

Nutrigenómica de larvas de pescado blanco de Pátzcuaro (*chirostoma estor*) alimentadas con rotífero y microdieta.

Juárez-Gutiérrez, M. E., Monroy de la Peña, F., Martínez-Palacios, C. A., Navarrete-Ramírez, P. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. San Juanito Itzicuaró S/N, Col. San Juanito Itzicuaró. Morelia, Michoacán, México.

*E-mail: mitzi_105105@hotmail.com



Cite this paper/Como citar este artículo: Juárez-Gutiérrez, M. E., Monroy de la Peña, F., Martínez-Palacios, C. A., Navarrete-Ramírez, P. (2021). Nutrigenómica de larvas de pescado blanco de Pátzcuaro (*chirostoma estor*) alimentadas con rotífero y microdieta. *Revista Bio Ciencias* 8: (Suppl) Memorias del 3er Coloquio de Nutrigenómica y Biotecnología Acuícola 2020 (CONYBA) e1183. <http://doi.org/10.15741/revbio.08Suppl.e1183>

Resumen

La larvicultura de peces se ha basado principalmente en alimentación con presas vivas, el pescado blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*) no es la excepción. Por lo tanto, se han desarrollado microdietas específicas para reducir el uso del alimento vivo y con ello los costos de producción. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto nutrigenómico de la alimentación con alimento vivo (rotífero) y una microdieta, en el desempeño y expresión de genes de larvas de *C. estor*. Las larvas alimentadas con rotífero lograron un mejor desempeño que aquellas alimentadas con microdieta. Se ensambló el transcriptoma *de novo* de larvas completas y se realizaron los respectivos análisis de correlación de muestras y expresión diferencial. Se obtuvo la anotación de 179 genes expresados diferencialmente ($p \leq 0.01$) en el tratamiento de alimentación con rotífero. Mediante un análisis profundo fue posible determinar un conjunto de genes relacionados al crecimiento y desarrollo muscular, óseo y cartilaginoso. Lo anterior se correlacionó con los resultados de desempeño larvario y de histología. Por lo tanto, la nutrigenómica puede emplearse como herramienta para la mejora de futuras formulaciones en larvas de *C. estor*.

Abstract

Fish larviculture has been based mainly on feeding with live prey, Pike silverside (*Chirostoma estor*) is not an exception. Though, specific microdiets have been developed for this species to reduce the use of live food and production costs. This work aimed

to evaluate the nutrigenomic effect of feeding *C. estor* larvae with live food (rotifer) and a microdiet on larval performance and gene expression. Larvae fed rotifer achieved better performance than larvae fed with microdiet. *De novo* transcriptome of whole larvae was assembled, and the respective analyzes of sample correlation and differential expression were performed. The annotation of 179 differentially expressed genes ($p \leq 0.01$) was obtained in rotifer-feed treatment. Through an in-depth analysis, genes related to the growth and development of muscle, bone, and cartilage were found. The latter was correlated with larval performance and histology results. Therefore, nutrigenomics is a useful tool to improve future formulations in *C. estor* larvae.

Introducción

El pescado blanco (*Chirostoma estor*) tiene gran valor comercial y alta demanda en el mercado, siendo hasta hace unos años, la base de la pesquería del lago de Pátzcuaro. Se han realizado diversas investigaciones con la finalidad de establecer los requerimientos básicos para el cultivo de esta especie, principalmente en las áreas de alimentación y nutrición de etapas tempranas (larvas y juveniles), ya que son los estadios en donde se presentan las más altas mortalidades (Martínez-Palacios *et al.*, 2008).

La larvicultura de peces se ha basado principalmente en alimentación con presas vivas (organismos zooplanctónicos) debido al buen desempeño que promueven en las larvas; el pescado blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*) no es la excepción. Por ello, diversos trabajos de

investigación se han enfocado en el desarrollo y aplicación de microdietas específicas para reducir el uso del alimento vivo y con esto disminuir los costos de producción (Martínez-Palacios *et al.*, 2006). En ese sentido, recientemente se probó una microdieta para larvas de *C. estor* con la que se consiguió reducir el uso del alimento vivo (rotífero), disminuyendo el tiempo de destete de las larvas. Sin embargo, las larvas alimentadas con la microdieta mostraron menor crecimiento y supervivencia en comparación con las que se alimentaron únicamente con rotífero (Kolkovski *et al.*, 1993).

Debido a que se desconocían las implicaciones a nivel de expresión génica de la alimentación con rotífero y con microdieta en larvas de *C. estor*, se utilizó un enfoque nutrigenómico para evaluar dichas implicaciones asociadas o derivadas por esta intervención dietaria, a través de los cambios en el transcriptoma de las larvas (Martin y Król, 2017).

Por lo tanto, el objetivo de éste trabajo fue evaluar el efecto nutrigenómico de la alimentación con rotífero y una microdieta en el desempeño y en la expresión de genes de larvas de *C. estor*.

Materiales y Métodos

El experimento se llevó a cabo en la planta de producción de pescado blanco de Pátzcuaro dentro de las instalaciones del Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA), IIAF-UMSNH.

El diseño experimental consistió de dos tratamientos con 5 repeticiones cada uno, las larvas se distribuyeron aleatoriamente quedando 200

larvas en cada tanque. Un tratamiento consistió en alimentar a las larvas únicamente con rotífero *ad libitum* (25-30 rotíferos/mL) hasta el final del experimento. En el tratamiento de alimentación con microdieta, las larvas se alimentaron únicamente con rotífero hasta los 7 días post-eclosión (dpe). Durante el octavo y noveno dpe, las larvas fueron co-alimentadas alternando rotífero y microdieta para llevar a cabo el proceso de adaptación al alimento artificial (destete). A partir del día 10 post-eclosión, se retiró el rotífero y se alimentó únicamente con la microdieta. Las larvas fueron alimentadas con las microdietas de forma manual cada hora durante las primeras 12 h del día; para las 12 h subsecuentes se utilizaron alimentadores automáticos (BOYU ZW-82), proporcionando cuatro alimentaciones con un intervalo de 3 horas cada una. La duración total del experimento fue de 27 días. Durante toda la fase experimental las larvas se mantuvieron bajo un fotoperiodo 24L:0O.

La microdieta se preparó en forma de microagregados utilizando el método de Spray-Drying, con un tamaño de partícula que varió de 1 a 100 μm aproximadamente.

Al final del experimento se cuantificaron diferentes parámetros de desempeño larvario (supervivencia, peso final y tasa de crecimiento específico) a las larvas. Asimismo, se tomaron muestras para realizar la evaluación histológica y la secuenciación de RNA (*RNA-seq*) con la finalidad de observar los cambios en el transcriptoma. Con herramientas bioinformáticas se ensambló el transcriptoma *de novo* de larvas completas y se realizaron los respectivos análisis de correlación de muestras y expresión diferencial (Fig. 1).

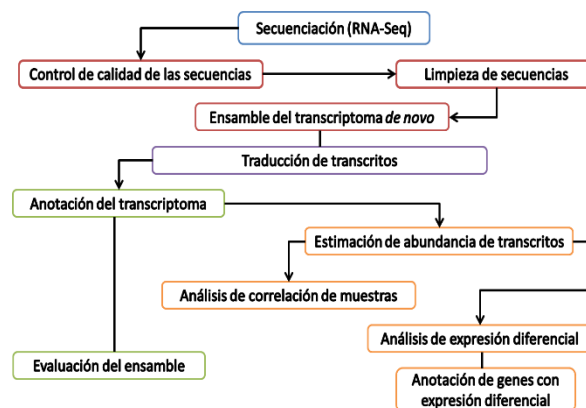


Figura 1. Pipeline empleado para el análisis de datos derivados del proceso de secuenciación.

Resultados

Los valores de crecimiento y supervivencia de los tratamientos se muestran en la Tabla 1, en donde

claramente se observa que las larvas alimentadas solo con rotífero presentan un mejor desempeño.

Tabla 1. Supervivencia (S), peso corporal final (PF), y tasa de crecimiento específico (SGR) de larvas de *C. estor* después de 27 días de tratamiento. Los datos se expresan como medias \pm desviación estándar. * indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Valores promedio	Rotífero	Microdieta
S (%)	88.24 \pm 3.85*	53.76 \pm 13.19
PF (mg)	5.28 \pm 1.13*	1.66 \pm 0.65
SGR (% mg/día)	14.43 \pm 0.78*	9.94 \pm 1.51

Los cortes histológicos correspondientes a las larvas alimentadas con rotífero mostraron un mayor crecimiento y desarrollo muscular a diferencia de las larvas alimentadas con microdieta.

La secuenciación del transcriptoma permitió comparar los perfiles de expresión génica de ambos tratamientos. Los análisis de correlación de muestras y de componentes principales indicaron que los perfiles de expresión transcripcional fueron diferentes entre los tratamientos.

El total de genes diferencialmente expresados (con un *false discovery rate* (FDR) significativo de 0.01 y

un *fold-change* de 4), para el tratamiento de alimentación con rotífero fue de 554 genes, de los cuales se obtuvo la anotación únicamente de 179 (Fig. 2). Se realizó un análisis profundo de los genes que brindaran mayor información para explicar el buen desempeño de las larvas alimentadas con rotífero, con ello fue posible identificar un conjunto de genes relacionados al crecimiento y desarrollo muscular, óseo y cartilaginoso, lo cual fue validado también con el crecimiento muscular observado histológicamente. Además, se observó la sobre-expresión de algunos genes de enzimas digestivas o precursores de éstas.

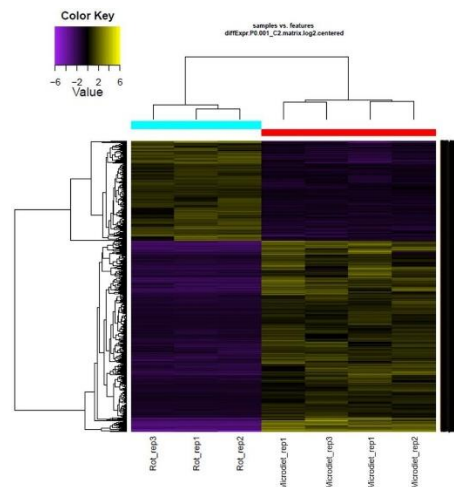


Fig 2. *Heat map*. Representación de genes expresados diferencialmente (*fold-change*=4 y *p-value*=0.01) en cada tratamiento. De acuerdo con la paleta de color (*Color key* – esquina superior izquierda), aquellos genes que se encuentre entre la gama de colores negro-morado se encuentran sub-expresados; aquellos genes que se encuentren entre la gama de colores marrón-amarillo son los sobre expresados diferencialmente según el tratamiento. Rotífero (línea azul turquesa superior). Microdieta (línea roja superior).

Discusión

Las larvas que fueron alimentadas con rotífero presentaron un mejor desempeño, lo cual ha sido reportado por diversos autores, quienes señalan que el alimento vivo es el mejor alimento para la etapa larvaria, reflejando mayor supervivencia y crecimiento en comparación con las larvas alimentadas con microdietas o alimento formulado (Cahu y Zambonino-Infante, 2001).

El bajo desempeño de las larvas alimentadas con microdietas se ha atribuido, principalmente, a un sistema digestivo inmaduro y una baja capacidad enzimática. Los genes de enzimas digestivas que resultaron sobre-expresados diferencialmente en las larvas alimentadas con rotífero, sugieren que el alimento vivo permite el desarrollo y maduración del sistema digestivo de especies altricias (Panserat y Kaushik, 2010). Por lo tanto, también se sugiere que la microdieta usada en la alimentación de las larvas de pez blanco no es adecuada para dicha

etapa, o que el destete se realizó antes del momento de la maduración digestiva.

Con los resultados observados se sugiere una modificación en la formulación de la microdieta o el uso de aditivos para enriquecerla, por ejemplo, la adición de probióticos que favorezcan la microbiota de las larvas, lo cual podría resultar en una mejora en el desempeño larvario debido a su impacto en la maduración del sistema digestivo.

Conclusión

El presente estudio demuestra que la nutrigenómica es una herramienta útil para evaluar el rendimiento de las dietas artificiales en larvas de *C. estor*, la cual puede emplearse para mejorar futuras formulaciones de esta y otras especies de peces en etapas tempranas.

Referencias

- Cahu, C. L. and Zambonino-Infante, J. L. (2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200(1-2), 161-180. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00699-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00699-8)
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G. W. and Gertler, A. (1993). The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiol Biochem*. 12(3), 203-9. <https://doi.org/10.1007/BF00004368>
- Martin, S. and Król, E. (2017). Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies. *Developmental and Comparative Immunology*, 75, 86-98. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.024>
- Martínez-Palacios, C. A., Ríos-Duran, M. G., Fonseca-Madrigal, J., Toledo-Cuevas, M., Sotelo-López, A. and Ross, L. G. (2008). Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880. *Aquaculture Research*, 39(7), 738-747. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01926.x>
- Martínez-Palacios, C. A., Racotta, I. S., Ríos-Durán, M. G., Palacios, E., Toledo-Cuevas, M. and Ross, L. G. (2006). Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). *Biocell* 30(1), 137-148. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16845839/>
- Panserat, S. and Kaushik, S. J. (2010). Regulation of gene expression by nutritional factors in fish. *Aquaculture Research*, 41, 751-762. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02173.x>