. niloticus* exposed to 28 °C, 8 °C for 0 h, 8 °C for 6 h and 8°C for 12 h; Qiang et al. (2017) exposed GIFT *O. niloticus* to 28°C or 37.5°C for 24 hours and determined differentially expressed genes in the liver.

The availability of a new genome assembly for *O. niloticus* (ASM185804v2) and the improvement in the performance of alignment-free approaches for high-throughput sequencing analysis (Zielezinski, Vinga, Almeida, & Karlowski, 2017) leading us hypothesized that it is possible to identify genes not previously studied in hepatic response to thermal stress in this species. Therefore, to gain insight to the response of Nile tilapia to suboptimal temperature, in this study we compared the hepatic transcriptomic profile of tilapias exposed to: i. suboptimal constant water temperature and ii. constant warm water temperature for 13 days. Our results provide new evidence concerning differences in the expression of uncharacterized genes in low suboptimal temperature in Nile tilapia.

Material and methods

Experimental conditions

All animal handling was performed in accordance with the section seven of the Aquatic Animal Health Code about the welfare of farmed fish (OIE, 2016). Nile tilapia were obtained from a local fish farm (Antioquia-Colombia). Fishes were identified according to Trewavas (1983). One hundred and twenty tilapias (2.03 ± 0.31 g) were placed in two 400-liters aquariums (n=60) filled with non-treated fresh water with temperature 23.73 ± 0.33 °C and a 12 h light:12 h dark rhythm. Each aquarium included a biological filter with a pump of capacity 2,800 liters hour⁻¹ and water temperature were recorded every 30 minutes using a HOBO Pro v2 underwater

temperature logger (Onset, USA). The tilapias were fed twice daily with a commercial diet (45% crude protein). After seven days, one of the two tanks, was randomly selected as control whereas the other was used as the treatment. Temperatures in the control and treatment tanks were 30.32 ± 1.02 °C (T30.32) and 22.40 ± 1.76 (T22.4) respectively. We choose these temperatures for the following reasons: i) the control temperature represented the higher limit of the optimal temperature for growth and survival for *O. niloticus*; ii) the treatment temperature was non-lethal for *O. niloticus* and reflected the water conditions in most foothill slopes of Andean region in Colombia. A third of the water in each tank was changed every day with no-treated water at same temperature. Temperature conditions were then maintained for 13 days. This length of time was used because longer exposure may allow the temperature tolerance acclimation state of a fish to change during a trial and this approach may allow tolerance to be independent of the pretest acclimation temperature (Beitinger et al. 2000). Upon completion of the temperature trial, five healthy individuals from each treatment were sacrificed using clove oil (Fernandes, Bastos, Barreto, Lourenço, & Penha, 2017) and liver samples from each fish were collected and stored in RNAlater (Ambion, USA).

RNA extraction, library construction and sequencing

Total RNA was isolated using the PureLink RNA Mini kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Residual DNA was removed by DNase I treatment (Epicentre Technologies, USA). A quality check was performed with the Agilent 2100 Bioanalyzer using the RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, USA). RNA samples with RINs between 7.8 and 9.0 were used. Total RNA was depleted of rRNA with the Ribo-Zero Kit (Epicentre Technologies, USA) and sequencing libraries were prepared using TruSeq Stranded mRNA LT kit (Illumina, USA). The rRNA-depleted RNA was fragmented, followed by first and second strand cDNA synthesis. The cDNA was subject to adenylation of 3' ends and adapter ligation. The size distribution of the amplified DNA was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). All libraries were quantified by real-time PCR using the KAPA SYBR® FAST qPCR kit (Kapa Biosystems, USA). Paired end sequencing was performed on a NextSeq 500 system (Illumina, USA). The number of sequenced red per sample, base quality score, nucleotide distribution, GC content, presence of adapter sequences and read length distribution was analyzed by fastQC version

0.11.5. Adaptor-only reads and low-quality reads were filtering out to obtain clean reads.

Abundances of transcripts and differential expression analysis

Transcript quantification was performed using Salmon SMEM-based mapping (Patro, Duggal, Love, Irizarry, & Kingsford, 2017). An index was built separately for two reference transcriptomes: Oreonil1.0 (https://www.ensembl.org/Oreochromis_niloticus) and ASM185804v2 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_001858045.1/). Differential gene expression was analyzed for each of the reference transcriptomes data sets using a negative binomial distribution model as implemented in the DESeq2 package (Love, Huber, & Anders, 2014) in R version 3.4.2. Genes with an adjusted p -value < 0.05 by the Benjamin-Hochberg method were considered as statistically significant. We used this pipeline because Sahraeian et al. (2017) demonstrated that Salmon-SMEM had one of the most consistent predictions across samples between the short-read-based techniques. Gene ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) with a fold change ≥ 2.0 was performed using g:Profiler (Reimand et al., 2016). For each dataset, three DEG lists (complete DEGs, upregulated DEGs and downregulated DEGS) were analyzed separately. Only significantly enriched terms were selected using the Benjamini-Hochberg correction ($p_{adj} < 0.05$). R packages VennDiagram, ggplot2, and pheatmap were used for data visualization.

Results

The final number of paired-end reads per sample ranged from 40,567,285 to 47,803,640. Mapping rates for Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets were between 77.45% – 82.59% and 90.83% – 93.67% respectively (figure 1). A total of 973 (813 up-/ 160 down-regulated) and 1,554 (1,257 up-/ 297 down-regulated) DEGs with p -value adjusted < 0.05 and a fold change ≥ 2.0 were found in T22.4 compared with T30.32 for Oreonil1.0 and ASM185804v2 respectively (tables 1 and 2, supplementary files 1 and 2). Among these, 613 DEGs were identified by both datasets (figure 1).

g:Profiler was able to recognize 653 (67.11%) and 532 (34.23%) DEGs for Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively. Complete DEGs lists were enriched for 166 and 199 GO terms for Oreonil1.0 and ASM185804v2 respectively (table 3, supplementary files 3 and 4). The highest-ranking GO terms were cell cycle (p adj = $1.07E-14$ and $3.36E-18$ for Oreonil1.0 and ASM185804v2 respectively), cell cycle process (p adj = $1.31E-14$ and $3.51E-15$) and mitotic cell cycle (p adj = $1.92E-14$ and $3.36E-18$). In the complete DEGs list of Oreonil1.0 dataset, the GO types biological process (BP), molecular function (MF) and cellular component (CC) comprised 74.7%, 15.66% and 9.64% of terms in the enrichment analysis respectively. Likewise, in the complete DEGs list of ASM185804v2 dataset the GO types BP, MF and CC were 76.88%, 11.06% and 12.06% respectively. In the upregulated lists, g:Profiler was able to recognize 524 (64.45%) and 417 (33.17%) DEGs for Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively. Upregulated DEGs lists were enriched for 183 and 210 GO terms for Oreonil1.0 and ASM185804v2 respectively (supplementary files 5 and 6). The GO terms and GO types in the upregulated DEGs lists were similar to those obtained in the complete DEGs lists (table 4).

In the downregulated DEGs lists, g:Profiler identified 129 (80.62%) and 115 (38.72%) DEGs for Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively. Downregulated DEGs lists were enriched for 42 and 38 GO terms for Oreonil1.0 and ASM185804v2 respectively (supplementary files 7 and 8). The highest-ranking GO terms were lipid biosynthetic process (p adj = $1.69E-08$ and $2.91E-08$ for Oreonil1.0 and ASM185804v2 respectively), organic hydroxy compound metabolic process (p adj = $6.24E-07$ and 0.0000164) and isoprenoid biosynthetic process (p adj = 0.00000121 and $6.11E-07$) (table 5).

The principal component analysis showed that the first principal component (PC1) explained 37% and 34% of the total variance, while PC2 explained 19% and 17% of the total variance for the 500 most variable genes in Oreonil1.0 and ASM185804v2 respectively (figures 2 and 3). PC1 separated four of the five samples of T22.4 from those of T30.32. Expression profiles of DEGs are shown in figures 4 and 5. The pattern of expression of DEGs, grouped the samples according to the experimental

temperature (treatment or control), excepting the sample 2 from treatment group. Two main clusters of DEGs separated the treatment and control groups.

Discussion

In the present study, the hepatic transcriptome response of *Oreochromis niloticus* to suboptimal temperature for 13 days was the differential expression of 973 (813 up-/ 160 down-regulated) or 1,554 (1,257 up-/ 297 down-regulated) genes using Oreonil1.0 or ASM185804v2 datasets respectively. Our results from gProfiler showed 351 (32.99%) and 1022 (65.76%) uncharacterized DEGs in Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively. However, the annotations from each assembly displayed 312 (32.06%) and 450 (28.96%) uncharacterized DEGs in Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively (see supplementary files 1 to 4). Among the 20-top ranked DEGs (by fold change) six and ten were uncharacterized in Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively. Our findings are similar to those of Zhao & Zhang (2015) who demonstrated that the choice of a genome annotation has a dramatic effect on both gene quantification and differential analysis. According to these authors, no database is perfect because some gene annotations might be inaccurate or entirely wrong.

We found that complete, upregulated and downregulated DEGs lists were enriched for 166 and 199, 183 and 210 as well as 42 and 38 GO terms for Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively. The GO terms and types of the complete and upregulated lists were similar. The highest-ranking GO terms of these lists were cell cycle, cell cycle process, mitotic cell cycle and DNA-dependent DNA replication. In contrast, the highest-ranking GO terms of downregulated lists were lipid biosynthetic process, organic hydroxy compound metabolic process, isoprenoid biosynthetic process and isoprenoid metabolic process. Genes with functional links in pathways tended to have positively correlated expression levels. Therefore, enrichment analysis through a separate DEGs list strategy (i.e. upregulated and downregulated lists) is more powerful for finding significant functional classes recognized in the GO database (Hong *et al.*, 2013).

Most of the DEGs identified in this work were upregulated (83.53% and 80.88% in Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively). These results can be explain for the compensation in rate depressing effects of cold by synthesizing more enzymes to increase biochemical performance (Somero and Hochachka, 2002; Gracey et al. 2004). Yang et al., (2015) found that low temperature affects DNA replication, transcription, and translation in Nile tilapia, which represents the basic response to low temperature stress in fish. These authors, also found that genes affecting the content and proportion of fatty acids in the body by influencing i. fatty acid metabolism, ii. ether lipid metabolism, iii. biosynthesis of unsaturated fatty acids, iv fatty acid elongation in mitochondria, v. cyanoamino acid metabolism, vi linoleic acid metabolism, vii sphingolipid metabolism, viii. alpha-linolenic acid metabolism, and ix. arachidonic acid metabolism were downregulated in the liver of tilapias exposed to low temperature. Furthermore, Nile tilapia raised at a suboptimal temperature (22°C) growth better when diets contained higher unsaturated fatty acid amounts, whereas dietary saturated fatty acids hinders growth (Corrêa *et al.*, 2017). In comparison, heat stress for 24 h in GIFT tilapia increased lipid synthesis, impaired cell membrane homeostasis, changes the immune response, alters the decomposition, utilization, and regulation of antioxidants as well as cell growth in the liver (Qiang *et al.*, 2017).

Acute low-temperature stress enhances fat degradation and utilization of serum glucose, triglyceride and cholesterol and increases serum cortisol levels leading to physiological imbalance and reduced immune function in GIFT tilapia (He *et al.*, 2015). In teleost, lower temperatures lead to a shutdown or slowing of immune response mechanisms, with the enhancing of innate cellular components potentially providing partial compensation for deficiencies in adaptive immunity (Abram *et al.*, 2017).

Hierarchical clustering (figures 4 and 5) showed a clear separation of samples by temperature (30.32°C versus 22.4°C) except for one sample. In accordance with these findings, previous studies have shown that gene expression can be highly variable, and transcription levels vary within multiple biological scales: within and among individuals, populations, and species (Alvarez et al. 2015). For example, Cortijo et al. (2018) identified hundreds of genes that exhibited high inter-individual

transcriptional variability and found that many were involved in environmental responses.

Our study revealed that GTPase IMAP family member 8-like was upregulated 22-fold, urokinase plasminogen activator surface receptor-like was upregulated 7.5-fold while major histocompatibility complex class I-related gene protein-like was downregulated ~ 6-fold and lysosomal thiol reductase was downregulated ~ 7.5-fold at suboptimal temperature compared to control in both datasets.

The expression of GTPase immune-associated proteins family (GIMAP) genes in the immune system and their involvement in immune cell development or survival suggest that this family has been coopted, conceivably in distinct instances during evolution, to support or control immune responses (Ciucci and Bosselut, 2014). These GIMAP might have crucial roles not only in supporting T-cell development, selection and survival but also in controlling T-cell homeostasis, autoimmunity and leukemogenesis (Nitta and Takahama, 2007). Although some proportion of these large family might be evolutionary intermediates and pseudogenes, it emphasizes the immune system and host defense processes in the adaptive radiation of teleost fish (Mattingsdal *et al.*, 2018).

One interesting finding was that genes 102076162 (upregulated 22-fold) and 100701997 (downregulated ~ 7-fold) in the dataset ASM185804v2 were both annotated as GTPase IMAP family member 8-like. On one hand, the gene 102076162 is located on the unplaced contig NW_020327639.1 and generates one transcript (XM_019355256.2). On the other hand, gene 100701997 is located on linkage group 12 and potentially generates three transcripts (XM_019365428.2, XM_013270928.3 and XM_019365427.2). However, the specific functions of the predicted proteins in cold stress response of tilapia are unknown.

Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) exerts pleiotropic functions controlling not only extracellular matrix degradation but also modulating the development of the immune response by the regulation of cell migration, chemotaxis, cell–cell interaction and phagocytosis of apoptotic cells through its interaction with integrins (Genua *et al.*, 2015). uPAR requirement and function becomes obvious under pathological circumstances, like acute and chronic inflammation, infections,

tumorigenesis and induced hematopoietic stem cells mobilization, or under conditions of tissue remodeling or reconstruction (Blasi and Sidenius, 2010).

The genes of the major histocompatibility complex (MHC) code for highly polymorphic cell surface glycoprotein structures, involved in the specific immune response, by displaying both self and non-self peptides to T-lymphocytes (Cnaani *et al.*, 2003). The peptides presented by MHC class I molecules are mostly derived from intracellular proteins, degraded by the proteasome (Kelley *et al.*, 2005). Cichlids, rockfish, pufferfish, sticklebacks and Atlantic cod of the more advanced neoteleost subdivision have undergone extensive species radiations and MHC duplications in the past 1–20 million years, giving rise to 17 or more class I and II genes present in extant species (Kelley *et al.*, 2005).

Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT) is known to reduce disulfide bonds in endosomes, lysosomes and phagosome and maintains phagosomal proteolytic activity, particularly in alternatively activated macrophage (Balce *et al.*, 2014). GILT plays a role in the presentation of MHC class II-restricted antigens and is also involved in MHC I-restricted antigens in adaptive immunity (Yang *et al.*, 2015b).

In conclusion, suboptimal temperature exposure caused changes in the hepatic transcriptome of tilapia. The reference transcriptome in alignment-free quantification had an important effect in the identification of DEGs of tilapias exposed to suboptimal temperature. Among the 20-top ranked DEGs (by fold change) six and ten were uncharacterized in Oreonil1.0 and ASM185804v2 datasets respectively. Top ranked GO terms (by *p* value) in the enrichment analysis for upregulated DEGs included “cell cycle”, “cell cycle process”, “mitotic cell cycle” and “DNA-dependent DNA replication”. In contrast, top ranked GO terms for downregulated DEGs included: “lipid biosynthetic process”, “organic hydroxy compound metabolic process”, “isoprenoid biosynthetic process” and “isoprenoid metabolic process. Our results are promising and expand the knowledge of the response of Nile tilapia to low suboptimal temperature. Additional studies are required to validate and understand the role of the uncharacterized DEGs identified in this study in thermal stress

Acknowledgments

This research was funded by the “convenio 4600000970 Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia – ASOACUICOLA, Fondo de Ciencia Tecnología e Innovación, Sistema General de Regalías”. We want to thank to “Doctorado en Ciencias Animales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia” and “Programa Nacional de Formación de Investigadores - crédito educativo condonable de Colciencias convocatoria 567 de estudios de doctorado en Colombia”

References

Abdel-Tawwab M and Wafeek M (2014) Influence of water temperature and waterborne cadmium toxicity on growth performance and metallothionein-cadmium distribution in different organs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). J Therm Biol 45:157–162. doi: 10.1016/j.jtherbio.2014.09.002

Abram QH, Dixon B and Katzenback B (2017) Impacts of Low Temperature on the Teleost Immune System. Biology (Basel) 6:39. doi: 10.3390/biology6040039

Alvarez M, Schrey AW and Richards CL (2015) Ten years of transcriptomics in wild populations: What have we learned about their ecology and evolution? Mol Ecol 24:710–725. doi: 10.1111/mec.13055

Azaza MS, Dhraïef MN and Kraïem MM (2008) Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. J Therm Biol 33:98–105. doi: 10.1016/j.jtherbio.2007.05.007

Balce DR, Allan ERO, McKenna N and Yates RM (2014) γ -Interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT) maintains phagosomal proteolysis in alternatively activated macrophages. J Biol Chem 289:31891–31904. doi: 10.1074/jbc.M114.584391

Baras E, Jacobs B and Melard C (2001) Effect of water temperature on survival , growth and phenotypic sex of mixed (XX – XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 187–199.

Beitinger L, Bennett W and McCauley R (2000) Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environ Biol Fishes* 58:237–275.

Blasi F and Sidenius N (2010) The urokinase receptor: Focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett* 584:1923–1930. doi: 10.1016/j.febslet.2009.12.039

Ciucci T and Bosselut R (2014) Gimap and T cells: A matter of life or death. *Eur J Immunol* 44:348–351. doi: 10.1002/eji.201344375

Cnaani A, Lee BY, Ron M, Hulata G, Kocher TD and Seroussi E (2003) Linkage mapping of major histocompatibility complex class I loci in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Anim Genet* 34:384–397. doi: 10.1046/j.1365-2052.2003.01045.x

Corrêa CF, Nobrega RO, Mattioni B, Block JM and Fracalossi DM (2017) Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. *Aquac Nutr* 23:1016–1026. doi: 10.1111/anu.12469

Cortijo S, Aydin Z, Ahnert S and Locke J (2018) Widespread inter-individual gene expression variability in *Arabidopsis thaliana*. bioRxiv 335380. doi: 10.1101/335380

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016) The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 Contributing to food security and nutrition for all. FAO, Rome

Fernandes IM, Bastos YF, Barreto DS, Lourenço LS and Penha JM (2017) The

efficacy of clove oil as an anaesthetic and in euthanasia procedure for small-sized tropical fishes. *Brazilian J Biol* 77:444–450. doi: 10.1590/1519-6984.15015

Genua M, D'Alessio S, Cibella J, Gandelli A, Sala E, Correale C, Spinelli A, Arena V, Malesci A, Rutella S et al. (2015) The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) controls macrophage phagocytosis in intestinal inflammation. *Gut* 64:1465–1465. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305933

Gracey AY, Fraser EJ, Li W, Fang Y, Taylor RR, Rogers J, Brass A and Cossins AR (2004) Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. *Proc Natl Acad Sci* 101:16970–16975. doi: 10.1073/pnas.0403627101

Guderley H (2004) Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79:409–427. doi: 10.1017/S1464793103006328

He J, Qiang J, Yang H, Xu P, Zhu ZX and Yang RQ (2015) Changes in the fatty acid composition and regulation of antioxidant enzymes and physiology of juvenile genetically improved farmed tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), subjected to short-term low temperature stress. *J Therm Biol* 53:90–97. doi: 10.1016/j.jtherbio.2015.08.010

Hong G, Zhang W, Li H, Shen X and Guo Z (2013) Separate enrichment analysis of pathways for up- and downregulated genes. *J R Soc Interface* 11:20130950–20130950. doi: 10.1098/rsif.2013.0950

Hu P, Liu M, Liu Y, Wang J, Zhang D, Niu H, Jiang S, Wang J, Zhang D, Han B et al. (2016) Transcriptome comparison reveals a genetic network regulating the lower temperature limit in fish. *Sci Rep* 6:1–12. doi: 10.1038/srep28952

- Ibarz A, Padrós F, Gallardo MÁ, Fernández-Borràs J, Blasco J and Tort L (2010) Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: Review of cold-induced alterations and “Winter Syndrome.” *Rev Fish Biol Fish* 20:539–556. doi: 10.1007/s11160-010-9159-5
- Kelley J, Walter L and Trowsdale J (2005) Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics* 56:683–695. doi: 10.1007/s00251-004-0717-7
- Love MI, Huber W and Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Mattingsdal M, Jentoft S, Tørresen OK, Knutsen H, Hansen MM, Robalo JI, Zagrodzka Z, André C and Gonzalez EB (2018) A continuous genome assembly of the corkwing wrasse (*Symphodus melops*). *Genomics* pii: S0888-7543(18)30038-7. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.04.009
- Nitta T and Takahama Y (2007) The lymphocyte guard-IANs: regulation of lymphocyte survival by IAN/GIMAP family proteins. *Trends Immunol* 28:58–65. doi: 10.1016/j.it.2006.12.002
- OIE WO for AH (2016) Aquatic Animal Health Code. World Organisation for Animal Health., Paris
- Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA and Kingsford C (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* 14:417–419. doi: 10.1038/nmeth.4197
- Qiang J, Bao WJ, Tao FY, He J, Li XH, Xu P and Sun LY (2017) The expression

profiles of miRNA-mRNA of early response in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver by acute heat stress. *Sci Rep* 7:1–15. doi: 10.1038/s41598-017-09264-4

Reimand J, Arak T, Adler P, Kolberg L, Reisberg S, Peterson H and Vilo J (2016) g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res* 44:W83–W89. doi: 10.1093/nar/gkw199

Sahraeian SME, Mohiyuddin M, Sebra R, Tilgner H, Afshar PT, Au KF, Bani Asadi N, Gerstein MB, Wong WH, Snyder MP et al. (2017) Gaining comprehensive biological insight into the transcriptome by performing a broad-spectrum RNA-seq analysis. *Nat Commun* 8:59. doi: 10.1038/s41467-017-00050-4

Smith S, Bernatchez L and Beheregaray LB (2013) RNA-seq analysis reveals extensive transcriptional plasticity to temperature stress in a freshwater fish species. *BMC Genomics* 14:

Somero G and Hochachka P (2002) *Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press, Oxford

Trewavas E (1983) *Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia*. British Museum (Natural History), London

Yang C, Jiang M, Wen H, Tian J, Liu W, Wu F and Gou G (2015a) Analysis of differential gene expression under low-temperature stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using digital gene expression. *Gene* 564:134–140. doi: 10.1016/j.gene.2015.01.038

Yang Q, Zhang J, Hu L, Lu J, Sang M and Zhang S (2015b) Molecular structure and functional characterization of the gamma-interferon-inducible lysosomal thiol

reductase (GILT) gene in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Fish Shellfish Immunol* 47:689–696. doi: 10.1016/j.fsi.2015.10.018

Zhao S and Zhang B (2015) A comprehensive evaluation of ensembl, RefSeq, and UCSC annotations in the context of RNA-seq read mapping and gene quantification. *BMC Genomics* 16:1–14. doi: 10.1186/s12864-015-1308-8

Zielezinski A, Vinga S, Almeida J and Karlowski WM (2017) Alignment-free sequence comparison: Benefits, applications, and tools. *Genome Biol* 18:1–17. doi: 10.1186/s13059-017-1319-7

Table 1. Representative DEGs between 22.40 ± 1.76 °C (treatment) and 30.32 ± 1.02 °C (control) groups for Oreonil1.0 dataset. *p* adj, adjusted p-value by Benjamin-Hochberg method.

Ensembl ID	Entrez ID	Fold Change	<i>p</i> adj	Description
ENSONIG00000010736	102076162	22.35	3.00E-11	GTPase IMAP family member 8
ENSONIG00000009460	-	10.31	0.0010	uncharacterized
ENSONIG00000010564	102083292	7.50	2.58E-06	urokinase plasminogen activator surface receptor-like
ENSONIG00000012794	100697793	7.37	1.75E-07	DNA polymerase III PolC-type-like
ENSONIG00000012721	-	7.03	0.029	uncharacterized
ENSONIG00000009459	-	6.99	1.27E-07	uncharacterized
ENSONIG00000016238	100702914	6.92	0.016	glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 3(grik3)
ENSONIG00000019534	100710049	6.66	0.002	tripartite motif-containing protein 16-like
ENSONIG00000001550	100691306	6.65	0.003	ammonium transporter Rh type
ENSONIG00000006974	-	6.59	0.0001	uncharacterized
ENSONIG00000014556	100709362	-5.16	0.0005	resuscitation-promoting factor RpfA-like
ENSONIG00000003482	-	-5.50	0.005	uncharacterized
ENSONIG00000004398	106098464	-5.60	7.59E-42	uncharacterized
ENSONIG00000019991	100699341	-5.67	5.97E-08	major histocompatibility complex class I-related gene protein-like
ENSONIG00000005109	-	-5.79	0.006	HERV-H LTR-associating 2a, tandem duplicate 2
ENSONIG00000000022	102078973	-5.83	0.029	endonuclease domain-containing 1 protein-like
ENSONIG00000019214	100706375	-5.95	0.008	membrane protein FAM159A-like
ENSONIG00000016604	100711761	-6.13	5.07E-07	histone-arginine methyltransferase CARM1-like
ENSONIG00000016438	-	-6.81	0.036	pcdh15b
ENSONIG00000012705	100708541	-7.51	0.041	lysosomal thiol reductase(ifi30)

Table 2. Representative DEGs between 22.40 ± 1.76 C (treatment) and 30.32 ± 1.02 °C (control) groups for ASM185804v2 dataset. *p* adj, adjusted p-value by Benjamin-Hochberg method.

Entrez ID	Fold Change	<i>p</i> adj	Description
102076162	22.79	1.28E-11	GTPase IMAP family member 8-like
109200022	9.95	2.91E-05	uncharacterized
100705087	8.96	2.59E-15	cathepsin L1-like
109201766	8.77	1.58E-05	uncharacterized
100699194	8.54	0.0048	uncharacterized
106098717	8.33	1.40E-07	polyubiquitin-like
102080640	7.59	1.00E-05	interferon-induced very large GTPase 1-like
102080436	7.58	1.87E-07	uncharacterized
102083292	7.52	9.14E-07	urokinase plasminogen activator surface receptor-like
102081555	7.43	1.45E-05	uncharacterized
106098949	-6.43	0.0004	uncharacterized
102078247	-6.47	0.0119	uncharacterized
109199445	-6.49	0.0168	uncharacterized
100699341	-6.55	1.27E-06	major histocompatibility complex class I-related gene protein-like
109199405	-6.63	0.0210	uncharacterized
100701997	-7.01	0.0009	GTPase IMAP family member 8-like
109197358	-7.22	1.87E-48	uncharacterized
100711820	-7.73	0.001	protocadherin-15
102076770	-7.78	0.0136	GTPase IMAP family member 4-like
100708541	-8.07	0.0271	IFI30, lysosomal thiol reductase

Table 3. Representative gene ontology terms from the complete DEGs lists. p adj, adjusted p -value by Benjamin-Hochberg method

Reference transcriptome	GO term	p adj	count	type	description
Oreonil1.0	GO:0007049	1.07E-14	51	BP	cell cycle
	GO:0022402	1.31E-14	36	BP	cell cycle process
	GO:0000278	1.92E-14	32	BP	mitotic cell cycle
	GO:0006955	8.34E-11	36	BP	immune response
	GO:0000775	1.39E-10	12	CC	chromosome, centromeric region
	GO:0006261	7.62E-10	13	BP	DNA-dependent DNA replication
	GO:0007059	1.03E-09	16	BP	chromosome segregation
	GO:0043207	4.18E-09	22	BP	response to external biotic stimulus
	GO:0051707	4.18E-09	22	BP	response to other organism
ASM185804v2	GO:1903047	1.82E-08	20	BP	mitotic cell cycle process
	GO:0007049	3.36E-18	48	BP	cell cycle
	GO:0000278	3.36E-18	32	BP	mitotic cell cycle
	GO:0022402	3.51E-15	32	BP	cell cycle process
	GO:0006261	2.20E-11	13	BP	DNA-dependent DNA replication
	GO:0043207	1.42E-10	21	BP	response to external biotic stimulus
	GO:0051707	1.42E-10	21	BP	response to other organism
	GO:0007059	1.84E-10	15	BP	chromosome segregation
	GO:0009607	3.57E-10	22	BP	response to biotic stimulus
GO:1903047	8.12E-09	18	BP	mitotic cell cycle process	
GO:0006260	2.16E-08	17	BP	DNA replication	

Table 4. Representative gene ontology terms from the upregulated DEGs lists. p adj, adjusted p -value by Benjamin-Hochberg method

Reference transcriptome	GO term	p adj	count	type	description
Oreoni1.0	GO:0007049	1.13E-17	50	BP	cell cycle
	GO:0022402	1.74E-16	35	BP	cell cycle process
	GO:0000278	5.47E-16	31	BP	mitotic cell cycle
	GO:0006955	1.74E-13	36	BP	immune response
	GO:0000775	1.16E-11	12	CC	chromosome, centromeric region
	GO:0002376	2.1E-11	53	BP	immune system process
	GO:0007059	4.41E-11	16	BP	chromosome segregation
	GO:1903047	5.66E-10	20	BP	mitotic cell cycle process
	GO:0006261	1.15E-09	12	BP	DNA-dependent DNA replication
	GO:0098687	2E-09	12	CC	chromosomal region
ASM185804v2	GO:0007049	2.23E-21	47	BP	cell cycle
	GO:0000278	4.7E-20	31	BP	mitotic cell cycle
	GO:0022402	4.4E-17	31	BP	cell cycle process
	GO:0007059	1.07E-11	15	BP	chromosome segregation
	GO:0006261	3.81E-11	12	BP	DNA-dependent DNA replication
	GO:1903047	2.51E-10	18	BP	mitotic cell cycle process
	GO:0006260	9.31E-09	16	BP	DNA replication
	GO:0043207	1.62E-08	17	BP	response to external biotic stimulus
	GO:0051707	1.62E-08	17	BP	response to other organism
	GO:0009607	2.05E-08	18	BP	response to biotic stimulus

Table 5. Representative gene ontology terms from the downregulated DEGs lists. p adj, adjusted p-value by Benjamin-Hochberg method

Reference transcriptome	GO term	p adj	count	type	description
Oreoni1.0	GO:0008610	1.69E-08	13	BP	lipid biosynthetic process
	GO:1901615	6.24E-07	9	BP	organic hydroxy compound metabolic process
	GO:1901617	0.00000103	7	BP	organic hydroxy compound biosynthetic process
	GO:0006720	0.00000103	7	BP	isoprenoid metabolic process
	GO:0008299	0.00000121	6	BP	isoprenoid biosynthetic process
	GO:0006629	0.00000184	17	BP	lipid metabolic process
	GO:0008202	0.00000229	7	BP	steroid metabolic process
	GO:0006694	0.00000229	6	BP	steroid biosynthetic process
	GO:0016126	0.00000229	4	BP	sterol biosynthetic process
	GO:0016125	0.00000389	5	BP	sterol metabolic process
ASM185804v2	GO:0008610	2.91E-08	12	BP	lipid biosynthetic process
	GO:0006720	4.06E-07	7	BP	isoprenoid metabolic process
	GO:0008299	6.11E-07	6	BP	isoprenoid biosynthetic process
	GO:0006694	0.00000124	6	BP	steroid biosynthetic process
	GO:0016126	0.0000018	4	BP	sterol biosynthetic process
	GO:0016125	0.00000237	5	BP	sterol metabolic process
	GO:0006629	0.00000498	15	BP	lipid metabolic process
	GO:1901617	0.00000584	6	BP	organic hydroxy compound biosynthetic process
	GO:1901615	0.0000164	7	BP	organic hydroxy compound metabolic process
	GO:0008202	0.0000169	6	BP	steroid metabolic process

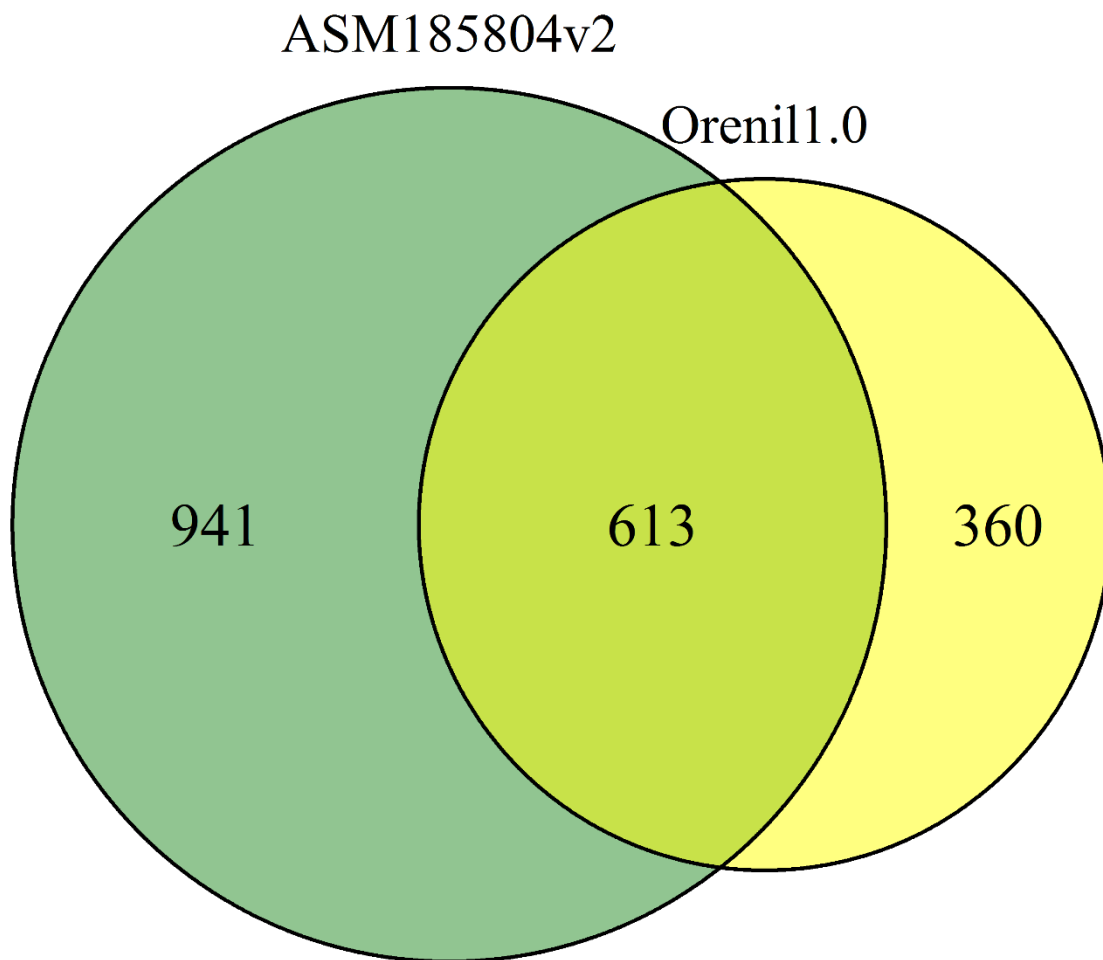


Figure 1. Comparison of DEGs found in 22.40 ° C treatment versus 30.32 ° C control of two reference transcriptomes.

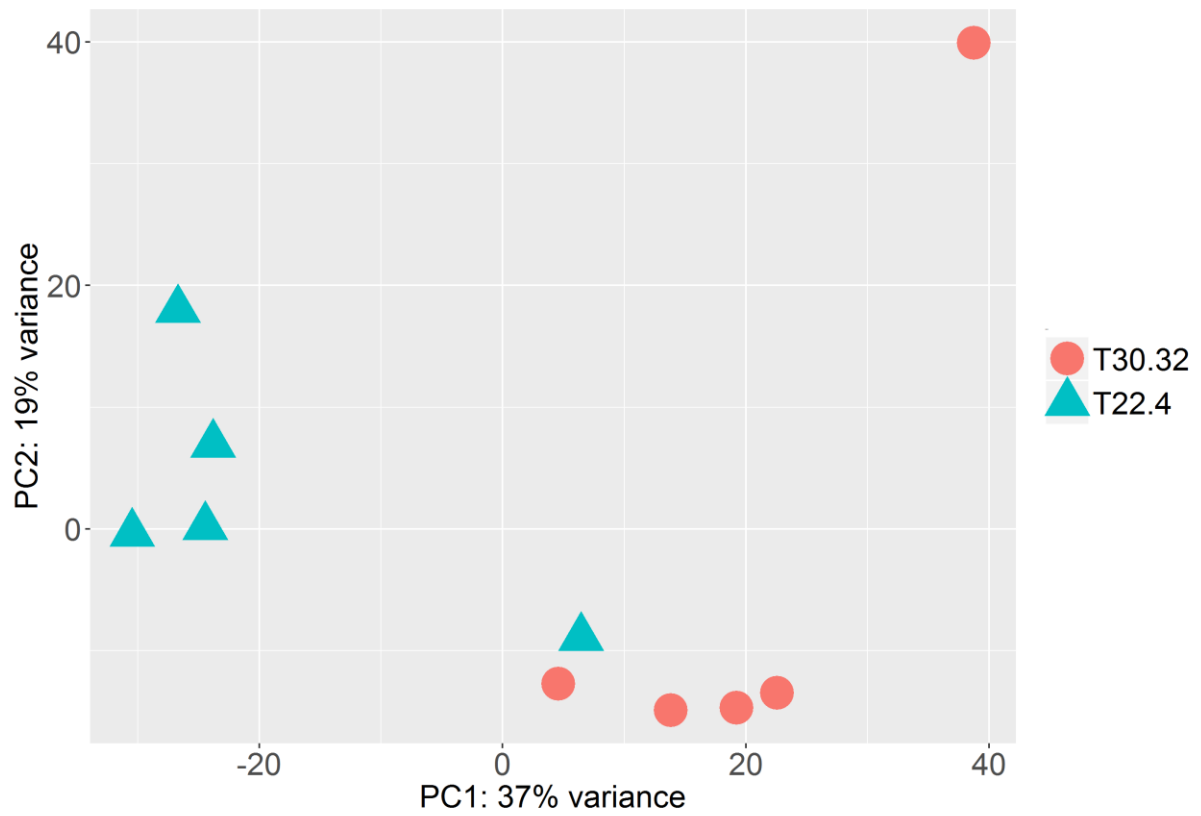


Figure 2. Principal components analysis of variance stabilizing transformed gene expression values for the 500 most variable genes in Oreonil1.0 dataset.

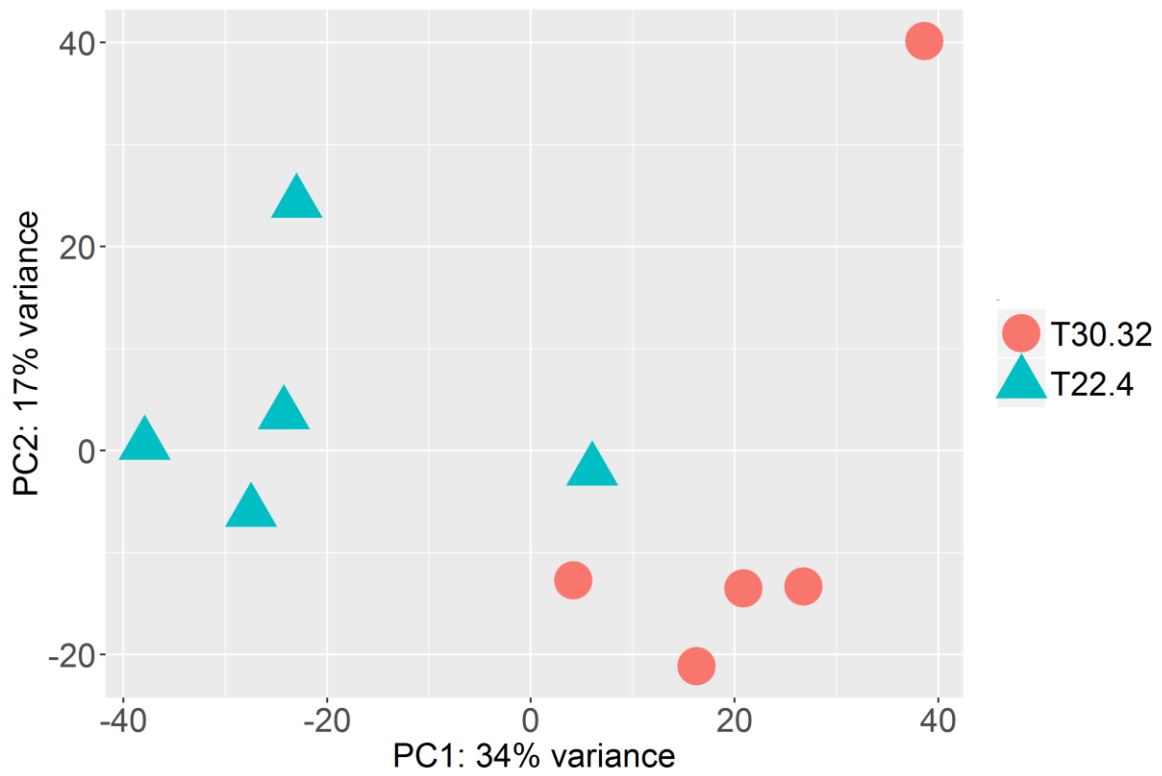


Figure 3. Principal components analysis of variance stabilizing transformed gene expression values for the 500 most variable genes in ASM185804v2 dataset

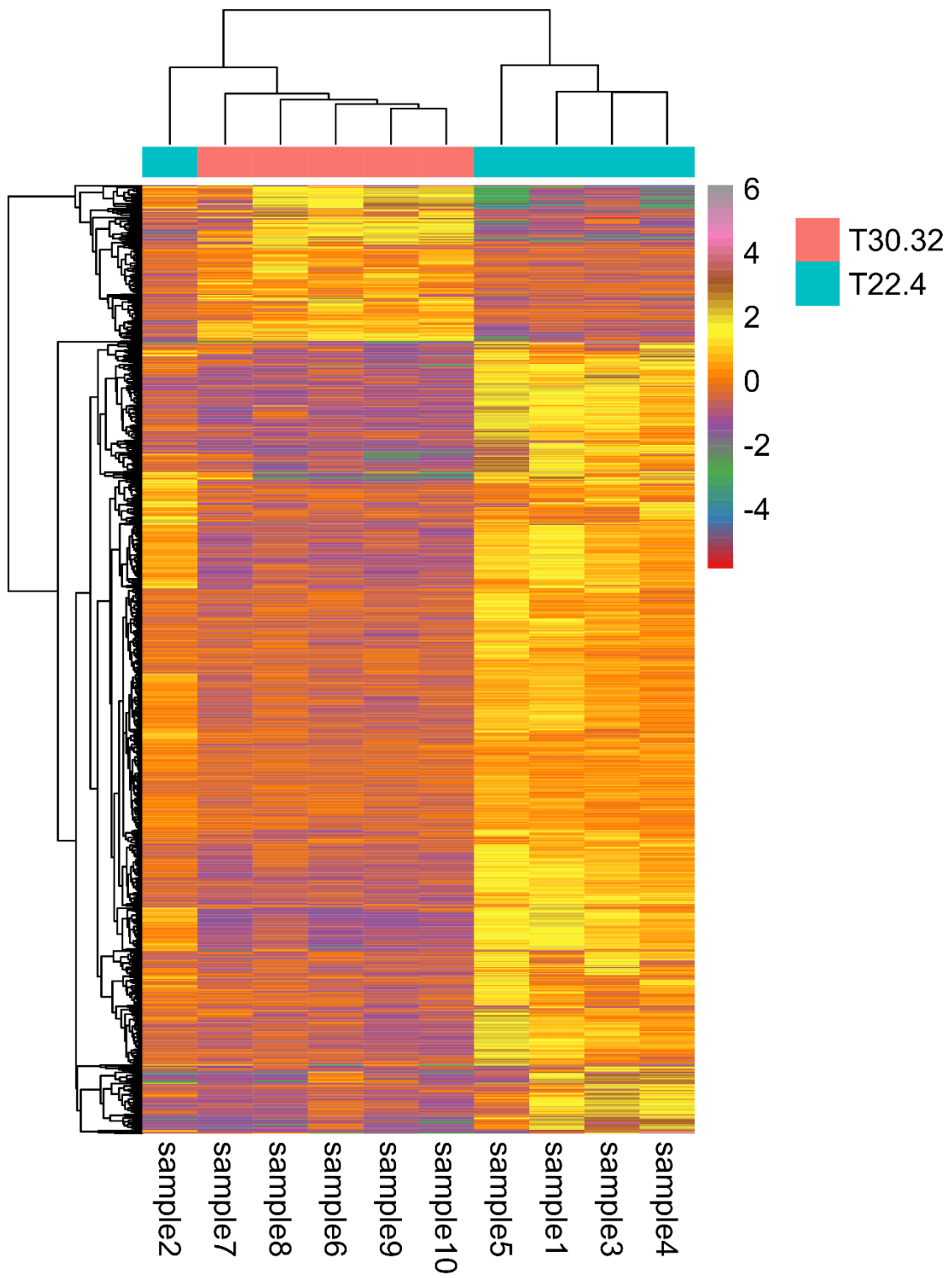


Figure 4. Hierarchical clustering and heat map of DEGs with a fold change ≥ 2.0 with the variance stabilizing transformation in Oreonil1.0 dataset

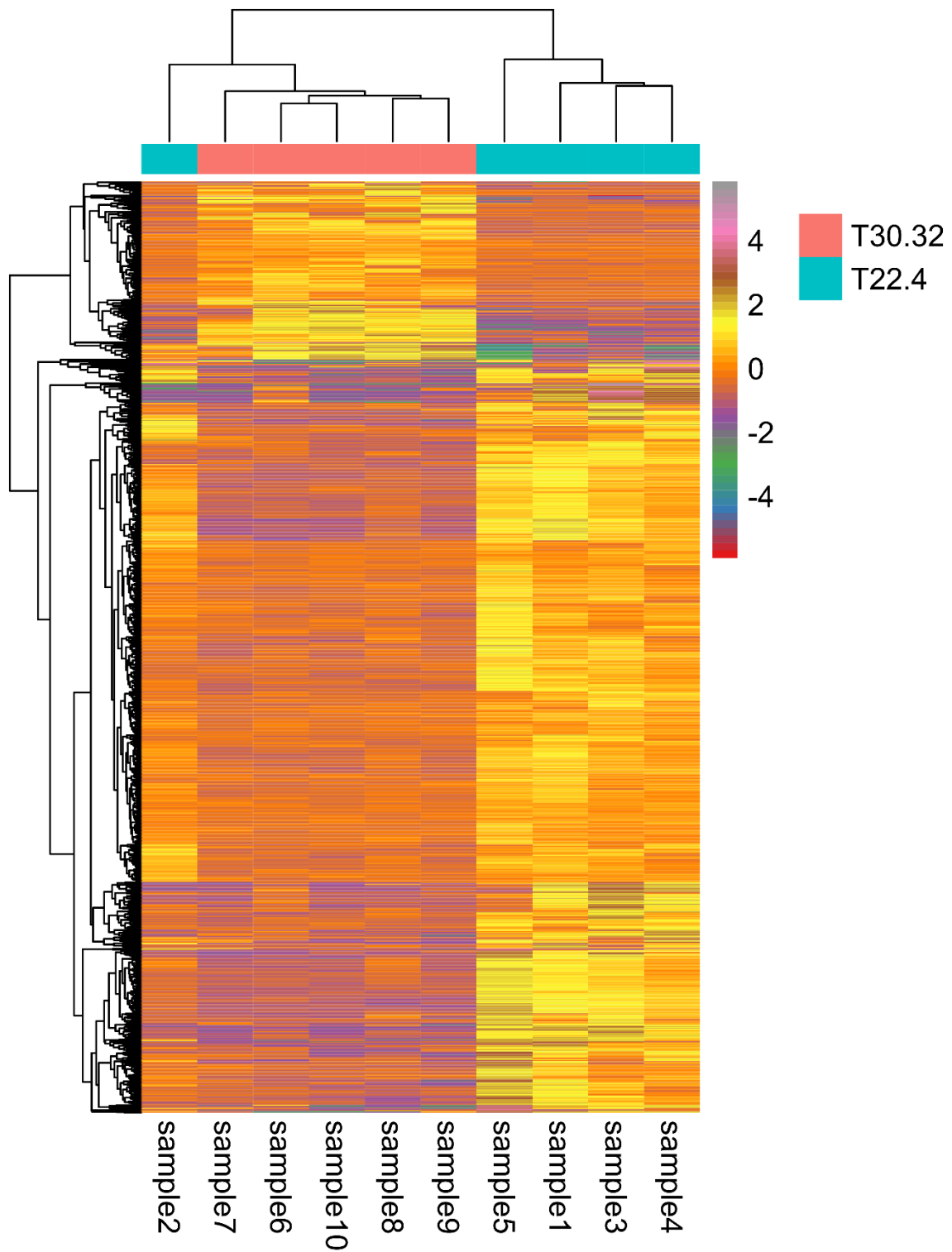


Figure 5. Hierarchical clustering and heat map of DEGs with a fold change ≥ 2.0 with the variance stabilizing transformation in ASM185804v2 dataset

Conclusiones generales

Objetivo general. Describir la diversidad genética, fenotípica, productiva y la respuesta transcripcional a temperaturas subóptimas de la tilapia como información base para el establecimiento de una población sintética en un posible programa de selección de tilapia para el departamento de Antioquia.

En la presente tesis se pueden encontrar nuevos resultados respecto a la variación genética, fenotípica y productiva de las tilapias en el departamento de Antioquia. De igual manera, esta tesis muestra avances en la comprensión de la expresión génica de la exposición a temperatura subóptima en tilapia nilótica. En general, estos hallazgos sugieren que la variación identificada molecular y fenotípicamente puede ser utilizada para el establecimiento de una población sintética en un posible programa de selección en tilapia para el departamento de Antioquia con énfasis en un mejor entendimiento de los cambios transcripcionales a temperaturas subóptimas del agua como las que se presentan en zona de montaña en este departamento. Es importante realizar cruzamientos y pruebas de progenie con las poblaciones caracterizadas en el presente estudio, así como evaluar a escala de todo el genoma, los marcadores y genes asociados con la variación del crecimiento en temperatura sub-óptima en tilapia.

Objetivo específico 1. Analizar la estructura y diversidad genética de reproductores de tilapia en el departamento de Antioquia mediante loci microsatélites.

Las cuatro poblaciones de tilapia analizadas en el presente estudio mediante diez loci microsatélites, mostraron una diversidad genética media a alta (medida por la heterocigosidad esperada y observada, así como por el número de alelos y número efectivo de alelos). Sin embargo, en la población nilótica se encontró una heterocigosidad esperada menor a los grupos de reproductores rojos. Según los resultados del índice de fijación, las distancias de Nei, los análisis de número de grupos y de la varianza molecular, las tres poblaciones de reproductores rojos se pueden considerar un solo grupo genético separado de la población nilótica. Los resultados obtenidos en la presente investigación proporcionan una base para el manejo genético de las poblaciones de reproductores de tilapia en Antioquia y para el desarrollo de una población sintética en un potencial programa de cría selectiva

que incorpore la medición de la diversidad genética mediante marcadores moleculares potencialmente neutros.

Objetivo específico 2. Identificar molecularmente las especies de tilapia que se encuentran en estado feral en algunos embalses del departamento de Antioquia a partir de un fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I.

El uso del código de barras de ADN a partir de un fragmento del gen Citocromo Oxidasa I (COI) en la identificación de individuos ferales de tilapia en los embalses Peñol-Guatapé, Playas, San Lorenzo, Punchiná, Porce II y Porce III en el departamento de Antioquia, reveló la presencia de cinco haplotipos diferentes: *Oreochromis urolepis*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* y *Coptodon rendalli*. En el embalse Peñol-Guatapé, se registraron cuatro de estos cinco haplotipos. Morfológicamente, las tilapias capturadas en los embalses se identificaron como *Oreochromis niloticus* (agrupando individuos con haplotipos *O. niloticus*, *O. aureus* y *O. urolepis*), *Oreochromis mossambicus* (sólo haplotipos *O. mossambicus*) y *Coptodon rendalli* (sólo haplotipos de *C. rendalli*). No fue posible identificar según los caracteres diagnósticos morfológicos ningún individuo como *O. aureus* ni como *O. urolepis*. Esta riqueza de especies e híbridos interespecíficos con introgresión del género *Oreochromis* en estado feral, se puede utilizar para el desarrollo de una población sintética en un potencial programa de cría selectiva en el departamento de Antioquia, realizando pruebas de desempeño de diferentes cruces bajo diferentes condiciones de cultivo en el departamento.

Objetivo específico 3. Caracterizar y comparar la forma del cuerpo de las tilapias cultivadas en diferentes granjas del departamento de Antioquia mediante morfometría geométrica.

En el presente estudio, se evidenció mediante el uso de morfometría geométrica que las tilapias nilóticas fueron más alargadas y tuvieron una posición más ventral del extremo posterior de la órbita y de la inserción de la aleta pectoral que las tilapias rojas. Además, el grupo nilótico mostró un espacio más corto entre el perfil de la boca y el extremo posterior de la órbita, en comparación con los grupos rojos. Por otro lado, los individuos de la granja roja 2 fueron de cuerpo más profundo y presentaron una cabeza más pequeña en comparación con las tilapias de la granja roja 1. Nuestro análisis ejemplifica como se puede incorporar la morfometría

geométrica en el análisis de la variación fenotípica de las tilapias provenientes de diferentes granjas. Es necesario realizar experimentos con hermanos completos expuestos a diferentes condiciones ambientales para entender los efectos genéticos, ambientales y su interacción en la forma del cuerpo de las tilapias rojas y nilóticas. Por otro lado, es necesario establecer las preferencias del consumidor respecto la forma del cuerpo y como la variabilidad de la forma afecta los parámetros productivos en tilapia roja y nilótica para incluir la evaluación mediante morfometría geométrica en un potencial programa de cría selectiva.

Objetivo específico 4. Comparar el desempeño productivo de diferentes semillas comerciales de tilapia producidas en el departamento de Antioquia bajo condiciones constantes y variables de temperatura

Bajo condiciones constantes subóptimas de temperatura (22.65 ± 0.74 °C) existieron diferencias en la sobrevivencia y tasa específica de crecimiento (TEC) entre tres procedencias de Tilapia producidas en el departamento de Antioquia. En condiciones de cultivo en montaña de pequeños productores donde se registraron variaciones cíclicas de la temperatura y otros parámetros ambientales, existieron diferencias en la TEC de algunas procedencias. En estas condiciones, se registraron bajas sobrevivencias, un amplio rango de costo del alimento por Kg de biomasa ganada y limitaciones de oxígeno en el agua. El presente estudio muestra la variación en el desempeño productivo entre diferentes semillas comerciales de tilapia producidas en el departamento de Antioquia bajo condiciones constantes y variables de temperatura. Esta variación puede ser aprovechada para un programa de cría selectiva en tilapia en temperatura subóptima. Sin embargo, los resultados del presente estudio provienen de mediciones de individuos comerciales, que son el producto de cruzamientos entre diferentes grupos de reproductores en las granjas orígenes. Es importante realizar experimentos con la conformación de familias y realizando cruces dialélicos con evaluación de un número apropiado de individuos medio hermanos y hermanos completos con marcación individual, para estimar parámetros y correlaciones genéticas de la tilapia en las condiciones de montaña de pequeños productores. Adicionalmente, es necesario evaluar la técnica básica de cultivo con los pequeños piscicultores para mejorar su productividad.

Objetivo específico 5. Identificar genes expresados diferencialmente en tilapia bajo condiciones subóptimas de temperatura mediante el análisis del transcriptoma completo

En la presente investigación, el número de genes expresados diferencialmente en el hígado de *Oreochromis niloticus* expuestos a temperatura subóptima de 22.40 ± 1.76 °C comparado con el grupo control a 30.32 ± 1.02 °C durante 13 días fue diferente según el transcriptoma de referencia utilizado. De esta manera, se identificaron 973 (813 sobre-expresados y 160 infra-expresados) y 1,554 (1,257 sobre-expresados y 297 infra-expresados) genes expresados diferencialmente a temperatura subóptima mediante los transcriptomas de referencia Oreonil1.0 y ASM185804v2 respectivamente. Los resultados de gProfiler mostraron 351 (32,99%) y 1022 (65,76%) genes expresados diferencialmente sin función conocida en los conjuntos de datos Oreonil1.0 y ASM185804v2, respectivamente. Sin embargo, las anotaciones de cada transcriptoma de referencia mostraron 312 (32,06%) y 450 (28,96%) genes expresados diferencialmente sin función conocida en los conjuntos de datos Oreonil1.0 y ASM185804v2, respectivamente. Entre los 20 genes expresados diferencialmente más importantes según el nivel de cambios seis se encontraron sin función conocida en el conjunto de datos Oreonil1.0 y diez en ASM185804v2. Los términos de ontología génica de menor valor p de la lista de genes expresados diferencialmente suprarregulados fueron: ciclo celular, proceso del ciclo celular, ciclo celular mitótico y replicación del ADN dependiente del ADN. Por otro lado, los términos de ontología génica de menor valor p en la lista de genes expresados diferencialmente infra-expresados fueron: proceso biosintético de lípidos, proceso metabólico de compuestos hidroxil orgánicos, proceso biosintético de isoprenoides y proceso metabólico isoprenoide. Son necesarios estudios adicionales para validar (por ejemplo, mediante qPCR) los genes expresados diferencialmente identificados en el presente estudio en diferentes órganos, así como experimentos que permitan identificar genes asociados a la variación de la respuesta de la tilapia nilótica a temperaturas subóptimas crónicas (como por ejemplo, mediante el análisis de segregantes agrupados-BSA y QTL-seq).

Recomendaciones

Analizar la estructura y diversidad genética de reproductores de tilapia en el departamento de Antioquia mediante loci microsatélites.

Para facilitar el intercambio de información y la comparación más precisa entre poblaciones, es necesario establecer a nivel global y de manera conjunta con diferentes grupos de investigación, un panel de marcadores genéticos para analizar la diversidad en las tilapias que incluyan tanto marcadores evaluados como neutros como aquellos evidenciados como adaptativos. Se recomienda estandarizar una técnica entre laboratorios para disminuir el error entre los diferentes estudios. Para el caso de las granjas en el departamento de Antioquia, se recomienda buscar marcadores de resistencia a las temperaturas bajas para ser utilizados en el panel de evaluación de tilapia como marcadores adaptativos.

Es posible que, en los próximos años se comercialice un chip de alta densidad de polimorfismos de un solo nucleótido para el genoma completo de la tilapia o que gracias a los avances de las técnicas de secuenciación de alto rendimiento se puedan realizar re-secuenciaciones masivas que cubran la mayoría del genoma y que sean de bajo costo y aplicables a estudios de genética de poblaciones, estudio de asociación del genoma completo, y mapas de ligamiento de mayor precisión. Por lo cual, se recomienda realizar estudios de genética poblacional a nivel de genoma completo en las tilapias del departamento de Antioquia.

Identificar molecularmente las especies de tilapia que se encuentran en estado feral en algunos embalses del departamento de Antioquia a partir de un fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I.

Los resultados de la riqueza de especies de *Oreochromis* ferales en los embalses de Antioquia, pueden ser utilizados en el establecimiento de una población sintética. Por esto se recomienda, evaluar las progenies de cruces dialélicos en las condiciones de pequeños productores en zona de montaña como se muestra en la tabla 1. Incluso para la selección de tilapia roja sin mancha se pueden evaluar estos cruces con el uso posterior de retrocruzamientos y/o introgresión.

Es posible que las técnicas de secuenciación de alto rendimiento presenten una disminución de costo considerable en los próximos años. Se recomienda realizar

estudios de código de barras de múltiples locus o de secuenciación de fragmentos informativos taxonómicamente distribuidos por los genomas mitocondrial y nuclear para la identificación de poblaciones ferales de tilapia en el departamento de Antioquia.

Por otro lado, las poblaciones ferales de tilapias del departamento de Antioquia representan una oportunidad para el estudio de las señales de selección que ocurren en periodos cortos a nivel de genoma completo (tanto nuclear como mitocondrial) en distintas poblaciones fundadoras en cuerpos de agua con flujo génico interrumpido.

Caracterizar y comparar la forma del cuerpo de las tilapias cultivadas en diferentes granjas del departamento de Antioquia mediante morfometría geométrica.

Es necesario establecer la preferencia de los consumidores por la forma del cuerpo de la tilapia. Adicionalmente, es importante aclarar la influencia de los factores genéticos y ambientales en la forma del cuerpo de la tilapia. Se recomienda realizar estudios de asociación del genoma completo para identificar QTLs para la forma del cuerpo en la tilapia.

Comparar el desempeño productivo de diferentes semillas comerciales de tilapia producidas en el departamento de Antioquia bajo condiciones constantes y variables de temperatura

Los resultados mostraron que la técnica de producción básica de los pequeños piscicultores no es óptima. Las variaciones de las características ambientales (particularmente de temperatura y oxígeno disuelto) así como la alta variabilidad de respuestas productivas entre diferentes semillas en una misma granja y entre piscicultores de una misma zona sugieren realizar un análisis profundo de estas producciones. En los últimos años, diferentes programas del estado han apoyado con insumos, equipos y capacitación a una parte importante de los piscicultores que participaron en el presente estudio. Sin embargo, es necesario realizar una evaluación del efecto real de este tipo de apoyos, particularmente de la capacitación, en el aumento de la producción por área o en la disminución de los costos de producción. Elementos fundamentales de la producción animal como son la toma y análisis de datos siguen sin ser implementados por los piscicultores por lo

cual no fue posible realizar una comparación de los datos obtenidos en el presente estudio con aquellos obtenidos en ciclos de producción anteriores.

Es fundamental preguntarse ¿Qué tanto están participando los pequeños piscicultores en la elaboración de los programas estatales que los están beneficiando? puesto que un programa de selección cuyos objetivos no se construyan de forma participativa posiblemente fracasará. Adicionalmente, las preferencias del segmento del mercado al cual se están dirigiendo los peces cultivados por pequeños piscicultores en zona de montaña no han sido estudiados detenidamente. ¿Necesita el piscicultor de zona de montaña una semilla de tilapia roja sin manchas con una conformación corporal particular cuando su producto se está dirigiendo a la pesca deportiva? ¿Qué tanto le preocupan las manchas o la conformación corporal a un pescador deportivo en un pesque y pague del oriente de Antioquia? Estas preguntas son fundamentales puesto que el crecimiento, conversión, sobrevivencia y beneficio económico se ven afectados al usar tilapia roja, manchada o nilótica.

Identificar genes expresados diferencialmente en tilapia bajo condiciones subóptimas de temperatura mediante el análisis del transcriptoma completo

Se recomienda validar (por ejemplo, mediante qPCR) los genes expresados diferencialmente con mayor nivel de cambio y menor valor de p corregido en diferentes órganos de tilapia nilótica expuesta a temperaturas subóptimas por tiempo prolongado.

Por otro lado, una aproximación a la identificación de marcadores para selección de individuos de mejor crecimiento en tilapia en condiciones subóptimas de temperatura es mediante el análisis de segregantes agrupados. A partir de las pruebas de comportamiento a temperaturas subóptimas de los cruces sugeridos (tabla 1), es posible obtener individuos hermanos completos que muestren alto o bajo crecimiento y alta o baja conversión alimenticia en esta condición. Posteriormente, mediante resecuenciación del genoma completo, análisis de expresión diferencial, uso de QTL-seq y análisis basado en ligamiento, se pueden identificar regiones del genoma asociadas con mejor crecimiento y conversión alimenticia, así como un mejor entendimiento de la arquitectura genética relacionada con estas características. Es importante evaluar como la selección de individuos

mediante los marcadores identificados a partir de QTL-seq cambian los parámetros productivos de las granjas respecto a la población base en diferentes generaciones

Tabla 1. Cruces dialélicos sugeridos

		♀																	
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
♂	A	A	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR
	B	BA	B	BC	BD	BE	BF	BG	BH	BI	BJ	BK	BL	BM	BN	BO	BP	BQ	BR
	C	CA	CB	C	CD	CE	CF	CG	CH	CI	CJ	CK	CL	CM	CN	CO	CP	CQ	CR
	D	DA	DB	DC	D	DE	DF	DG	DH	DI	DJ	DK	DL	DM	DN	DO	DP	DQ	DR
	E	EA	EB	EC	ED	E	EF	EG	EH	EI	EJ	EK	EL	EM	EN	EO	EP	EQ	ER
	F	FA	FB	FC	FD	FE	F	FG	FH	FI	FJ	FK	FL	FM	FN	FO	FP	FQ	FR
	G	GA	GB	GC	GD	GE	GF	G	GH	GI	GJ	GK	GL	GM	GN	GO	GP	GQ	GR
	H	HA	HB	HC	HD	HE	HF	HG	H	HI	HJ	HK	HL	HM	HN	HO	HP	HQ	HR
	I	IA	IB	IC	ID	IE	IF	IG	IH	I	IJ	IK	IL	IM	IN	IO	IP	IQ	IR
	J	JA	JB	JC	JD	JE	JF	JG	JH	JI	J	JK	JL	JM	JN	JO	JP	JQ	JR
	K	KA	KB	KC	KD	KE	KF	KG	KH	KI	KJ	K	KL	KM	KN	KO	KP	KQ	KR
	L	LA	LB	LC	LD	LE	LF	LG	LH	LI	LJ	LK	L	LM	LN	LO	LP	LQ	LR
	M	MA	MB	MC	MD	ME	MF	MG	MH	MI	MJ	MK	ML	M	MN	MO	MP	MQ	MR
	N	NA	NB	NC	ND	NE	NF	NG	NH	NI	NJ	NK	NL	NM	N	NO	NP	NQ	NR
	O	OA	OB	OC	OD	OE	OF	OG	OH	OI	OJ	OK	OL	OM	ON	O	OP	OQ	OR
	P	PA	PB	PC	PD	PE	PF	PG	PH	PI	PJ	PK	PL	PM	PN	PO	P	PQ	PR
	Q	QA	QB	QC	QD	QE	QF	QG	QH	QI	QJ	QK	QL	QM	QN	QO	QP	Q	QR
	R	RA	RB	RC	RD	RE	RF	RG	RH	RI	RJ	RK	RL	RM	RN	RO	RP	RQ	R

A. *Oreochromis urolepis* Peñol-Guatapé, B. *Oreochromis urolepis* Punchiná, C. *Oreochromis mossambicus* Porce II, D. *Oreochromis mossambicus* Porce III, E. *Oreochromis niloticus* Peñol-Guatapé, F. *Oreochromis aureus* Playas. G. *Oreochromis aureus* Peñol-Guatapé, H. *Oreochromis aureus* Porce II, I. *Oreochromis aureus* Porce III, J. *Oreochromis aureus* Punchiná, K. Roja San José del Nus, L. Roja Gaitero, M. Roja Politécnico, N. Nilótica Rosario, O. Llanos 1, P. Llanos 2, Q. Huila 1, R. Huila 2.

Anexos

Anexo 1. Archivos suplementarios del capítulo 5.

Supplementary file 1 DEGs Oreonil1.csv

Supplementary file 2 DEGs ASM185804v2.csv

Supplementary file 3 gProfiler complete Oreonil1.xlsx

Supplementary file 4 gProfiler complete ASM185804v2.xlsx

Supplementary file 5 gProfiler upregulated Oreonil1.xlsx

Supplementary file 6 gProfiler upregulated ASM185804v2.xlsx

Supplementary file 7 gProfiler downregulated Oreonil1.xlsx

Supplementary file 8 gProfiler downregulated ASM185804v2.xlsx