

# CARACTERIZACIÓN DEL FONDO GENÉTICO DE LA LÍNEA DE SUPERTILAPIAS IG/03-F70. I. CARACTERES MORFOMÉTRICOS, MERÍSTICOS Y ANÁLISIS DE ADN

Reynold Morales,<sup>1</sup> Amílcar Arenal,<sup>2</sup> Rafael Pimentel,<sup>2</sup> Irian Mendoza,<sup>2</sup> Asterio Cruz,<sup>3</sup> Rebeca Martínez,<sup>1</sup> Fidel Herrera,<sup>1</sup> Leopoldo Tápanes,<sup>4</sup> Mario P Estrada<sup>1</sup> y José de la Fuente<sup>1</sup>

<sup>1</sup>División de Genética de Células de Mamíferos. <sup>3</sup>División de Control de la Calidad. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162, Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 387, Camagüey-1, Cuba.

<sup>4</sup>Estación Acuadique, La Habana, Cuba.

## ABSTRACT

Morphological, meristic and DNA differences have been established in the characterization of various strains of tilapia (*Oreochromis* spp). The present study shows the characterization of the transgenic line of supertilapia IG/03-F70. Morphological and meristic data show a high correlation with the tilapia *Oreochromis hornorum*. The chromosomal number and DNA satellite analysis support the hypothesis that the parents of supertilapias IG/03-F70 progenitors are hybrids of an unknown origin with a high percentage of *O. hornorum*.

Key words: tilapia, biometry, chromosome, DNA satellite

*Biotecnología Aplicada* 1998;15:15-21

## RESUMEN

En la caracterización de varias especies de tilapias *Oreochromis* spp han sido establecidas sus características morfológicas, merísticas y a nivel de ADN. En el presente estudio se muestra la caracterización de la línea supertilapias IG/03-F70. Los datos morfológicos y merísticos obtenidos de la línea estudiada muestran una gran similitud con la especie *Oreochromis hornorum*. Los resultados del conteo de cromosomas y el análisis del ADN satélite de la línea IG/03-F70, apoyan la hipótesis de que los progenitores de esta línea son híbridos de origen desconocido con un alto por ciento de *O. hornorum*.

Palabras claves: tilapia, biometría, cromosoma, ADN satélite

## Introducción

La tilapia pertenece a la familia de los cíclidos y constituye un grupo amplio de peces endémicos de África, donde su origen se remonta a varios millones de años (1).

El interés por la ecología y la sistemática de este grupo de peces data de principios de este siglo y con el tiempo se ha incrementado su estudio por la importancia que tiene esta especie para la acuicultura en zonas tropicales (2). Basándose en los hábitos reproductivos y alimenticios de estas especies, se han clasificado en dos géneros: *Tilapia* y *Sarotherodon* (3). En 1982, basado en los estudios sobre sus hábitos reproductivos y en la forma de incubar los huevos, se decide separar a las tilapias en 4 géneros: *Tilapia*, *Sarotherodon*, *Oreochromis* y *Danakilia* (4). En 1983, Trewavas y colaboradores separan a las tilapias en 6 géneros, tomando en consideración la dentición, así como sus hábitos reproductivos: *Tilapia*, *Tristamella*, *Danakilia*, *Sarotherodon*, *Oreochromis* y *Pelmatochromis* (5), este último es un cíclido menos especializado (6).

Entre los métodos utilizados para el estudio de individuos y poblaciones se encuentran el estudio de

los caracteres morfométricos y merísticos (1), los patrones isoenzimáticos (7, 8), así como el número y morfología de los cromosomas (2).

La labor taxonómica ha servido para corroborar estudios preliminares en la caracterización y diferenciación de especies de tilapia, así como para registrar nuevas especies endémicas (6).

Las técnicas de cariotipaje se han aplicado ampliamente en peces para determinar el sexo genético (9, 10), poliploidía (11-13), relación evolutiva entre especies cercanas (14), así como la ubicación en el genoma de una información genética determinada (10).

Existen otros métodos que se apoyan en el estudio del ADN, no sólo referente a su composición, sino también a su organización (15). Teniendo en cuenta que en cada individuo el ADN es diferente en estos dos aspectos, hay rasgos comunes entre individuos de una misma especie y familia que los identifican como miembros de éstas (16, 17).

El estudio de las huellas digitales del ADN ha probado ser una herramienta extremadamente poderosa en la identificación de individuos y *pedigrees* (18) en el estudio de líneas ginogenéticas y de la

1. Gourene G, Teugles G. Différenciation morphologique de souches des tilapias *Oreochromis niloticus* et *O. aureus* (Teleostei: Cichlidae) utilisées en pisciculture. *Cybiurn* 1993;17(4):343-355.

2. Majumdar KC, McAndrew BJ. Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera: *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* of the tribe Tilapiini (Pisces, Cichlidae). *Genetica* 1986;68:175-188.

3. Trewavas E. On the cichlid fishes of the genus *Pelmatochromis* with proposal of a new genus for *P. congicus* on the relationship between *Pelmatochromis* and *Tilapia* and recognition of *Sarotherodon* as a distinct genus. *Bull Brit Mus Natur Hist Zool* 1973;25:1-26.

4. Trewavas E. Generic grouping of Tilapiini used in aquaculture. *Aquaculture* 1982;27:79-81.

5. Trewavas E. Tilapiine fishes of genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. 1983;583 pp. British Museum Natural History, London.

6. Morales A. La tilapia en México. Biología, cultivos y pesquerías. ACT Editor S.A. 1991;3, 15.

✉ Autor de correspondencia

transmisión paterna de algunos fragmentos de ADN durante la generación de diploides ginogenéticos (19). Otros laboratorios han utilizado determinados marcadores de ADN nuclear en estudios filogenéticos, identificación de cepas híbridas y para el manejo acuícola de estos peces (17).

Con este trabajo nos propusimos hacer una caracterización de la línea de supertilapias IG/03-F70. Esta línea se formó a partir de tilapias transgénicas que portan una copia adicional del gen que codifica la hormona de crecimiento de tilapia, lo cual se mostró fenotípicamente con un crecimiento acelerado (20-22). A partir del estudio de los caracteres merísticos, morfométricos, preparaciones cromosómicas y el análisis de ADN satélite de animales de varias generaciones de peces de esta línea transgénica, se estableció con qué especie de tilapia presenta mayor similitud, y se conoció que sus progenitores son de origen híbrido desconocido. Los resultados indicaron que el híbrido utilizado para la obtención de tilapias transgénicas a partir de las cuales se generó la línea de supertilapias IG/03-F70, es mayoritariamente *Oreochromis hornorum*.

## Materiales y Métodos

### Caracteres morfométricos y merísticos

Este trabajo se realizó con larvas y juveniles de la línea de supertilapias IG/03-F70, capturadas al azar en la estación experimental de Guanímar, provincia La Habana, en las cuales no se consideró el sexo. Los individuos se agruparon según su peso corporal, y se constituyeron 4 grupos de animales (Tabla 1).

Para realizar las mediciones y los conteos se utilizó una balanza, un ictiómetro y, en algunos casos, fue necesario emplear un microscopio estereoscópico con ocular micrométrico.

### Características merísticas analizadas

*Número de escamas en una serie longitudinal.* Son las que se pueden contar desde el borde posterior del opérculo hasta el pliegue vertical de articulación en la base de la aleta caudal.

*Conteo de rayos y radios de las aletas.* El tronco y la cola presentan las aletas pares (pectorales y ven-

7. McAndrew BJ, Majumdar KC. Evolutionary relationship within three tilapia genera (Pisces: Cichlidae). Zool J Linn Soc 1984;80:421-435.

8. Sodusk P, McAndrew BJ. Molecular systematic of three tilapia genera: *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. J Fish Biol 1991; 39(SA):301-308.

9. Carbone P, Vitturi R, Catalano E, Macaluso M. Chromosome sex and Y-autosome fusion in *Blennius tentacularis* Brunnich, 1765 (Pisces: Blenniidae). J Fish Biol 1987;31:597-602.

10. Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schröder JH, Zischler H, Epplen T. Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the Guppy fish. J Mol Evol 1990;30:456-462.

11. Chourrout D, Itskovich J. Three manipulations permitted by artificial insemination in tilapia: induced diploid gynogenesis, production of all triploid populations and intergeneric hybridization. In: Fishelson L, Yaron Z, eds. International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Tel Aviv University 1983; 246-55.

Tabla 1. Variabilidad de las características estudiadas por grupo de peces.

Características	Coeficientes de variación (%) <sup>a</sup>					Variabilidad <sup>b</sup>
	Grupo 1 <sup>c</sup>	Grupo 2 <sup>c</sup>	Grupo 3 <sup>c</sup>	Grupo 4 <sup>c</sup>	Media	
Peso (g)	32,89	16,41	12,82	11,85	18,49	III
Longitud total (mm)	9,31	5,37	5,55	4,41	6,16	II
Longitud estándar (mm)	10,78	5,73	5,18	3,71	6,35	II
Longitud cabeza (mm)	11,77	15,11	7,49	10,91	11,32	III
Longitud preorbital (mm)	9,98	9,13	12,23	20,00	12,84	III
Longitud predorsal (mm)	8,86	6,34	9,22	8,64	8,27	II
Longitud preventral (mm)	10,67	4,87	6,44	7,37	7,34	II
Longitud preanal (mm)	11,75	6,10	3,85	3,55	6,31	II
Base aleta dorsal (mm)	11,95	8,32	7,74	2,04	7,51	II
Base aleta anal (mm)	16,87	13,13	15,92	8,76	13,67	III
Longitud aleta pectoral (mm)	18,44	9,78	2,80	7,88	9,72	II
Altura máxima del cuerpo (mm)	10,01	5,58	4,66	6,04	6,57	II
Rayos aleta dorsal	3,11	2,53	5,18	4,35	3,79	I
Radios aleta dorsal	7,59	4,08	11,19	3,97	6,71	II
Radios aleta caudal	5,02	0,00	5,00	5,58	3,90	I
Rayos aleta anal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	I
Radios aleta anal	7,00	0,00	5,38	0,00	3,09	I
Rayos aleta ventral	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	I
Radios aleta ventral	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	I
Radios aleta pectoral	3,42	3,87	3,87	3,42	3,64	I
Escamas en una serie longitudinal	3,32	3,37	2,38	0,00	2,27	I
Branquispinas en el primer arco branquial	4,32	4,56	4,55	0,00	3,36	I
Longitud del hueso faríngeo inferior (mm)	5,09	2,08	7,20	14,82	7,30	II
Número de vértebras	2,54	2,75	3,03	3,32	2,91	I

<sup>a</sup>: Desviación estándar/media x 100; <sup>b</sup>: los caracteres biométricos se clasificaron en 3 grupos atendiendo al coeficiente de variación. 1) de 1 a 5: poco variable, 2) entre 5 y 10: variable y 3) mayor de 10: muy variable; <sup>c</sup>: los individuos se agruparon según su peso corporal. Grupo 1: entre 1 y 5 g, N = 7; Grupo 2: entre 5,1 y 20,9 g, N = 6; Grupo 3: entre 21 y 30,9 g, N = 8 y Grupo 4: mayores de 31 g, N = 7.

trales) e impares (dorsal, anal y caudal). Las aletas pueden estar formadas por espinas, elementos de sostén rígidos y puntiagudos, no ramificados y por radios, elementos de sostén también, pero de consistencia blanda y ramificados, o por ambos a la vez.

**Número de branquiaspinas en el primer arco branquial inferior.** Se realiza en el primer arco branquial y, en nuestro caso, en el limbo inferior solamente. La unión de los limbos se puede hallar en un punto de división, y si una branquiaspina se encuentra entre ambos ángulos del arco, ésta se incluye generalmente en el conteo del limbo inferior, así como todas las branquiaspinas rudimentarias en el final anterior.

**Número de vértebras.** Para realizar el conteo fue necesario sacrificar el animal, hervirlo y proceder a la disección de sus tejidos; de este modo quedaron expuestas las vértebras.

#### Medidas morfométricas analizadas (Figura 1)

- Peso en gramos (la pesada se realizó con los animales vivos)
- Longitud total
- Longitud estándar
- Longitud de la cabeza
- Longitud preorbital
- Longitud predorsal
- Longitud preventral
- Longitud preanal
- Longitud de la aleta pectoral
- Longitud del hueso faringeo inferior
- Altura máxima del cuerpo
- Base de la aleta dorsal
- Base de la aleta anal

Las mediciones se realizaron sobre el pez fresco y mojado, o sea, lo más aproximado posible a la condición del pez vivo y relajado.

#### Análisis estadístico

El procesamiento estadístico se realizó en hojas de trabajo de Excel (*Microsoft Excel for Windows 95*, versión 7.0). Antes del procesamiento estadístico de los datos se comprobó la homogeneidad de varianzas y la normalidad. Las relaciones entre los parámetros en los grupos de peces fueron contrastadas mediante un análisis de varianzas de una vía y se realizó la prueba de Duncan para los casos en que dio significación.

#### Obtención de tejidos en división celular

Para realizar este trabajo se emplearon tilapias adultas de la línea de supertilapias IG/03-F70, a las que se les realizó un corte transversal en la parte posterior de la aleta caudal. Al cabo de los 3-7 días la porción regenerada del tejido de la aleta, de aproximadamente 2 mm, fue utilizada para la preparación cromosómica.

#### Preparación de metafases y conteo de cromosomas

Se realizaron modificaciones a la técnica descrita por Chourrout e Itskovich (11) para larvas de tilapias. Una vez cortado el fragmento de aleta regenerado, se colocó en una placa Petri de 60 mm de diámetro, a la cual se le añadió colchicina (SIGMA) al 0,002 %, y se incubaron a 28 °C entre 4 a 6 h. Posteriormente, se le dio un *shock* hipotónico con agua destilada durante 90 min. Después se fijó con metanol - ácido acético (3:1). Se realizaron 4 fijaciones, cada una de 20 min. Una vez eliminado el exceso de fijador, se colocó la muestra en un portaobjetos excavado, se le adicionaron 2 o 3 gotas de ácido acético al 60 %, en presencia del cual se trituró el tejido por 1 min, y se dejó reposar 20 min. Transcurrido ese tiempo, se dejaron caer 2 gotas de este preparado con una pipeta

12. Chourrout D. Induction of gynogenesis, triploidy, and tetraploidy in fish. ISI ATLAS of Science: Animal and Plant Science 1988;65-70.

13. Varadaraj K, Pandian TJ. Production of all female-sterile-triploid *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 1990; 84:1;7-123.

14. Ráb P, Roth P, Mayr B. Karyotype study of eight species of European Percid fishes (Pisces: Percidae). *Caryologia* 1987;40(4):307-318.

15. Turner TF, Ahlquist JE, White MM, Kelsey R. Variation in genome organization and composition of repeated DNAs among three species of fish (Family: Percidae). *The Journal of Heredity* 1993; 84(1):70-73.

16. Franck JPC, Wright JM, McAndrew BJ. Genetic variability in a family of satellite DNAs from tilapia (Pisces: Cichlidae). *Genome* 1992;35:719-725.

17. Franck JPC, Wright JM. Conservation of a satellite DNA sequence (SATB) in the tilapiine and haplochromine genome (Pisces: Cichlidae). *Genome* 1993; 36:187-194.

18. Harris AS, Bieger S, Doyle RW, Wright JM. DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. *Aquaculture* 1991;92:157-163.

19. Carter RE, Mair GC, Skibinski DOF, Parkin DT, Beardmore JA. The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. *Aquaculture* 1991;95:41-52.

20. Martínez R, Estrada MP, Berlanga J, Guillén I, Hernández O, Cabrera E et al. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1996;5(1):62-70.

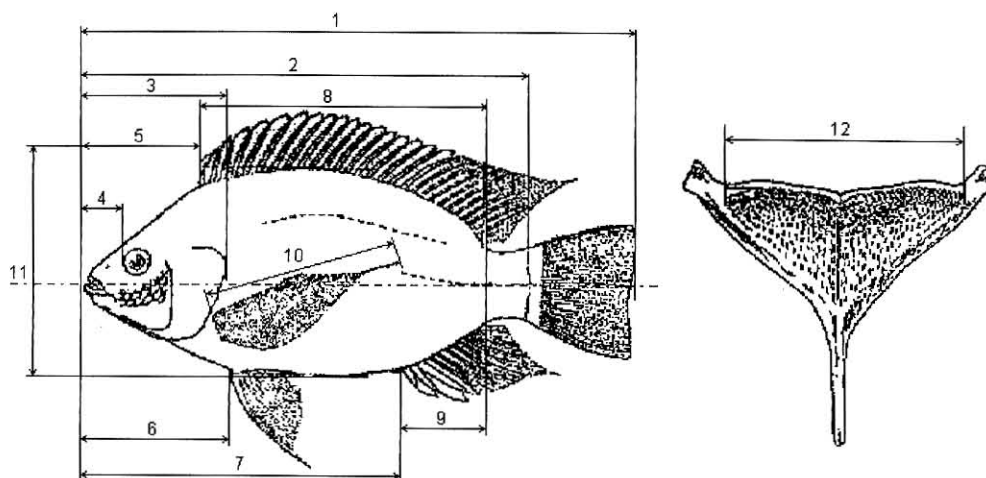


Figura 1. Caracteres merísticos y morfométricos analizadas.

Pasteur sobre un portaobjetos, previamente conservado en metanol al 50 % y secado a 50 °C. Ambas gotas se extendieron con la parte fina de la pipeta, el portaobjetos se puso sobre una plancha caliente durante un período corto de tiempo hasta que se evaporó el ácido acético. Antes de teñir la lámina, se dejó secar al aire durante 2 días.

La tinción se realizó con Giemsa (SIGMA) al 10 % en tampón fosfato 10 mM, pH 7, durante 8 min. Se lavó con agua destilada y se dejó secar al aire. Una vez secas las láminas, se observaron al microscopio óptico a un aumento de 100 X y los detalles se observaron a un aumento de 1 000 X con lente de inmersión en aceite. Durante la observación se prestó atención al número de cromosomas de cada metafase, así como a su morfología. Sólo se tuvieron en cuenta aquellas metafases en las cuales sus cromosomas se pudieron observar con nitidez. Se realizó el conteo de los cromosomas de 46 metafases.

#### Obtención y análisis del ADN satélite

Se seleccionaron 5 tilapias al azar dentro de una población de la línea de supertilapias IG/03-F70, sin tener en cuenta el sexo. Como fuente de ADN se tomó un fragmento con un peso de 30 mg de la aleta caudal, el cual fue digerido con Proteínasa K (100 µg/mL; Boehringer Mannheim) en tampón de lisis (Tris-HCl, 10 mM; SDS, 0, 5%; EDTA, 100 mM, pH 7, 5) durante 5 h a 55 °C. La muestra se trató sucesivamente con fenol, fenol: cloroformo y cloroformo. La fase acuosa se incubó 1 h a 55 °C para eliminar los restos de cloroformo; posteriormente se incubó 1 h a 37 °C con Ribonucleasa A (100 µg/mL; Boehringer Mannheim). Se aplicaron extracciones sucesivas de fenol: cloroformo y cloroformo, respectivamente. Finalmente, el ADN fue precipitado con 2 volúmenes de etanol en presencia de acetato de sodio 300 mM, lavado con etanol 70 % y resuspendido en 200 µL de agua destilada estéril.

Se tomaron 10 µg de ADN genómico de cada pez y la digestión se realizó con la enzima de restricción *EcoR* I (2 unidades/µg de ADN; New England Biolabs) por 3 h a 37 °C.

El ADN digerido con *EcoR* I se aplicó en un gel de agarosa de bajo punto de gelificación (LGT, SIGMA) al 0, 9 %, utilizando un marcador de peso molecular (pGEM<sup>®</sup>DNA Markers; Promega), que consiste en 15 fragmentos de ADN en un rango entre 36 y 2 645 pb. Se hizo una extracción fenólica de la zona del gel entre 200 y 350 pb y las bandas extraídas se resuspendieron en 10 µL de agua. De estas bandas, se tomaron 3 µL y se separaron a 10 v/cm durante 8 h en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones no desnaturizantes.

Una vez terminada la corrida, se tomó el gel adherido a uno de los cristales y se trató con ácido acético al 12 % durante 30 min, luego, 3 veces en agua desionizada durante 2 min, 30 min en solución de tinción (nitrito de plata 0,1 %; formaldehído 0,05 %

y 10 s en agua desionizada. Para el revelado, se mantuvo en solución de formaldehído 0,05 %; tiosulfato de sodio 2 µg/mL y carbonato de sodio 3 % hasta que aparecieron las bandas. Por último, se fijó en ácido acético 10 % y se secó en un horno de microondas a 250 °C por 7 min.

La talla de las bandas que se observaron en el gel se estimó mediante la interpolación de los valores de la distancia de migración de las bandas en cuestión en una curva obtenida ploteando el logaritmo decimal del peso molecular contra la distancia de migración de las bandas del patrón, tomando como 0 el punto de aplicación.

## Resultados y Discusión

### Caracteres morfométricos y merísticos

De acuerdo con el coeficiente de variación, las medidas muy variables fueron el peso, longitud de la cabeza, longitud preorbital y la base de la aleta anal (Tabla 1). Los parámetros variables fueron la longitud total, longitud estándar, longitud predorsal, longitud preventral, longitud preanal, base de la aleta dorsal, longitud de la aleta pectoral, altura máxima del cuerpo, radios de aleta dorsal y longitud del hueso faríngeo inferior (Tabla 1). Por último, fueron poco variables los radios de la aleta caudal, los rayos de la aleta dorsal, rayos y radios de la aleta anal, rayos y radios de la aleta ventral, radios de la aleta pectoral, escamas en una serie longitudinal, branquiaspinas en el primer arco branquial, así como el número de vértebras (Tabla 1). Resultados semejantes fueron obtenidos por Gourene y Teugels (1).

De las relaciones del cuerpo analizadas, las de longitud total/longitud estándar, longitud preanal/longitud estándar, longitud preventral/longitud estándar, base de la aleta dorsal/longitud estándar y la altura máxima del cuerpo/longitud estándar fueron poco variables (Tabla 2).

Se catalogaron como variables, las de longitud de la cabeza/longitud estándar, longitud preorbital/longitud estándar, longitud predorsal/longitud estándar, longitud de la aleta pectoral/longitud estándar y longitud del hueso faríngeo/longitud de la cabeza (Tabla 2).

Se consideraron parámetros muy variables la longitud preorbital/longitud de la cabeza y la base de aleta anal/longitud estándar (Tabla 2).

El análisis de varianza entre los 4 grupos de tilapias estudiados, respecto a las relaciones de parámetros (Tabla 2), muestra que varían significativamente las relaciones longitud total, longitud preorbital, longitud preanal y base de la aleta dorsal, referidas a la longitud estándar. Al contrastarlas con la prueba de Duncan, se observa que existen diferencias significativas entre algunos grupos (Tabla 3).

El conteo de los rayos y radios de las aleta dorsal, anal y ventral en la línea de supertilapias IG/03-F70 permitió calcular la relación rayo/radio de esta línea (Tabla 4), parámetro que juega un papel importante

21. De la Fuente JM, Martínez R, Estrada MP, Hernández O, Cabrera E., García del Barco D et al. Towards growth manipulation in tilapia (*Oreochromis sp.*): generation of transgenic tilapia with chimeric constructs containing the tilapia growth hormone cDNA. *J of Marine Biotechnology* 1995;3:216-219

22. Guillén I, Martínez R, Hernández O et al. *Aquaculture Biotechnology Symposium Proceedings*. Edited by Edward M. Donaldson and Don. Mackinlay. International Congress on the Biology of Fishes. San Francisco State University. July 14-18. 1996:63-72.



Tabla 2. Variabilidad de las relaciones de parámetros por grupo de peces.

Relación de parámetros	Coeficientes de variación (%) <sup>a</sup>					Variabilidad <sup>b</sup>
	Grupo 1 <sup>c</sup>	Grupo 2 <sup>c</sup>	Grupo 3 <sup>c</sup>	Grupo 4 <sup>c</sup>	Media	
Longitud total / longitud estándar	2,14	1,91	0,97	1,57	1,65	I
Longitud cabeza / longitud estándar	3,29	11,97	7,49	8,29	7,76	II
Longitud preorbital / longitud estándar	3,52	7,79	8,84	17,25	9,35	II
Longitud preorbital / longitud cabeza	4,38	15,34	11,93	9,42	10,26	III
Longitud predorsal / longitud estándar	12,74	1,73	5,17	6,56	6,55	II
Longitud preanal / longitud estándar	2,80	1,62	2,58	2,71	2,43	I
Longitud preventral / longitud estándar	3,25	4,00	5,90	4,95	4,53	I
Base de la aleta dorsal / longitud estándar	2,57	8,11	3,77	2,93	4,34	I
Base de la aleta anal / longitud estándar	9,07	15,15	13,59	7,04	11,21	III
Longitud de la aleta pectoral / longitud estándar	8,75	8,01	3,65	6,23	6,66	II
Altura máxima del cuerpo / longitud estándar	7,01	2,41	3,10	4,99	4,38	I
Longitud del hueso faríngeo / longitud cuerpo	7,43	14,54	8,43	4,95	8,84	II

<sup>a</sup>: Desviación estándar/media x 100; <sup>b</sup>: los caracteres biométricos se clasificaron en 3 grupos atendiendo al coeficiente de variación. 1) de 1 a 5: poco variable, 2) entre 5 y 10: variable y 3) mayor de 10: muy variable; <sup>c</sup>: los individuos se agruparon según su peso corporal. Grupo 1: entre 1 y 5 g, N = 7; Grupo 2: entre 5,1 y 20,9 g, N = 6; Grupo 3: entre 21 y 30,9 g, N = 8 y Grupo 4: mayores de 31 g, N = 7.

Tabla 3. Comparación múltiple de las medias de los grupos de peces utilizando la prueba de Duncan.

Grupo	Longitud total / longitud estándar		Longitud preorbital / longitud estándar		Longitud preanal / longitud estándar		Base aleta dorsal / longitud estándar	
	Media	S	Media	S	Media	S	Media	S
1	127,11	*	12,21	* *	72,06	*	54,51	*
2	126,03	*	11,07	*	71,91	*	57,95	* *
3	25,04	*	11,26	*	73,44	*	60,40	*
4	76,42	*	13,25	*	68,35	*	57,12	* *

S: Una posición distinta de los asteriscos denota diferencia significativa entre dos promedios. Cuando aparecen dos asteriscos en una media se debe a que la misma puede ser igual a sus medias adyacentes, pero estas últimas entre sí son diferentes.

al comparar con las claves para identificar especies de tilapias publicadas por otros autores (6).

En la Tabla 5 se muestra la semejanza de la línea de supertilapias IG/03-F70, en porcentajes, con otras especies de tilapias, respecto a varios parámetros estudiados, comparados con los rangos publicados en las claves de Trewavas para identificar especies de tilapias (6). Analizando el porcentaje de semejanza global, se puede concluir que la línea de supertila-

Tabla 4. Relación en por ciento de rayos/radios en las aletas dorsal, anal y ventral en la línea de supertilapias IG/03-F70.

	Media <sup>1</sup>	DS <sup>2</sup>
Aleta dorsal	56,7	2,36
Aleta anal	23,4	0,84
Aleta ventral	16,7	0,00

<sup>1</sup>: Media (N = 28) de la relación rayos/radios en las aletas dorsal, anal y ventral de la línea de supertilapias IG/03-F70; <sup>2</sup>: desviación estándar. Relación rayos/radios = (número rayos/(número rayos + número de radios)) x 100.

pias IG/03-F70 es un híbrido con un alto contenido de *O. hornorum*.

#### Número de cromosomas de la línea estudiada

En la línea de supertilapias IG/03-F70 se estudió el número de cromosomas por célula en 3 generaciones distintas (F1, F2 y F3), y se obtuvo una distribución estrecha de la frecuencia de cromosomas por célula, con un pico bien definido en 44, lo que se corresponde con el número de cromosomas reportado por otros autores para el género *Oreochromis* (12, 13) (Tabla 6). En algunas células se observó hipoploidía y en ningún caso hiperploidía; ello demostró que la técnica utilizada provoca la pérdida de algunos cromosomas, la cual es la causa de la aparición de células con menos de 44 cromosomas como han descrito otros autores (12, 13) (Tabla 6).

#### Morfología de los cromosomas

Mediante esta técnica fue posible observar que 2 de los 44 cromosomas fueron de 4 a 5 veces mayores

Tabla 5. Coincidencia en por ciento de los parámetros estudiados entre la línea de supertilapias IG/03-F70 y otras especies de tilapias del género *Oreochromis*.

Parámetros de la línea de supertilapias IG/03-F70	Coincidencia con <i>O. mossambicus</i> <sup>a</sup>	Coincidencia con <i>O. aureus</i> <sup>a</sup>	Coincidencia con <i>O. niloticus</i> <sup>a</sup>	Coincidencia con <i>O. hornorum</i> <sup>a</sup>
Rayos aleta dorsal	100	21	79	100
Radios aleta dorsal	57	100	89	100
Rayos aleta anal	100	100	100	100
Radios aleta anal	96	82	100	
Escamas en una serie longitudinal	89	89	7	NR
Branquispinas en el primer arco branquial	NR	50	50	100
Por ciento de semejanza global	74	72	68	100

<sup>a</sup>: Por ciento del total de los animales estudiados (4 grupos, N = 28, Tabla 1) de la línea de supertilapias IG/03-F70 que coinciden con el rango, para cada especie, publicado por Trewavas en las claves para identificación de especies de tilapias (6). NR: No reportado.

Tabla 6. Número de cromosomas por célula en la línea de supertilapias IG/03-F70.

Número del animal (generación)	Número total de metafases analizadas	Número de metafases con 44 cromosomas (frecuencia %)	Número de metafases con menos de 44 cromosomas (frecuencia %)
28 (F1)	46	36 (78,3)	10 (21,7)
43 (F2)	24	22 (91,6)	2 (8,4)
5 (F3)	16	14 (87,5)	2 (12,5)

que el resto (Figura 2). Los restantes son poco diferenciables entre sí, en tamaño y forma (Figura 2). No se observaron cromosomas metacéntricos, siendo la mayoría de ellos acrocéntricos y subteloacéntricos, ni se identificaron cromosomas sexuales (Figura 2).

#### ADN satélite

Al digerir el ADN de tilapias de la línea de supertilapias IG/03-F70 con *EcoRI* y aplicarlo en una electroforesis en agarosa 0,9 % (LGT, SIGMA), se observó una banda difusa (resultado no mostrado) en una zona cuya talla fue superior a los 222 pb e inferior a los 350 pb. Una vez purificadas las bandas de

cada una de las muestras procesadas y efectuada la tinción con plata en un gel de poliacrilamida al 12 %, se pudo observar la presencia de 2 bandas en la zona mencionada (Figura 3).

Se determinó la ecuación de la curva que expresa el logaritmo del peso molecular en función de la distancia de migración de los fragmentos de ADN, a partir de un patrón de peso molecular conocido (carril 1, Figura 3). Sustituyendo en la ecuación los

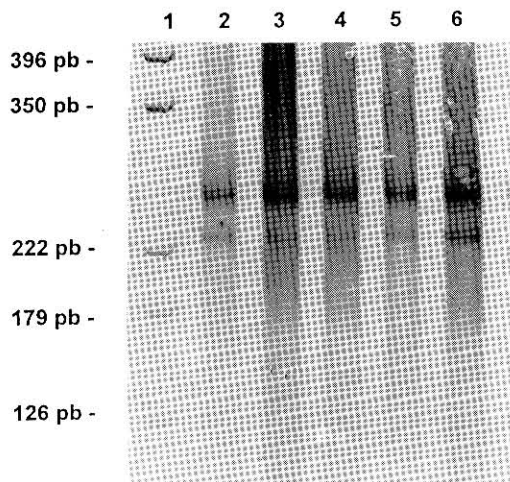


Figura 3. Análisis de ADN satélite. Electroforesis de poliacrilamida al 12 % de ADN de la línea de supertilapias IG/03-F70. 1) marcador de peso molecular; 2-6) ADN de 5 tilapias de la línea de supertilapia IG/03-F70 digeridos con *EcoRI*.



Figura 2. Preparación cromosómica a partir de aletas de tilapia de la línea de supertilapias IG/03-F70 en regeneración.

valores de migración de las 2 bandas obtenidas en la digestión del ADN de la línea de supertilapias IG/03-F70, se obtuvo que el valor estimado de los pesos moleculares de dichas bandas fueron de 260 y 231 pb, respectivamente. Los valores obtenidos se asemejan a los publicados por Franck y colaboradores en 1992 (16), que fueron de 237 y 230 pb para las especies de *O. hornorum* y *O. placidus*.

Teniendo en cuenta el patrón que muestra el ADN satélite de la línea de supertilapias IG/03-F70, la no existencia de reportes sobre la introducción de *O. placidus* en Cuba y los resultados obtenidos en los estudios de morfometría que se presentan en el pre-

sente artículo, consideramos que el fondo genético de la línea estudiada es básicamente de la especie *O. hornorum*.

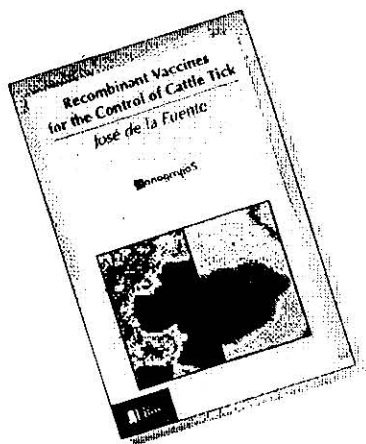
### Agradecimientos

Los autores agradecen el trabajo realizado por el personal de la empresa Acuadique en la selección y colección de los animales utilizados para el estudio. Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología. Collaborative Research Programme (proyecto CRP/CUB93-05).

Recibido en marzo de 1997. Aprobado en julio de 1997.



presents...



## Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick

**José de la Fuente**

Director for Research and Development at the Center for Genetic Engineering and Biotechnology in Havana and member of the Cuban and New York Academies of Sciences.

This book addresses the important question of ectoparasite's control employing new immunological approaches. The development of protective vaccines against *Boophilus microplus*, the first vaccine against ectoparasite and the first recombinant antiparasite vaccine to go on commercial sale is discussed in the book. Tick biology, antigen characterization, process design, analytical methods, computer simulation of both infestation and vaccination strategies and vaccine preclinical and clinical data collected in Australia, Canada, Colombia, Cuba and Mexico are presented in the book in a comprehensive way. The book, which is the first in the series Monograph published by Elfos Scientiae, is of interest for parasitologists, immunologists, veterinarians, molecular biologists and engineers, and biochemists involved in the design and characterization of new vaccines.

### Ordering information

Price: \$ 15.00 USD.

Orders can be sent to: **ELFOS SCIENTIAE, Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, C. de La Habana 6. C.P. 10600, CUBA**

For telephone orders: (53-7) 21 8466, 21 8164  
Fax: (53-7) 21 8070, 33 6008

Please add the following data to your order: number of copies, your name and address for delivery.

Payment must be made through a bank telegraphic transfer for the amount to be paid, according to the daily monetary exchange, in any of the currencies and through the banks listed below:

Canadian dollars	National Bank of Canada, Montreal
German marks	Deutsche Sudamerikanische Bank, Hamburgo
British pounds	National Westminster Bank, Londres
Swiss franks	Union Bank of Switzerland, Zurich

Your bank transfer should be sent to: Banco Financiero Internacional, Línea y O, Plaza, C. de la Habana, Cuba, to the account No. 402.01.8064.