

Genética y Genómica en Acuicultura



PAULINO MARTÍNEZ PORTELA
ANTONIO FIGUERAS HUERTA
(Coordinadores)

Genética y Genómica

en Acuicultura

PAULINO MARTÍNEZ PORTELA

ANTONIO FIGUERAS HUERTA

(Coordinadores)

C. INFANTE, M. MANCHADO

C. SAAVEDRA

R. FREIRE, J. FERNÁNDEZ-TAJES, M. J. LÓPEZ-PIÑÓN, J. MÉNDEZ

C. LÓPEZ-FANJUL, M. Á. TORO

J. M. AFONSO, F. J. ROO

P. MARTÍNEZ, J. FERNÁNDEZ

C. BOUZA, P. MARTÍNEZ

M. PÉREZ-ENCISO, M. Á. TORO

F. PIFERRER, A. FELIP, R. M.^a CAL

A. GÓMEZ, I. MUÑOZ

C. SAAVEDRA, C. GESTAL, B. NOVOA, A. FIGUERAS

J. CERDÀ, T. MAES, J. BOBE, P. J. BABIN, A. ADMON, E. LUBZENS

N. ROHER, M. DÍAZ, S. MACKENZIE, J. V. PLANAS

J. C. BALASCH, N. ROHER, L. RIBAS, V. MULERO, LL. TORT, S. MACKENZIE

S. DIOS, B. NOVOA, A. FIGUERAS

M. L. LEMOS, C. R. OSORIO

I. LÓPEZ, J. I. NAVAS, M. A. GARRIDO, C. RUIZ, M. RUIZ, R. DE LA HERRÁN

J. A. ÁLVAREZ, A. GÓMEZ

**OBSERVATORIO ESPAÑOL DE ACUICULTURA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN**

MADRID, 2007

Reservados todos los derechos por la legislación en materia de Propiedad Intelectual.

Las noticias, asertos y opiniones contenidos en esta obra son de la exclusiva responsabilidad del autor o autores. La editorial, por su parte, sólo se hace responsable del interés científico de sus publicaciones.

Catálogo general de publicaciones oficiales:

<http://www.060.es>

Serie:

**Publicaciones científicas y tecnológicas
del Observatorio Español de Acuicultura**



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



© Editor Científico: Dr. Juan Espinosa de los Monteros

© CSIC

© Paulino Martínez Portela y Antonio Figueras Huerta

ISBN: 978-84-00-08553-7

NIPO: 653-07-083-3

Depósito Legal: M-39492-2007

Realización: DiScript Preimpresión, S. L.

PRÓLOGO

La producción en cultivo de organismos acuáticos se ha convertido en una alternativa real a la pesca extractiva o la recolección en poblaciones naturales, y se contempla que para el año 2025 las producciones de ambos orígenes se aproximen. En este contexto surge este libro de Genética y Genómica en Acuicultura, como uno de los volúmenes que integran una colección, en la que se pretende actualizar los conocimientos en las diferentes áreas de investigación relacionadas con la Acuicultura, continuando con la filosofía de los volúmenes que se editaron a comienzos de los 90. El objetivo es aproximar estos conocimientos a estudiantes y tecnólogos relacionados con la Acuicultura, y por tanto, estas obras tienen en general un componente aplicado y de revisión. Sin embargo, algunos capítulos tienen un perfil esencialmente teórico, y en ellos se presentan herramientas para la mejora genética, indispensables para su aplicación en el cultivo de organismos acuáticos. Para la elaboración de los distintos capítulos se ha contado con la colaboración de la mayor parte de los especialistas de nuestro país en Genética y Genómica relacionados directa o indirectamente con la Acuicultura. El solapamiento de más de un grupo de investigación en temas específicos, ha imposibilitado poder contar en ocasiones con todos los grupos que merecerían estar presentes en el mismo por su nivel científico.

En este volumen se recogen aspectos más tradicionales relacionados con la evaluación de recursos y la mejora genética, y otros de desarrollo más reciente, derivados del análisis global de los genomas mediante aproximaciones estructurales y funcionales, lo que ha venido a denominarse como Genómica. De todas formas, los avances en este campo han impregnado también las áreas más tradicionales de investigación en mejora genética, surgiendo nuevas herramientas que han permitido una mayor eficiencia y precisión en estas aproximaciones. En



la medida de lo posible, se presenta información sobre los dos principales grupos de organismos, que conforman la producción Acuícola en España, los peces y los moluscos. Los peces están más representados tanto en el número de capítulos como en su presencia como referencias en artículos más técnicos, sencillamente porque la investigación en peces ha ido por delante de los estudios en moluscos. El libro está dividido en dos grandes bloques. El primero incluye las aproximaciones de la genética de poblaciones y cuantitativa para la mejora de la producción en acuicultura. Al final de este bloque, se presentan los artículos relacionados con las herramientas de genómica estructural y su aplicación, y otras aproximaciones para la mejora derivadas de las técnicas de manipulación cromosómica y transgénesis. En el segundo bloque se presentan las herramientas y aproximaciones más relacionadas con la genética molecular, y especialmente la genómica funcional, que tratan de identificar los genes relacionados con procesos y rutas que tienen que ver con la mejora de caracteres productivos.

El libro comienza con abordajes tradicionales de la mejora genética que incluyen la evaluación de recursos genéticos en peces y moluscos (Caps.1 y 2), y su derivación hacia la trazabilidad alimentaria en moluscos (Cap.3). Los capítulos 4 y 5 tocan dos temas clásicos esenciales de la genética cuantitativa y su aplicación para la mejora de organismos acuáticos. Relacionado directamente con estos temas, pero con una perspectiva más aplicada, se presenta en el capítulo 6 la evaluación de la base genética de las anomalías morfológicas en peces, que pueden causar pérdidas notables en la industria piscícola. En el capítulo 7, se desarrolla una herramienta de enorme utilidad como soporte en los planes de mejora genética, como es la estimación de parentescos mediante marcadores moleculares. Este bloque, se continúa en los capítulos 8 y 9, donde se abordan los desarrollos genómicos estructurales, mapas genéticos e identificación de QTLs, que sirven de apoyo, tanto para la localización de genes relacionados con caracteres productivos, como para la aplicación de selección asistida por marcadores. Se finaliza este



primer bloque con la presentación de otras estrategias relacionadas con la mejora genética, como son las aplicaciones derivadas de la manipulación cromosómica (Cap. 10) y los métodos para la obtención de organismos transgénicos (Cap. 11).

En el segundo bloque, como se comentó, se aborda el estado en que se encuentran las estrategias de genómica funcional en moluscos (Cap. 12) y de una forma más pormenorizada en peces. En éstos se analizan de forma general (Cap. 13) o centrada en determinados procesos fisiológicos (Cap. 14), la aplicación de la genómica funcional, tanto en su vertiente transcriptómica como proteómica. Mención especial, por el número de trabajos que la componen, es la sección relacionada con la respuesta inmune y la resistencia a patologías en peces y moluscos (Caps. 15 y 16). Ésta se completa con el estudio de los genes de virulencia desde una perspectiva de interacción parásito-hospedador (Cap. 17), y desde una vertiente más aplicada, mediante el desarrollo de herramientas moleculares para la identificación de patógenos (Cap. 18). El libro se finaliza con un capítulo dedicado a la bioinformática, que presenta las herramientas indispensables para las aproximaciones de genómica funcional, pero que de alguna forma, constituyen un soporte para cualquier estudio relacionado con la genética (Cap. 19). Esperamos que la estructura del libro y su contenido sea del agrado de todos los investigadores o estudiantes relacionados con el mundo de la Acuicultura.

Los coordinadores

Paulino Martínez Portela

Antonio Figueras Huerta

ÍNDICE

1. RECURSOS GENÉTICOS DE PECES MARINOS DE INTERÉS EN ACUICULTURA	21
1. IMPORTANCIA DE LOS RECURSOS GENÉTICOS EN ACUICULTURA	24
2. MARCADORES MOLECULARES	25
3. FUENTES DE DIFERENCIACIÓN	28
4. DORADA: <i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758)	31
4.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico (Tabla 2)	32
4.2. Diferenciación entre doradas salvajes y en cautividad	34
5. LUBINA: <i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	34
5.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico (Tabla 3)	35
5.2. Diferenciación en base a su ecología	38
5.3. Diferenciación entre lubinas salvajes y en cautividad	38
6. RODABALLO: <i>Scophthalmus maximus</i> (Linnaeus, 1758)	40
6.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico (Tabla 4)	41
6.2. Diferenciación entre rodaballos salvajes y en cautividad	43
7. LENGUADO COMÚN: <i>Solea solea</i> (Linnaeus, 1758)	44
7.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico (Tabla 5)	44
7.2. Diferenciación entre el lenguado común salvaje y en cautividad	46
8. LENGUADO SENEGALÉS: <i>Solea senegalensis</i> (Kaup, 1858)	46
8.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico	46
8.2. Diferenciación entre el lenguado senegalés salvaje y en cautividad	47
9. BESUGO: <i>Pagellus Bogaraveo</i> (Brünnich, 1768)	48
9.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico	48
10. SARGO COMÚN: <i>Diplodus sargus</i> (Linnaeus, 1758)	50
10.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico	50
11. URTA: <i>Pagrus auriga</i> (Valenciennes 1843)	51
11.1. Diferenciación entre urta salvaje y en cautividad	52



12. MERO: <i>Epinephelus marginatus</i> (Lowe, 1834)	52
12.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico	53
13. CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55
2. RECURSOS GENÉTICOS DE MOLUSCOS Y ACUICULTURA	65
1. INTRODUCCIÓN	69
2. LOS MARCADORES GENÉTICOS Y EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES NATURALES DE MOLUSCOS	71
3. VARIABILIDAD MOLECULAR Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE MOLUSCOS AUTÓCTONOS CULTIVADOS EN EUROPA	76
4. LAS ESPECIES ALÓCTONAS Y EL MANEJO DE SUS RECURSOS GENÉTICOS	90
5. RECURSOS GENÉTICOS Y CARACTERES PRODUCTIVOS	94
6. EL IMPACTO DE LA LA ACUICULTURA SOBRE LOS RECURSOS GENÉTICOS DE LAS POBLACIONES NATURALES	101
BIBLIOGRAFÍA	104
3. ESTRATEGIAS EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES COMERCIALES DE MOLUSCOS BIVALVOS	113
1. INTRODUCCIÓN	117
2. GENERALIDADES Y CARACTERÍSTICAS DE LOS MARCADORES MOLECULARES ORIENTADOS A LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES	119
3. ESTUDIOS DE IDENTIFICACIÓN DE BIVALVOS COMERCIALES	126
3.1. Los mejillones	126
3.2. Las ostras	129
3.3. Los pectínidos	134
3.4. Las almejas	138
3.5. Los berberechos	139
3.6. Las navajas	140
BIBLIOGRAFÍA	145



4. FUNDAMENTOS DE LA MEJORA GENÉTICA EN ACUICULTURA	155
1. DESCRIPCIÓN GENÉTICA	
DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS	158
1.1. El modelo de la genética cuantitativa	158
1.2. Estima de heredabilidades y correlaciones genéticas	161
1.3. Caracteres de interés económico en acuicultura.....	164
1.4. Heredabilidades y correlaciones genéticas de los caracteres de interés económico en acuicultura	166
2. DERIVA GENÉTICA.....	168
2.1. Consanguinidad	168
2.2. Medida del coeficiente de consanguinidad	169
2.3. Consecuencias genéticas de la consanguinidad: depresión consanguínea y erosión de la variabilidad genética	171
3. SELECCIÓN ARTIFICIAL	173
3.1. Respuesta a la selección artificial	173
3.2. Intensidad de selección (i)	173
3.3. Intervalo entre generaciones (L)	174
3.4. Variación genética aditiva (V_A)	175
3.5. Precisión (r_{Ad})	176
3.6. Respuesta correlacionada	178
3.7. La respuesta a la selección en poblaciones de censo finito	179
BIBLIOGRAFÍA.....	181
 5. DISEÑO DE PROGRAMAS DE MEJORA GENÉTICA EN ACUICULTURA	 183
1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS PROGRAMAS DE MEJORA GENÉTICA EN ACUICULTURA.....	186
2. OBJETIVO DE UN PROGRAMA DE MEJORA	189
3. ELECCIÓN DE LA POBLACIÓN BASE Y DEL SISTEMA DE CRUZAMIENTO	190
3.1. Elección de la población base.....	190
3.2. Elección del sistema de cruzamiento	193
4. DESARROLLO DEL SISTEMA DE EVALUACIÓN Y SELECCIÓN	195
4.1. Experimentos de selección en peces y moluscos	195



4.2. Experimentos de consanguinidad en organismos acuáticos	198
4.3. Sistemas de evaluación y selección en programas de mejora	201
5. CONTROL DE LA CONSANGUINIDAD EN PROGRAMAS DE MEJORA	203
6. TRANSMISIÓN DEL PROGRESO GENÉTICO	208
BIBLIOGRAFÍA	209
6. ANOMALÍAS MORFOLÓGICAS EN PECES CULTIVADOS: HEREDABILIDAD Y SELECCIÓN	213
1. INTRODUCCIÓN	216
2. ANOMALÍAS DE FORMA CORPORAL	217
3. ANOMALÍAS DE PIGMENTACIÓN	218
4. ANOMALÍAS DE ESCAMAS	221
5. ANOMALÍAS DEL ESQUELETO	223
BIBLIOGRAFÍA	230
7. ANÁLISIS DE PARENTESCOS MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES	241
1. INTRODUCCIÓN	246
2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE MARCADORES Y SU POTENCIAL PARA ANÁLISIS DE PARENTESCO	248
2.1. Características de los marcadores	248
2.2. Potencial estadístico de los marcadores	254
3. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	256
3.1. Estimadores de máxima verosimilitud	256
3.2. Estimación Bayesiana	257
3.3. Métodos MCMC	260
3.4. Simulación	261
4. ANÁLISIS DE PATERNIDAD	261
4.1. Métodos para la asignación de paternidad	261
4.1.1. Asignación por exclusión	262
4.1.2. Asignación mediante máxima verosimilitud	264
4.1.3. Reconstrucción genotípica de los parentales	266
4.1.4. Métodos de probabilidad completa	266



4.2. Problemática de la metodología estadística	267
4.2.1. Posibles escenarios en el análisis de paternidad: muestreo.....	267
4.2.2. Tratamiento de los problemas técnicos y biológicos.....	268
4.2.3. Desviaciones de las asunciones teóricas	270
4.3. Programas informáticos para análisis de paternidad y sus prestaciones	272
4.4. Aplicación del análisis de paternidad en Acuicultura	276
5. ANÁLISIS DE PARENTESCO	278
5.1. Información molecular.....	280
5.2. Estimadores por parejas (<i>pairwise</i>)	281
5.2.1. Parentesco molecular	281
5.2.2. Índices de similitud	282
5.2.3. Estimadores de Métodos de Momentos (MME)	282
5.2.4. Estimadores de Máxima Verosimilitud (MLE).....	284
5.2.5. Problemas de los estimadores por parejas	286
5.3. Reconstrucción de grupos genealógicos.....	289
5.4. Marcadores dominantes	292
5.5. Errores de genotipado	294
5.6. Medidas de precisión	295
5.7. Programas.....	297
BIBLIOGRAFÍA.....	299
8. MAPAS GENÉTICOS EN ACUICULTURA	309
1. INTRODUCCIÓN.....	313
2. CONCEPTOS BÁSICOS DE LIGAMIENTO Y RECOMBINACIÓN	314
3. MARCADORES GENÉTICOS PARA LA CARTOGRAFÍA GENÉTICA	316
4. CARTOGRAFÍA GENÉTICA.....	318
4.1. Familias de referencia para el mapeo genético	318
4.2. Análisis de ligamiento: Método LOD	319
4.3. Mapas genéticos en especies de interés en acuicultura	325
4.3.1. Características de los mapas genéticos: Precisión y resolución	326
5. ESTRUCTURA CROMOSÓMICA Y LOCALIZACIÓN DE CENTRÓMEROS:	
ANÁLISIS DE MEDIAS TÉTRADAS	328
5.1. Distancias gen-centrómero.....	328
5.2. Distorsión de la segregación en ginogenéticos diploides	335



5.3. Diferencias de segregación interindividuales o interfamiliares	337
5.4. Análisis de segregación conjunto («Joint segregation analysis»)	338
5.4.1. Estudio de ligamiento entre pares de marcadores.....	340
5.4.2. Posicionamiento de marcadores respecto al centrómero.....	340
5.4.3. Análisis del patrón de entrecruzamiento a lo largo del eje cromosómico...	342
6. IMPORTANCIA BÁSICA Y APLICADA DE LOS MAPAS GENÉTICOS	344
6.1. Integración de mapas genéticos y físicos.....	344
6.1.1. Asignación cromosómica de grupos de ligamiento.....	344
6.1.2. Cartografía genómica integrada	345
6.2. Mapeo comparativo y genómica evolutiva	347
6.3. Identificación de regiones génicas de interés: Selección asistida por marcadores	348
6.4. Selección de marcadores genéticos para el análisis poblacional y de parentesco	349
BIBLIOGRAFÍA.....	349
 9. LOCALIZACIÓN DE GENES Y SELECCIÓN MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES	 359
1. INTRODUCCIÓN.....	362
2. CONCEPTOS BÁSICOS	363
3. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO	365
4. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN	371
5. GENÉTICA GENÓMICA	379
6. LA HUELLA DE LA DOMESTICACIÓN Y DE LA SELECCIÓN	382
7. UTILIZACIÓN DE MARCADORES EN SELECCIÓN	385
7.1. MAS en poblaciones en desequilibrio de ligamiento	385
7.2. MAS en poblaciones panmícticas.....	386
7.3. MAS en la práctica	389
8. RESULTADOS EXPERIMENTALES EN PECES.....	390
8.1. Detección de QTLs.....	390
8.2. Selección asistida con marcadores	392
9. SOFTWARE DISPONIBLE	394
10. CONCLUSIÓN.....	396
BIBLIOGRAFÍA.....	397



10. INDUCCIÓN DE LA TRIPLOIDÍA Y LA GINOGÉNESIS PARA LA OBTENCIÓN DE PECES ESTÉRILES Y POBLACIONES MONOSEXO EN ACUICULTURA	401
1. INTRODUCCIÓN	405
1.1. Problemas asociados con la reproducción durante la fase de engorde.....	405
1.2. Control genético de la proporción de sexos y de la maduración sexual....	407
1.3. Triploidía	409
1.4. Ginogénesis	424
1.5. Utilización de peces triploides y ginogenéticos en acuicultura	434
2. SALMONIFORMES	436
2.1. Salmón del Atlántico.....	436
2.2. Salmón plateado	437
2.3. Trucha arco iris	438
3. PERCIFORMES	439
3.1. Lubina	439
3.2. Dorada	443
4. PLEURONECTIFORMES	445
4.1. Rodaballo.....	446
4.2. Lenguado.....	454
4.3. Fletán	455
5. CONCLUSIONES	456
BIBLIOGRAFÍA	459
GLOSARIO	471
 11. TRANSFERENCIA GÉNICA EN PECES: BASES TÉCNICAS Y APLICACIONES	 473
1. INTRODUCCIÓN	477
2. GENERACIÓN DE PECES TRANSGÉNICOS	478
2.1. Utilización de líneas celulares para la generación de peces transgénicos y «knock-out»	479
2.2. Metodología convencional para la generación de peces transgénicos	483
2.2.1. DNA foráneo	483
2.2.2. Introducción del DNA en el embrión	486
2.2.3. Integración del DNA en el genoma del huésped.....	488



2.2.4. Expresión del gen introducido.....	489
2.2.5. Transmisión a la descendencia	491
3. APLICACIONES DE LOS PECES TRANSGÉNICOS	491
3.1. Estudios básicos.....	492
3.2. Aplicaciones biotecnológicas.....	493
3.2.1. Transferencia del gen de la hormona de crecimiento en peces.....	493
3.2.2. Peces resistentes al frío	500
3.2.3. Peces estériles.....	502
3.2.4. Peces resistentes a enfermedades	503
3.2.5. Modificaciones en el metabolismo	506
3.2.6. Peces transgénicos y toxicología ambiental	507
3.2.7. Peces como biofactorías	508
3.2.8. Peces para xenotransplante	509
4. EVALUACIÓN Y MANEJO DE RIESGOS.....	510
BIBLIOGRAFÍA.....	513
12. GENÓMICA DE MOLUSCOS Y ACUICULTURA.....	529
1. INTRODUCCIÓN.....	533
2. MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN GENÓMICA	534
3. MAPAS GENÉTICOS Y GENÓMICA CUANTITATIVA	540
3.1. Mapas de ligamiento	540
3.2. Genómica cuantitativa.....	541
3.3. Mapas físicos.....	542
4. GENÓMICA FUNCIONAL.....	543
4.1. Genotecas de expresión y microarrays: aplicaciones en patología e inmunología de moluscos	544
4.2. Papel de la genómica funcional en la identificación de genes expresados como respuesta inmune frente a agresiones externas.....	548
4.3. Genómica funcional de la heterosis en los moluscos.....	555
4.4. Microarrays y su aplicación en la búsqueda de marcadores de contaminación en el mejillón.....	556
5. PROTEÓMICA Y SUS APLICACIONES	557
6. FUTURAS APLICACIONES DE LA GENÓMICA DE MOLUSCOS EN LA ACUICULTURA	559
BIBLIOGRAFÍA.....	561



13. APLICACIÓN DE LA GENÓMICA FUNCIONAL Y PROTEÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LOS GAMETOS DE TELEÓSTEOS	573
1. INTRODUCCIÓN.....	577
2. CONTROL MOLECULAR DE LA REPRODUCCIÓN Y FORMACIÓN DE GAMETOS EN TELEÓSTEOS	579
2.1. Formación del huevo	579
2.2. Formación del esperma.....	582
2.3. Influencia de las condiciones ambientales sobre la calidad de los gametos	585
3. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DURANTE LA GAMETOGENÉISIS	587
3.1. Chips de ADN.....	587
3.2. Análisis seriado de la expresión génica	591
3.3. Perfiles de expresión de genes diana.....	594
4. REGULACIÓN POSTTRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR MICROARN	596
5. PROTEÓMICA	599
5.1. Tecnologías para el análisis proteómico	600
5.2. Proteómica del ovario de teleósteos y comparación del transcriptoma y proteoma	601
5.3. Análisis proteómico del líquido celómico.....	604
5.4. Proteómica del esperma	605
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	606
BIBLIOGRAFÍA.....	607
 14. APROXIMACIONES GENÓMICAS AL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN EN PECES	 621
1. INTRODUCCIÓN AL CRECIMIENTO EN PECES	623
2. CRECIMIENTO MUSCULAR	625
3. DESARROLLO Y CRECIMIENTO.....	627
4. IMPORTANCIA DE LA GENÓMICA PARA EL ESTUDIO DEL CRECIMIENTO	628
5. APROXIMACIONES GENÓMICAS AL CRECIMIENTO DURANTE EL DESARROLLO.....	631



5.1. Transcriptómica del desarrollo en especies modelo.....	633
5.1.1. Pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	633
5.1.2. Medaka (<i>Oryzias latipes</i>).....	637
5.2. Transcriptómica del desarrollo en especies no modelo	638
6. APROXIMACIONES GENÓMICAS AL CRECIMIENTO MUSCULAR	640
6.1. Cambios transcripcionales en músculo esquelético	641
6.2. Respuesta a la temperatura ambiental.....	643
6.3. Respuesta a la degradación muscular durante la vitelogénesis.....	644
6.4. Respuesta a la administración de vacunas de DNA.....	645
6.5. Respuesta a la administración de lipopolisacárido	646
7. APROXIMACIONES GENÓMICAS A LA FUNCIÓN HEPÁTICA	649
7.1. Cambios transcripcionales en hígado en relación con la nutrición y el crecimiento	650
7.2. Cambios en el proteoma hepático en relación con la nutrición y el crecimiento	652
8. APLICABILIDAD DE LOS ESTUDIOS GENÓMICOS SOBRE EL CRECIMIENTO, DESARROLLO Y NUTRICIÓN EN ACUICULTURA	654
9. DIRECCIONES FUTURAS	655
BIBLIOGRAFÍA.....	656
15. GENÓMICA FUNCIONAL E INMUNOLOGÍA.....	661
1. INMUNOLOGÍA FUNCIONAL EN LA ERA GENÓMICA	665
2. FILOGENÓMICA DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN ACUICULTURA: INTENSIDAD TRANSCRIPCIONAL	668
2.1. El invertebrado modal	671
2.2. El pez oncogénico	673
3. INFECTOGENÓMICA Y DEFENSOMA EN ACUICULTURA: IDENTIDAD TRANSCRIPCIONAL	676
BIBLIOGRAFÍA.....	681
16. GENÓMICA, INMUNOLOGÍA Y ENFERMEDADES DE PECES EN ACUICULTURA.....	689
1. INTRODUCCIÓN.....	693
2. SISTEMA INMUNE DE PECES TELEÓSTEOS.....	696



2.1. Mecanismos de defensa inespecíficos.....	697
2.2. Mecanismos de defensa específicos.....	704
2.3. Citoquinas.....	706
3. CLONACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INMUNE EN PECES MODELO Y DE INTERÉS COMERCIAL EN ESPAÑA Y OTROS PAÍSES.....	713
4. LIBRERÍAS DE EXPRESSED SEQUENCE TAGS (ESTS). SUPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION (SSH)	720
5. MICROARRAYS	725
BIBLIOGRAFÍA.....	730
 17. DETERMINANTES GENÉTICOS DE LA VIRULENCIA EN LOS PROCESOS INFECCIOSOS EN ACUICULTURA.....	 763
1. INTRODUCCIÓN.....	767
2. FACTORES DE VIRULENCIA BACTERIANOS.....	769
3. GENES DE TRANSPORTE DE HEMO Y SISTEMAS TONB: UN EJEMPLO DE SISTEMAS COMUNES A DIFERENTES PATÓGENOS.....	772
4. PLÁSMIDOS Y VIRULENCIA	775
5. ISLAS DE PATOGENICIDAD	777
6. REGULACIÓN GÉNICA Y VIRULENCIA	779
7. REGULACIÓN GÉNICA MEDIANTE <i>QUORUM SENSING</i>	781
8. HERRAMIENTAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DETERMINANTES GENÉTICOS DE LA VIRULENCIA	782
9. EXPRESIÓN IN VIVO DE GENES BACTERIANOS DURANTE LA INFECCIÓN.....	783
9.1. In Vivo Expression Technology (IVET).....	784
9.2. Signature-Tagged transposon mutagenesis (STM).....	786
10. MUTAGÉNESIS POR TRANSPOSICIÓN IN VIVO	787
11. TÉCNICAS BASADAS EN LA HIBRIDACIÓN SUSTRATIVA.....	789
BIBLIOGRAFÍA.....	791
 18. UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE PROTOZOOS PARÁSITOS EN BIVALVOS	 795



1. CONSIDERACIONES GENERALES	799
2. PRINCIPALES ENFERMEDADES PARASITARIAS DE LOS MOLUSCOS BIVALVOS ...	800
2.1. Bonamiosis.....	801
2.2. Haplosporidiosis	802
2.3. Marteiliosis	802
2.4. Microcitosis	804
2.5. Perkinsosis.....	805
3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE PARÁSITOS DE MOLUSCOS BIVALVOS.....	806
4. MARCADORES MOLECULARES DE ADN PARA PROTOZOOS PARÁSITOS DE MOLUSCOS BIVALVOS	808
5. APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES: DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>MARTEILIA REFRINGENS</i> , <i>PERKINSUS OLSENI</i> Y <i>BONAMIA OSTREAE</i>	814
5.1. Aplicación de marcadores moleculares: <i>Perkinsus olseni</i>	816
5.1.1. Diseño de un método de diagnóstico para <i>Perkinsus olseni</i> mediante PCR.....	817
5.1.2. Aplicación del método de diagnóstico de <i>Perkinsus olseni</i> mediante PCR.....	818
5.1.3. Identificación taxonómica de <i>Perkinsus</i> en distintos hospedadores	822
5.2. Aplicación de marcadores moleculares: <i>Marteilia refringens</i>	824
5.2.1. Diseño de un método de diagnóstico para <i>Marteilia refringens</i> mediante PCR.....	824
5.2.2. Aplicación del método de diagnóstico de <i>Marteilia refringens</i> mediante PCR	827
5.2.3. Identificación taxonómica de <i>Marteilia sp.</i> en distintos hospedadores	831
5.3. Aplicación de marcadores moleculares: <i>Bonamia ostreae</i>	834
BIBLIOGRAFÍA.....	838

19. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL ANÁLISIS GENÓMICO

1. INTRODUCCIÓN.....	850
2. HERRAMIENTAS PARA UN PROYECTO DE SECUENCIACIÓN DE TAMAÑO MEDIO-GRANDE.....	851
3. DETERMINACIÓN DE LAS BASES. USO DE PHRED	852



3.1. Índices de calidad PHRED	854
4. LIMPIEZA DE SECUENCIAS	854
5. ENSAMBLADO Y BÚSQUEDA DE CONTIGS	856
6. ALINEAMIENTOS	857
6.1. Algoritmos de alineamiento	858
7. BASES DE DATOS BIOINFORMÁTICAS	861
7.1. Qué es Entrez	862
7.2. Búsquedas de secuencias de nucleótidos con Entrez	862
7.3. Descripción de un registro de GenBank	863
7.4. Opciones de visualización de un registro de GenBank	865
7.5. Búsquedas en PubMed	865
7.6. Gene: búsqueda de secuencias para un gen	866
7.7. Búsquedas en OMIM	866
7.8. Búsquedas en dbSNP	867
7.9. El proyecto Gene Ontology (GO)	868
7.10. La base de datos de rutas KEGG	868
7.11. Búsqueda de homologías: BLAST	869
8. CONSTRUCCIÓN DE BASES DE DATOS	871
9. LENGUAJES DE PROGRAMACIÓN EN BIOINFORMÁTICA	873
9.1. Perl	873
9.2. BioPerl	873
9.3. BioPython	874
9.4. BioJava	875
9.5. BioRuby	875
10. ANÁLISIS DE LOS DATOS GENÓMICOS	876
11. FILOGENIA	876
11.1. Métodos de distancias	878
11.1.1. Estimación de la matriz de distancias	879
11.1.2. Distancia entre secuencias ADN	879
11.1.3. Cálculo de la distancia usando modelos de evolución	880
11.2. Métodos de máxima verosimilitud	880
11.3. Máxima parsimonia	881
11.4. Aplicaciones de la filogenia	881
12. ANÁLISIS DE MICROARRAYS	882



12.1. Fase de segmentación y determinación del background y la señal	884
12.2. Preprocesado	884
12.3. Normalización	885
13. CONCLUSIONES	887
BIBLIOGRAFÍA	888
LIBROS DE TEXTO RECOMENDADOS	888
PÁGINAS WEB INTERESANTES	889

1

RECURSOS GENÉTICOS DE PECES MARINOS DE INTERÉS EN ACUICULTURA

RECURSOS GENÉTICOS DE PECES MARINOS DE INTERÉS EN ACUICULTURA

C. Infante y M. Manchado

IFAPA Centro *El Toruño*, Junta de Andalucía

Resumen

El desarrollo de una acuicultura sostenible requiere la evaluación y el conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones en cautividad, a fin de evitar los efectos negativos derivados de la endogamia. Dicha diversidad genética está íntimamente ligada a los recursos genéticos naturales, ya que la mayoría de reproductores de la especie criadas en cautividad proceden de capturas en el medio natural. Por tanto, la preservación de los recursos genéticos naturales debe ir en paralelo con el desarrollo de las actividades acuícolas. En el presente estudio se analizan los distintos factores que contribuyen a la diferenciación y estructuración genética de poblaciones marinas de peces. Además, se comparan las características genética en el medio natural de 9 especies con interés en acuicultura: dorada, lubina, rodaballo, lenguado común, lenguado senegalés, besugo, sargo común, urta y mero. Estos datos se han comparado con la diversidad genética de poblaciones criadas en cautividad. Los resultados demuestran como, en el medio natural, cada especie posee un patrón de estructuración genético singular debido a la combinación de factores biológicos, oceanográficos, ambientales y/o antropogénicos. Además, los análisis comparativos de poblaciones criadas en cautividad con respecto a la naturales muestran, en todos los casos, pérdidas significativas de la variabilidad genética.



Abstract

Development of a sustainable aquaculture involves the assessment and knowledge of genetic diversity of populations in captivity, in order to avoid the negative effects of inbreeding. Such genetic diversity is closely linked to natural genetic resources since most of broodstocks for aquaculture are captured from the natural environment. Hence, preservation of natural genetic resources should be undertaken in parallel with the development of aquaculture activities. In the present study, we analyze the different factors affecting the genetic differentiation and structuring of marine fish populations. Moreover, we compare the genetic characteristics in the natural environment of 9 species involved in aquaculture: gilthead seabream, european seabass, turbot, common sole, senegal sole, black seabream, redbanded seabream, and dusky grouper. These data have been compared with the genetic diversity of farmed populations. Results demonstrate that each species exhibits a particular pattern of population genetic structuring in the wild as a consequence of biological, oceanographic, environmental, and/or anthropogenic factors. Moreover, the comparative analyses of farmed with respect to natural populations reveal, in all cases, a significant loss of genetic variability.

1. IMPORTANCIA DE LOS RECURSOS GENÉTICOS EN ACUICULTURA

La acuicultura marina está íntimamente ligada a los recursos naturales pesqueros. Por un lado, la mayoría de reproductores de peces marinos en cautividad proceden generalmente de capturas realizadas en el medio salvaje más próximo, para evitar la endogamia. Además, el engorde de las principales especies acuícolas marinas en España se lleva a cabo en jaulas, donde existe una interacción directa con el medio natural. Esta interacción entre recursos naturales y acuicultura hace que no se pueda entender una pesca sin una acuicultura responsable. Dicha interrelación ha sido reconocida por la FAO (WELCOMME y BARG 1997) estableciendo para la gestión de los recursos genéticos en acuicultura la necesidad de mantener la diversidad genética para i) evitar la endogamia; ii) mantener la integridad genética de los stocks



naturales; *iii*) reducir la transferencia entre stocks diferenciados genéticamente. Asimismo, recoge la necesidad de llevar a cabo análisis periódicos para determinar el grado de diversidad genética en los lotes de animales mantenidos en cautividad. Estas líneas son especialmente relevantes en la acuicultura de especies amenazadas y protegidas, como el mero, destinadas a su liberación en el medio natural con fines de repoblación (Art. 9.3.5).

La acuicultura marina es una actividad en continua expansión. Según datos de la Secretaría General de Pesca Marítima (MAPYA), la producción acuícola española supuso en 2004 un 31,12% de la producción pesquera total. En cantidades absolutas, la producción acuícola ha experimentado un espectacular crecimiento, pasando de 7.842,1 Tm en 1996 a 30.393,46 Tm en 2005 (revisado y desarrollado en «La acuicultura marina de peces en España», APROMAR 2006). Este crecimiento en la actividad acuícola ha ido paralelo a una sobreexplotación de los recursos pesqueros. La sobrepesca, la contaminación ambiental, el cambio climático o combinaciones de estos factores, han provocado una importante reducción en las capturas de algunas especies marinas. Se ha estimado que el tamaño efectivo poblacional de más de 230 poblaciones se ha reducido en más del 83% (HUTCHINGS y REYNOLDS 2004). De ellas, sólo unas pocas se recuperarán en un corto período de tiempo (necesitan una media de 15 años) en función del hábitat, ciclo vital o respuesta genética a la explotación. Estas fluctuaciones de las poblaciones naturales tienen una importante repercusión sobre su estructuración y variabilidad genética, que debe ser considerada en aras de la sostenibilidad de los programas de producción acuícola.

2. MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. En particular, nosotros nos vamos a centrar en aquellos marcadores moleculares destinados a evaluar el grado de diversidad y estructuración genética en poblaciones naturales y de crianza. Según la biomolécula objeto de análisis, los marcadores se clasifican en marcadores de proteínas y ADN. Respecto a los primeros, hay que considerar los estudios de *aloenzimas* e *isoenzimas*. Las aloenzimas son



los diferentes alelos observados en un mismo locus génico, mientras que las isoenzimas comprenden todas las formas enzimáticas con función similar producidas por diferentes *loci* génicos. En ambos casos, se trata de marcadores codominantes que muestran herencia mendeliana, muy utilizados por su bajo coste. Sin embargo, a veces, no siguen una evolución neutral y, en general, poseen un grado de polimorfismo bajo.

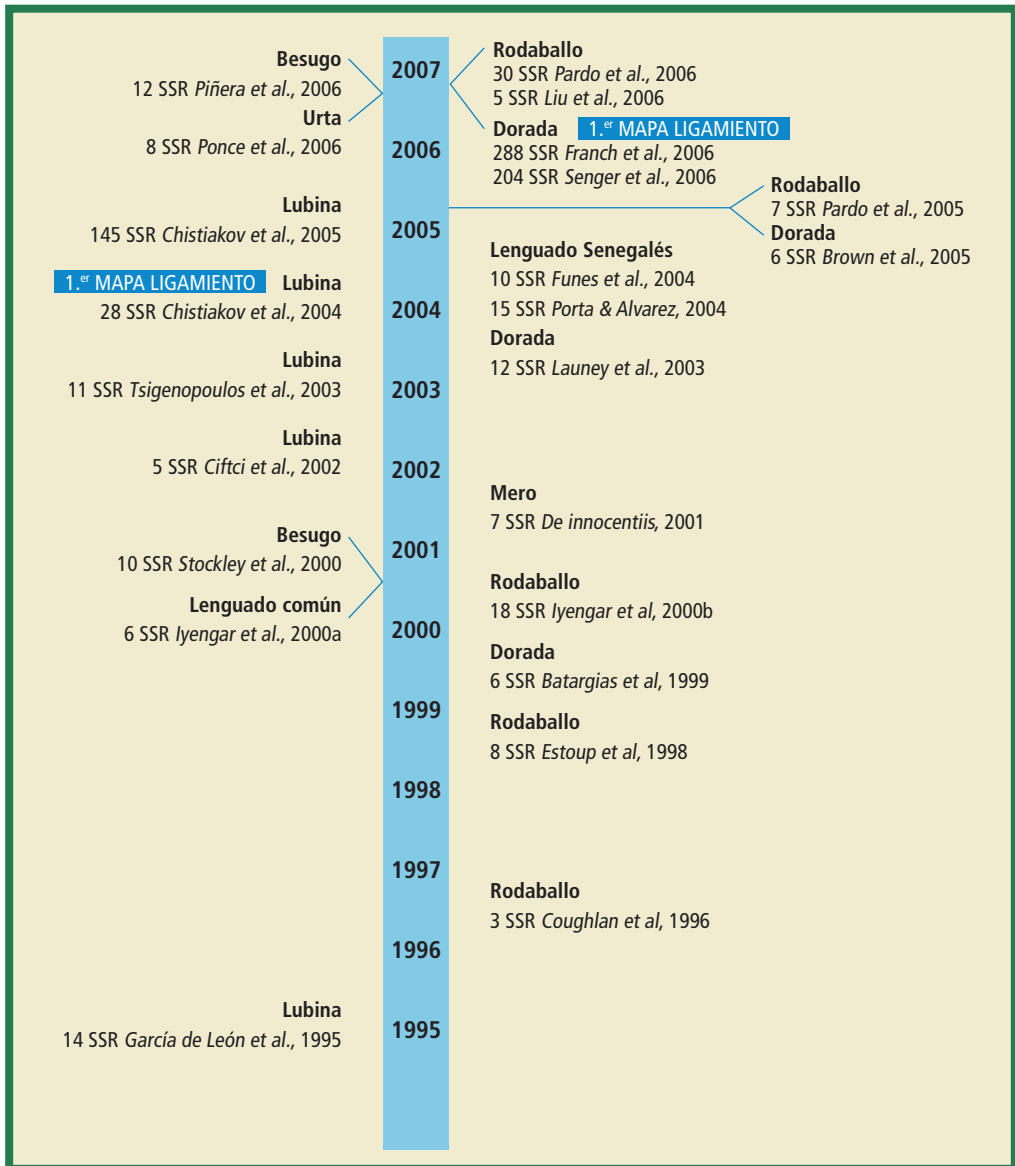
Respecto a los **marcadores de ADN**, se pueden diferenciar aquellos basados en ADN mitocondrial o ADN nuclear. El *ADN mitocondrial* (ADNmt) en teleósteos tiene un tamaño aproximado de 16.000 pares de bases (pb) y codifica para 37 genes que son transcritos a partir de un único promotor. Además, posee 2 zonas no codificantes conocidas, región de control (o D-loop) y OriL. Este tipo de marcador se caracteriza por su abundancia celular (miles de copias), carácter homoplásmico (copias idénticas, aunque en algunas especies como la lubina existe heteroplasma), la ausencia de recombinación (si bien hay datos recientes en algunos organismos de este fenómeno) y herencia materna. Esta última característica hace que el tamaño efectivo poblacional para el ADNmt sea más pequeño que para el nuclear, y por tanto sea muy sensible a fenómenos poblacionales tales como cuellos de botella («*bottlenecks*») o hibridaciones. Además, este marcador es muy interesante para estudiar diferencias en el flujo génico entre sexos, de tal forma que si éste tiene lugar principalmente o exclusivamente a través de los machos (como al parecer ocurre entre lubinas atlánticas y mediterráneas), la divergencia estimada entre poblaciones será mucho mayor en base al ADNmt que con marcadores nucleares.

Con respecto al ADN nuclear, los marcadores más utilizados son los microsatélites o SSR. Los microsatélites son secuencias cortas de 2-5 nucleótidos distribuidas por todo el genoma que aparecen repetidas en tándem un número variable de veces, incluso hasta cientos de veces, lo que determina su carácter hipervariable. El desarrollo de microsatélites para especies con importancia en acuicultura ha crecido enormemente (Figura 1) en los últimos años dada su utilidad para la identificación y diferenciación de stocks, control de endogamia y grado de parentesco, mapas de ligamiento, programas de selección genética asistida por marcadores o para manipulaciones genéticas relacionadas con poliploidías o ginogénesis (revisado en CHISTIAKOV *et al.* 2006).



FIGURA 1.

Representación temporal del desarrollo de microsatélites en dorada, lubina, rodaballo, lenguado común, lenguado senegalés, besugo, urta y mero. Se indican el número de *loci* microsatélites (SSR) y los autores. Para dorada y lubina, se señala la primera descripción del mapa de ligamiento.





3. FUENTES DE DIFERENCIACIÓN

Para definir la estructuración genética entre poblaciones se utiliza el índice de fijación F_{ST} de WRIGHT (1978), el cual sirve para indicar el grado en el que 2 o más poblaciones se diferencian entre sí (revisado en HARTL y CLARK 1997). Mientras que un valor de 0 indica panmixia, un valor de 1 corresponde a un aislamiento total entre poblaciones. De esta forma, los valores de F_{ST} están inversamente relacionados con la tasa de flujo génico existente entre poblaciones: cuanto mayor sea el número de migrantes entre poblaciones por generación, menor será el valor de F_{ST} .

Muchas especies marinas se caracterizan por presentar una amplia distribución geográfica. Esto se debe a fenómenos de dispersión pasiva, durante el período larvario (siguiendo las corrientes oceánicas), o bien de forma activa, a través de la migración de individuos juveniles y adultos. Esta característica, unida a la combinación de otros factores tales como la ausencia de grandes barreras geográficas en el mar, tamaños poblacionales elevados así como tasas de fecundidad altas, favorecen la ausencia de diferenciación genética entre poblaciones (WARD *et al.* 1994; TURNER *et al.* 2002). Sin embargo, cada vez más estudios demuestran la existencia de subdivisión poblacional en algunas especies marinas. Entre las causas que favorecen la estructuración y diferenciación poblacionales están (Tabla 1):

a) Características biológicas de la especie

- Fecundidad. Altas tasas se asocian a panmixia.
- Edad y tamaño de madurez. Las especies que maduran precozmente y a menor tamaño generalmente tienen más éxito reproductivo, lo que favorece la panmixia.
- Duración de larva en fase planctónica, que determina el período de dispersión pasivo.
- Comportamiento «homing» en reproductores. En determinadas especies, los animales regresan al mismo lugar para la reproducción en lugar de buscar otro igualmente probable (GERKING 1959). En peces, este comportamiento se asocia a familias diádomas, pero también se ha observado en especies marinas con una gran territorialidad como el mero (LEMBO *et al.* 2002).



- Cortejo. La necesidad de un cortejo previo a la reproducción es un factor muy importante en cuanto a la estructuración temporal y geográfica entre poblaciones. Este es el caso del mero, en el que la población reproductiva se estructura en función de la territorialidad de los machos. Durante el período reproductivo, los machos dominantes cambian de color y desarrollan un comportamiento agresivo. Esto permite desarrollar una estructura social a escala local en la que se establece una ratio de machos activos y hembras adultas de 1:7 (ZABALA *et al.* 1997).
- b) Parámetros demográficos:
- Reclutamiento, que permiten explicar diferencias temporales
 - Crecimiento
 - Reproducción, hermafrodita o dioica, reproductor múltiple
 - Movimientos de gametos, larvas o juveniles con fines productivos. El tráfico de huevos o alevines sin atender al origen geográfico de la muestra puede alterar los patrones de estructuración genética, principalmente por los escapes en jaulas. Esta causa se ha citado como la más probable para explicar algunas discrepancias observadas entre poblaciones de lubinas y doradas y su origen geográfico (BAHRI-SFAR *et al.* 2000; DE INNOCENTIIS *et al.* 2004).
 - Mortalidad, inducida por la pesca, por la contaminación, o por el cambio climático. Por ejemplo, en el besugo, al ser una especie hermafrodita protandria, los individuos de mayor tamaño, y por tanto sobre los que se ha producido el mayor impacto de la sobrepesca, son hembras. Como consecuencia, la población ha respondido con una inversión sexual precoz, haciendo que los machos cambien de sexo a un tamaño menor que el esperado (KRUG 1998).

Respecto a los factores demográficos es muy importante diferenciar entre *tamaño censal* (N) y *tamaño efectivo poblacional* (Ne). El primero se refiere al número total de individuos dentro de una población, mientras que el segundo hace alusión al conjunto de animales que contribuyen con su descendencia a la siguiente generación. Aquellas poblaciones con valores reducidos de Ne sufren una disminución



importante de la diversidad debido a la deriva genética, con pérdida y fijación de alelos (revisado en HARTL y CLARK 1997). De forma genérica, dada la alta fecundidad y la gran varianza existente en el éxito reproductivo entre individuos dentro de una misma especie marina, *Ne* puede llegar a ser entre 3-5 órdenes de magnitud menor que *N* (HAUSER *et al.* 2002; HEDGECOCK 1994; TURNER *et al.* 2002).

c) Aislamiento geográfico por barreras físicas:

- Cambios bruscos en los gradientes de temperatura y salinidad. Por ejemplo, se ha sugerido que la temperatura es un factor condicionante del desarrollo y diferenciación genética en el lenguado común (KOTOULAS *et al.* 1995). Por otro lado, el desarrollo de la lubina en ambientes con distinta salinidad provoca alteraciones en las frecuencias de algunos marcadores aloenzimáticos como adaptación al medio (ALLEGRUCCI *et al.* 1997; LEMAIRE *et al.* 2000).
- Corrientes hidrodinámicas que favorezcan la retención larvaria. Como ejemplo típico tenemos el frente oceanográfico Almería-Orán (TINTORE *et al.* 1988). El Mar de Alborán es una zona de transición entre el Océano Atlántico y el Mar Mediterráneo, en el que tiene lugar la entrada de una corriente atlántica de agua en superficie que cambia de salinidad al mezclarse con agua de origen mediterráneo. Esta corriente atlántica forma dos giros anticiclónicos que determinarían una barrera a la dispersión de larvas entre ambas cuencas, como se ha propuesto en el caso de la lubina (NACIRI *et al.* 1999) o el dentón (BARGELLONI *et al.* 2003).
- Historia geológica. La existencia de dos haplotipos mitocondriales filogenéticamente divergentes de origen atlántico y mediterráneo, en especies tales como la lubina (ALLEGRUCCI *et al.* 1999; LEMAIRE *et al.* 2005) o el dentón (BARGELLONI *et al.* 2003) se ha asociado a los cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno. Como consecuencia de las glaciaciones ocurridas durante este período el nivel del mar disminuyó más de 100 m con respecto al nivel actual, lo que redujo el flujo génico entre las cuencas atlántica y mediterránea.

d) Causas genéticas tales como selección, mutación, flujo génico y deriva genética (revisado en HARTL y CLARK 1997).



TABLA 1.
Fuentes de diferenciación genética entre poblaciones

Características biológicas de la especie
Fecundidad
Edad y tamaño de madurez
Duración de la larva planctónica
Homing en reproductores
Cortejo
Factores demográficos
Reclutamiento
Crecimiento
Reproducción
Movimientos de gametos, larvas o juveniles
Mortalidad
Aislamiento geográfico por barreras físicas
Gradientes de temperatura y salinidad
Corrientes hidrodinámicas
Historia geológica
Causas genéticas
Selección
Mutación
Flujo génico
Deriva genética

Cada especie marina se ha visto afectada diferencialmente por los factores anteriormente mencionados. Por ello, a continuación se hará una síntesis de los principales estudios genéticos sobre poblaciones salvajes y criadas en cautividad de especies de peces marinos, así como de los principales factores que explicarían su estructuración y diferenciación genética.

4. DORADA: *Sparus aurata* (LINNAEUS, 1758)

La dorada es actualmente la especie marina cuya cría en cautividad está más extendida en los países mediterráneos, tanto en sistemas extensivos como en intensivos. Su distribución abarca todo el Mar Mediterráneo, aunque escasamente presente en el Mar Negro, y el Océano Atlántico, desde las Islas Británicas hasta Cabo Verde y alre-



dedor de las Islas Canarias (BAUCHOT y HUREAU 1986). La producción de dorada en acuicultura comenzó a ser importante ya en 1992, cuando por primera vez superó a las capturas totales de la pesca extractiva, con más de 10.000 Tm. En el año 2004, la producción total en acuicultura alcanzó las 90.000 Tm. En el Mediterráneo, los mayores productores de dorada son Grecia, Turquía y España, con unas producciones totales en el año 2004 de 36.000, 20.000 y 14.000 Tm, respectivamente (FAO, 2006).

4.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico (Tabla 2)

En el **área mediterránea**, se ha observado un grado moderado de estructuración genética. Dentro de un ámbito local, se diferenciaron dos grupos genéticamente divergentes a lo largo de las costas de Túnez ($F_{ST} = 0,093$) mediante el análisis de 21 *loci* aloenzimáticos. Las poblaciones del norte, con un mayor grado de diversidad genética, se podían diferenciar de las del sur del país (BEN SLIMEN *et al.* 2004). De igual forma, el análisis de 6 poblaciones del Mar de Cerdeña, Mar Tirreno y Mar Adriático en base a 4 *loci* microsatélites mostró que estas poblaciones formaban un grupo genéticamente heterogéneo (F_{ST} máximo de 0,028), siendo la población del Mar Adriático la más diferenciada, con valores de F_{ST} entre 0,011 y 0,025 (DE INNOCENTIS *et al.* 2004). Los resultados de estos estudios se podrían extender a toda la cuenca mediterránea, ya que el análisis de 23 *loci* aloenzimáticos y 3 microsatélites en poblaciones naturales tan alejadas como Murcia, Trieste (Mar Adriático) y Mesolaggi (Mar Jónico) confirmaron una diferenciación genética moderada en el Mediterráneo ($F_{ST} = 0,005-0,024$ y $0,013-0,025$ con aloenzimas y microsatélites, respectivamente) (ALARCÓN *et al.* 2004).

Respecto a la diferenciación entre **poblaciones atlánticas y mediterráneas** de dorada se ha observado, igualmente, un nivel moderado de estructuración genética. El análisis conjunto de una población atlántica (Golfo de Cádiz) y 6 mediterráneas con 4 *loci* aloenzimáticos resultó en un valor bajo, aunque significativo, de F_{ST} (0,010) (DE INNOCENTIS *et al.* 2004). Mayor diferenciación se encontró entre 3 poblaciones atlánticas (costa suroeste francesa, norte de Portugal y Golfo de Cádiz)



TABLA 2.
Diferenciación genética de poblaciones de dorada.

Área geográfica	Marcador	Diferenciación	Autor
Mediterráneo	Aloenzimas 21 loci	$F_{ST} = 0,093^*$	Ben Slimen <i>et al.</i> , 2004
	Microsatélites 4 loci	$F_{ST} = 0,028^*$	De Innocentiis <i>et al.</i> , 2004
	Aloenzimas 23 loci	$F_{ST} = 0,005-0,024^*$	
	Microsatélites 3 loci	$F_{ST} = 0,013^*-0,025^{**}$	Alarcón <i>et al.</i> , 2004
Atlántico vs Mediterráneo	Microsatélites 4 loci	$F_{ST} = 0,010^{***}$	De Innocentiis <i>et al.</i> , 2004
	Aloenzimas 23 loci	$F_{ST} = 0,031$	Alarcón <i>et al.</i> , 2004
	Microsatélites 3 loci	$F_{ST} = 0,036$	
Atlántico	Aloenzimas 23 loci	$F_{ST} = 0,010-0,023^*$	Alarcón <i>et al.</i> , 2004
	Microsatélites 3 loci	$F_{ST} = 0,011-0,047^{**}$	
Cautividad vs salvajes	Aloenzimas 23 loci	$F_{ST} = 0,021^*-0,065^{**}$	Alarcón <i>et al.</i> , 2004
	Microsatélites 3 loci	$F_{ST} = 0,018^{**}-0,069^{**}$	

y 2 mediterráneas (Murcia y Mesologgi) (F_{ST} global de 0,031 y 0,036 en base a aloenzimas y microsatélites, respectivamente) (ALARCÓN *et al.* 2004). Habría que destacar la ausencia de diferenciación entre poblaciones del Atlántico y Mar Adriático (ALARCÓN *et al.* 2004; DE INNOCENTIS *et al.* 2004) y que se discutirá posteriormente.

En relación a las **poblaciones atlánticas**, también se ha detectado un grado de estructuración genética moderado. Alarcón y colaboradores (2004) observaron diferencias significativas entre una población de Portugal y otra del Golfo de Cádiz en base a aloenzimas y microsatélites ($F_{ST} = 0,023$ y $0,041$, respectivamente), así como entre el Golfo de Cádiz y Francia ($F_{ST} = 0,047$), sólo con microsatélites.

El patrón de estructuración detectado en las poblaciones mediterráneas y atlánticas de dorada resulta difícil de explicar en base a factores geográficos u oceanográficos. Por ello, se ha propuesto que dicha estructuración podría deberse a un efecto combinado de otros factores tales como fluctuaciones en N_e con efectos de cuello de botella y expansiones posteriores, o bien tasas de flujo génico variables entre poblaciones, ligadas a la actividad acuícola llevada a cabo por el hombre (ALARCÓN *et al.* 2004; DE INNOCENTIS *et al.* 2004).



4.2. Diferenciación entre doradas salvajes y en cautividad

De forma genérica, la comparación de doradas criadas en cautividad con aquellas procedentes del medio natural más próximo (Portugal, Golfo de Cádiz, Alicante, Mar Adriático y Mar Egeo/Jónico) ha puesto de manifiesto una pérdida de variabilidad genética tanto en el número de alelos por *locus* como en los valores de heterocigosidad (ALARCÓN *et al.* 2004). Estas diferencias en las frecuencias alélicas para los distintos *loci* han favorecido la diferenciación entre poblaciones criadas en cautividad con respecto a las poblaciones naturales (F_{ST} entre 0,021 y 0,065 para aloenzimas; entre 0,018 y 0,069 con microsatélites). Tales niveles de diferenciación se explicarían por múltiples factores: un efecto fundador en la creación de los lotes de reproductores originales, existencia de un N_e pequeño dentro de los lotes en cautividad, o la incorporación de animales procedentes de generaciones F1 o incluso F2. A este respecto hay que destacar que al determinar el origen geográfico de los reproductores de 2 instalaciones acuícolas mediterráneas, en un alto porcentaje se identificaron como de origen atlántico (DE INNOCENTIIS *et al.* 2005). Esto explicaría la homogeneidad genética existente entre las poblaciones naturales del Atlántico y las del Adriático, al haber dado lugar a la introgresión de genes atlánticos en las poblaciones mediterráneas, por ejemplo, como consecuencia de escapes accidentales en jaulas (DE INNOCENTIIS *et al.* 2004).

5. LUBINA: *Dicentrarchus labrax* (LINNAEUS, 1758)

La lubina es una especie eurihalina y euritérmica que habita tanto en lagunas como en estuarios y medios marinos. El área geográfica de distribución es muy amplia, abarcando desde Noruega a Marruecos en el Atlántico nororiental, y desde el Mediterráneo occidental hasta el Mar Negro (TORTONESE 1986a). Dada su importancia comercial, se han llevado a cabo numerosos estudios encaminados a determinar la estructuración y diferenciación genética de poblaciones naturales según su origen geográfico o hábitat, así como con respecto a poblaciones cultivadas.



5.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico (Tabla 3)

En el **área mediterránea** se han identificado dos unidades genéticas bien diferenciadas: *Mediterráneo oriental* y *occidental*. Esta estructuración ha sido confirmada con todos los marcadores moleculares analizados. En base a aloenzimas (28 *loci*) Allegrucci y colaboradores (1997) diferenciaron las poblaciones del Golfo de León y de las procedentes del Mar Tirreno y Jónico. Los mayores niveles de diferenciación se observaron entre el Golfo de León y una población ubicada en Grecia ($F_{ST} = 0,565$). Estos valores tan altos de F_{ST} se debieron a que esta última población correspondía a una F1 en la que solaparían efectos de erosión genética a causa de la cría en cautividad. Estos datos fueron confirmados mediante el análisis de *RAPDs* (CACCONE *et al.* 1997), secuenciación del gen mitocondrial citocromo *b* (1140 pb) (ALLEGRUCCI *et al.* 1999), la caracterización de repeticiones en tándem de la región de control mitocondrial (CESARONI *et al.* 1997), así como con marcadores microsatélites (BAHRI-SFAR *et al.* 2000). Hay que destacar la mayor heterogeneidad genética de las poblaciones del Mediterráneo oriental, que se explicaría por factores hidrodinámicos de las distintas cuencas (Mar Tirreno, Adriático, Jónico, Egeo) así como por la posible influencia de la acuicultura, tal como se verá más adelante.

A escala más local, el grado de estructuración en el Mediterráneo es pequeño. Por ejemplo, se han conseguido diferenciar, en base a 6 *loci* microsatélites, poblaciones del Golfo de León y de Valencia, aunque con valores muy moderados de F_{ST} (0,004-0,007) (GARCÍA DE LEÓN *et al.* 1997). De hecho, esta estructuración no fue confirmada por Naciri y colaboradores (1999), al ampliar el estudio a otras 5 poblaciones del Mediterráneo occidental ($F_{ST} = 0,002$, no significativa).

Todos los marcadores moleculares utilizados para el estudio de **poblaciones atlánticas y mediterráneas** de lubina también han mostrado la existencia de una clara diferenciación genética entre ambas cuencas. A nivel mitocondrial se han identificado 2 linajes (mitotipos) según su origen atlántico o mediterráneo (ALLEGRUCCI *et al.* 1999). Al estudiar su distribución en 10 poblaciones atlánticas (incluyendo Mar de Alborán) y 8 mediterráneas se comprobó como ambos mitotipos se distribuían claramente según el origen geográfico, dando



TABLA 3.
Diferenciación genética de poblaciones de lubina.

Área geográfica	Marcador		Diferenciación	Autor
Mediterráneo	Aloenzimas	28 loci	$F_{ST} = 0,339^{**}$	Allegrucci <i>et al.</i> , 1997
	RAPDs	107 bandas	Distancia Nei 0,212-0,240	Caccone <i>et al.</i> , 1997
	Mitocondrial	citocromo <i>b</i>	Bootstrap 75-88	Allegrucci <i>et al.</i> , 1999
	Mitocondrial	D-loop (VNTRs)	4.3% entre poblaciones	Cesaroni <i>et al.</i> , 1997
	Microsatélites	6 loci	$F_{ST} = 0,0136^{***}$	Bahri-Sfar <i>et al.</i> , 2000
Mediterráneo Occidental	Microsatélites	6 loci	$F_{ST} = 0,004-0,007^{*}$	García de León <i>et al.</i> , 1997
	Microsatélites	6 loci	$F_{ST} = 0,0014$ ns	Bahri-Sfar <i>et al.</i> , 2000
	Microsatélites	6 loci	$F_{ST} = 0,002$ ns	Naciri <i>et al.</i> , 1999
Atlántico vs Mediterráneo	Aloenzimas	28 loci	Bootstrap 83	Allegrucci <i>et al.</i> , 1997
	Mitocondrial	citocromo <i>b</i>	Bootstrap 77-88	Allegrucci <i>et al.</i> , 1999
	Microsatélites	6 loci	$F_{ST} = 0,023^{***}$	Naciri <i>et al.</i> , 1999
	Mitocondrial	citocromo <i>b</i>	$F_{ST} = 0,676^{***}$	Lemaire <i>et al.</i> , 2005
	Microsatélites	6 loci	$F_{ST} = 0,023^{***}$	
Atlántico	Aloenzimas	38 loci	$F_{ST} = 0,0108^{**}$	Castilho & McAndrew, 1998
	Microsatélites	6 loci	$F_{ST} = 0,010^{***}$ Efecto temporal	Naciri <i>et al.</i> , 1999
	Microsatélites	8 loci	$F_{ST} = 0,001$ ns	Fritsch <i>et al.</i> , 2006
Laguna vs Mar	Aloenzimas	28 loci	$F_{ST} = 0,112^{**}$	Allegrucci <i>et al.</i> , 1997
	RAPDs	107 bandas	11 de 107	Caccone <i>et al.</i> , 1997
	Aloenzimas	13 loci	$F_{ST} = 0,114^{***}$	Lemaire <i>et al.</i> , 2000
	Microsatélites	6 loci	$F_{ST} = 0,0169^{***}$	
Cautividad vs salvajes	Aloenzimas	34 loci	Déficit heterocigotos	Martínez-Rodríguez <i>et al.</i> , 1998
	Aloenzimas	35 loci	Déficit heterocigotos	Sola <i>et al.</i> , 1998
	Mitocondrial	citocromo <i>b</i>	Haplotipos diferentes	Patarnello <i>et al.</i> , 1993
	Microsatélites	6 loci	No correspondencia con origen geográfico	Bahri-Sfar <i>et al.</i> , 2000
	Microsatélites	6 loci	Menor diversidad alélica	Bahri-Sfar <i>et al.</i> , 2005
	Mitocondrial	citocromo <i>b</i>	No correspondencia con origen geográfico	Abdel <i>et al.</i> , 2004
	Microsatélites	4 loci	Déficit heterocigotos	



lugar a valores muy altos de F_{ST} (0,67) (LEMAIRE *et al.* 2005). Sólo en 2 poblaciones del Mar de Alborán se encontraron proporciones similares de ambos mitotipos, sugiriendo un papel como zona de transición (LEMAIRE *et al.* 2005). Las distancias medias estimadas para los mitotipos atlántico y mediterráneo (0,09), también confirmadas con aloenzimas (0,236), están próximas a los valores de diferenciación entre especies tales como *D. labrax* y *Dicentrarchus punctatus* (ALLEGRUCCI *et al.*, 1997; ALLEGRUCCI *et al.*, 1999). Los mayores valores de diversidad haplotípica y nucleotídica en las poblaciones atlánticas apoyarían la idea de que el mitotipo mediterráneo se podría haber originado a partir del primero tras un período de aislamiento geográfico durante las glaciaciones ocurridas en el Pleistoceno.

Esta diferenciación entre Océano Atlántico y Mar Mediterráneo también se ha observado con microsatélites. Datos obtenidos a partir de 6 *loci* en 12 poblaciones del Atlántico y 5 del Mediterráneo occidental así lo confirman, con un valor de F_{ST} de 0,023 muy significativo. La inclusión de 6 poblaciones del Norte de Marruecos permitió establecer la zona de discontinuidad genética en el frente oceanográfico Almería-Orán (NACIRI *et al.* 1999). Sin embargo, esta barrera hidrogeográfica explicaría sólo parte de la diferenciación, aquella relativa a la dispersión de larvas. Por ello, algunos autores sugieren además la existencia de una barrera genética para explicar las discrepancias en los niveles de diferenciación entre marcadores mitocondriales y nucleares (F_{ST} ~30 veces superior en base a marcadores mitocondriales que microsatélites) (LEMAIRE *et al.* 2005). Estos autores proponen que los híbridos de lubina (según mitotipo) se diferenciarían preferentemente hacia macho, sesgando la transmisión de carácter materno, y favoreciendo un alto grado de estructuración a nivel mitocondrial.

Respecto a las **poblaciones atlánticas**, los diferentes estudios llevados a cabo muestran resultados contradictorios. Castilho y McAndrew, en base a aloenzimas y microsatélites, encontraron un grado de diferenciación moderado entre las poblaciones del Algarve y las del Norte de Portugal (CASTILHO y McANDREW, 1998b). En un estudio poblacional más amplio que incluía localizaciones desde Amberes (Mar del Norte, Bélgica) hasta Nador (Mar de Alborán) también se encontraron diferencias poblacionales moderadas (F_{ST} global = 0,01),



mostrándose Amberes como la más distante. No obstante, parte de esta diferenciación se debía a diferencias de carácter temporal e inter-cohortes, ya que las muestras recogidas en un mismo área geográfica pero en fechas diferentes no se agrupaban filogenéticamente (NACIRI *et al.* 1999). Un estudio más reciente (FRITSCH *et al.* 2006) basado en 8 *loci* microsatélites tampoco detectó estructuración poblacional ($F_{ST} = 0,001$) entre el Golfo de Vizcaya y el Canal de la Mancha, a pesar de que sólo un pequeño porcentaje de lubinas (4% de recapturados) era capaz de cambiar de cuenca en un período de tiempo corto tras la liberación.

5.2. Diferenciación en base a su ecología

Si bien los estudios de diferenciación genética según el origen geográfico han demostrado una fuerte estructuración de las poblaciones de lubina en el Mar Mediterráneo, así como entre el Mediterráneo y el Atlántico, la diversidad de hábitats en los que esta especie vive ha propiciado el desarrollo de estudios encaminados a determinar la diferenciación genética según el hábitat (marino o lagunas interiores).

Tanto las aloenzimas como los RAPDs han puesto de manifiesto diferenciación según el hábitat sea laguna o marino (ALLEGROCCI *et al.* 1997; CACCONE *et al.* 1997; LEMAIRE *et al.* 2000). Por el contrario, no se ha observado diferenciación con microsatélites (LEMAIRE *et al.* 2000). Tal discrepancia entre marcadores se debería a que las aloenzimas y bandas de RAPDs no seguirían un modelo de evolución neutral, estando ligados bien directa o indirectamente a procesos metabólicos implicados en la capacidad de adaptación y supervivencia a condiciones fluctuantes de salinidad. Esta hipótesis de selección adaptativa (LEMAIRE *et al.* 2000) vendría avalada por los cambios en frecuencias alélicas para algunas aloenzimas (ALLEGROCCI *et al.* 1994) o en los patrones de RAPDs (ALLEGROCCI *et al.* 1995) tras exponer lubinas a distintas condiciones de salinidad.

5.3. Diferenciación entre lubinas salvajes y en cautividad

Es práctica habitual en los centros de producción de especies marinas la creación de lotes de reproductores a partir de animales del medio natural y de descendientes (bien F1 o F2) de aquellos lotes que históricamente tuvieron un comportamiento productivo óptimo.



Esta forma de operar ha llevado a importantes reducciones en la variabilidad genética de los lotes en cautividad respecto a sus poblaciones de origen. Así, Martínez-Rodríguez y colaboradores (1998), al caracterizar una población en cautividad de lubinas a la que se le incorporaron reproductores criados en cautividad, encontraron una reducción del índice de polimorfismo y de hasta un 31% en la heterocigosidad observada respecto a una población natural atlántica. De forma análoga, Sola y colaboradores (1998) demostraron diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de aloenzimas entre animales en cautividad y salvajes, con un alto número de *loci* en desequilibrio de Hardy-Weinberg por déficit de heterocigotos.

El impacto del manejo de reproductores en explotaciones de acuicultura sobre la variabilidad y estructura genética de los lotes también se ha puesto de manifiesto mediante marcadores mitocondriales. Así, el análisis de un fragmento de 462 pb del gen citocromo *b*, permitió detectar una distribución haplotípica diferente en 6 poblaciones naturales del Mediterráneo (desde Cerdeña al Adriático) y de 2 producidas en cautividad (PATARNELLO *et al.* 1993). Mientras que ambos grupos compartían 1 solo haplotipo (haplotipo A), las poblaciones naturales presentaban los haplotipos únicos B y C (34,5% y 3,4%, respectivamente) y las poblaciones en cautividad los haplotipos D y E (18,2 y 9,1%, respectivamente) (PATARNELLO *et al.* 1993).

Respecto al impacto de la acuicultura sobre las poblaciones naturales, son numerosos los estudios que demuestran como la liberación no controlada de animales puede llegar a producir una alteración en la estructura genética de las poblaciones nativas. Así, Bahri-Sfar y colaboradores (2000) observaron como una población del Mediterráneo oriental (Egipto) se encontraba próxima filogenéticamente a las del Mediterráneo occidental. Posteriormente, este estudio se amplió con nuevas poblaciones naturales (5 y 7 poblaciones del Mediterráneo occidental y oriental, respectivamente) y 3 procedentes de instalaciones de acuicultura francesa, observando como 3 de las poblaciones orientales estaban más próximas a las occidentales que a las de su mismo origen geográfico. Además, estas 3 poblaciones, junto a una de las producidas en cautividad, presentaron valores inferiores de diversidad alélica (BAHRI-SFAR *et al.* 2005). De igual forma, en un estudio llevado



a cabo en el litoral mediterráneo murciano se analizaron 41 ejemplares de lubina, 26 procedentes de Mazarrón y 15 de San Pedro del Pinatar. Sorprendentemente, sólo 6 ejemplares de Mazarrón fueron del mitotipo mediterráneo. Además, los individuos de origen atlántico se caracterizaron por mostrar un déficit de heterocigotos, así como una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (ABDEL *et al.* 2004).

El grupo de trabajo ICES sobre la interacción ambiental de la acuicultura (ICES MARICULTURE COMMITTEE 2004) ya se ha hecho eco de la importancia de la producción acuícola de lubina en jaulas y los posibles impactos sobre las poblaciones naturales. No existen cifras sobre escapes en jaulas, pero si se asume un 3% (según ocurre en jaulas de salmónidos) para una jaula de 1.000.000 de animales, se obtendrían aproximadamente unos 30.000 animales liberados, cifra similar a la población salvaje en su entorno (~50.000) (ICES MARICULTURE COMMITTEE 2004) y al valor N_e (35.000) de lubina en el Mediterráneo occidental (GARCÍA DE LEÓN *et al.* 1997). Por otro lado, hay que considerar que los animales en jaula pueden llegar a madurar sexualmente, liberando gametos al medio, favoreciendo de esta forma la introgresión de genes de lubinas de crianza en las poblaciones naturales.

Dada la fuerte estructuración de esta especie en el Mediterráneo y su diferenciación respecto a las del Atlántico, y la existencia de estudios que indican una clara influencia de las poblaciones cultivadas sobre las salvajes, el comité ICES (ICES MARICULTURE COMMITTEE 2004), en síntesis, propone: *i*) la utilización de lubinas de origen local para su producción, ligado a una mejora de las tecnologías para la reducción de los escapes; *ii*) controlar la variabilidad genética de los animales en cautividad, especialmente cuando se desarrolla algún plan de mejora; *iii*) el uso de peces estériles, especialmente triploides o híbridos interespecíficos, como con su congénere *D. punctatus*.

6. RODABALLO: *Scophthalmus maximus* (LINNAEUS, 1758)

El rodaballo es hoy en día una de las especies de peces planos más importantes desde un punto de vista comercial. Su distribución abarca todas las costas europeas, desde Noruega hasta Marruecos



en el Océano Atlántico, incluyendo el Mar Báltico, así como el Mar Mediterráneo, extendiéndose incluso hasta el Mar Negro (NIELSEN 1986; BLANQUER *et al.* 1992).

En la década de los noventa, y como consecuencia de un descenso importante en las capturas, se potenció enormemente la crianza de esta especie (revisado en APROMAR 2006). Dado que las aguas de las costas de Galicia presentaban condiciones óptimas para el cultivo de rodaballo, pronto se obtuvieron avances muy importantes en aspectos relacionados con la alimentación y el crecimiento de los animales en cautividad (IGLESIAS y RODRÍGUEZ-OJEDA 1994).

6.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico (Tabla 4)

En el **área mediterránea** todos los estudios realizados indican la existencia de un grado moderado de heterogeneidad genética entre las poblaciones occidentales y orientales. A nivel de aloenzimas, el análisis de 17 *loci* en poblaciones del Mediterráneo occidental (Golfo de León y Mar Adriático) y oriental (Mar Egeo) no detectó diferenciación genética entre dichas poblaciones, salvo la población del Mar Egeo (BLANQUER *et al.* 1992). De igual modo, el análisis filogenético en base a la región de control mitocondrial de individuos del Mediterráneo occidental (España) y oriental (Mar Egeo, Mar de Mármara, Mar Negro y Mar de Azov), demostró la existencia de dos linajes claramente diferenciados, correspondientes a las áreas occidental y oriental (con menor variabilidad genética en esta última) (SUZUKI *et al.* 2004). El origen de dicha diferenciación se ha asociado a un efecto de cuello de botella producido durante la última glaciación (hace 20.000-30.000 años), siendo el Mar Negro el origen filogeográfico más probable de las poblaciones del Mediterráneo oriental (BLANQUER *et al.* 1992; SUZUKI *et al.* 2004).

Por el contrario, las poblaciones **atlánticas y mediterráneas** occidentales muestran un alto grado de homogeneidad genética. Los análisis de aloenzimas y de la región de control mitocondrial no mostraron diferencias entre ambas cuencas (BLANQUER *et al.* 1992; SUZUKI *et al.* 2004). Dicha homogeneidad ha sido interpretada como consecuencia de los eventos climáticos que tuvieron lugar durante las glaciaciones, los cuales habrían llevado a la extinción de la población



TABLA 4.
Diferenciación genética de poblaciones de rodaballo.

Área geográfica	Marcador		Diferenciación	Autor
Mediterráneo	Aloenzimas	17 <i>loci</i>	Distintas frecuencias alélicas	Blanquer <i>et al.</i> , 1992
	ADNmt	D-loop	Bootstrap >80	Suzuki <i>et al.</i> , 2004
Atlántico vs Mediterráneo	Aloenzimas	17 <i>loci</i>	Distintas frecuencias alélicas	Blanquer <i>et al.</i> , 1992
	ADNmt	D-loop	Bootstrap >80	Suzuki <i>et al.</i> , 2004
Atlántico	Aloenzimas	17 <i>loci</i>	Distintas frecuencias alélicas	Blanquer <i>et al.</i> , 1992
	Aloenzimas	35 <i>loci</i>	$G_{ST} = 0,012$ ns	Bouza <i>et al.</i> , 1997
	Microsatélites	3 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,009$ ns	Coughland <i>et al.</i> , 1998
	Aloenzimas	28 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,002$ ns	Bouza <i>et al.</i> , 2002
	Microsatélites	12 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,002$ ns	
	Microsatélites	8 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0-0,032^*$	Nielsen <i>et al.</i> , 2004
	Microsatélites	8 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,004$ ns	Florin y Höglund, 2006
Cautividad vs salvajes	Aloenzimas	35 <i>loci</i>	Déficit heterocigotos $G_{ST} = 0,055$	Bouza <i>et al.</i> , 1997
	Microsatélites	3 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,010-0,037$ ns	Coughland <i>et al.</i> , 1998
	Aloenzimas	28 <i>loci</i>	Déficit heterocigotos	Bouza <i>et al.</i> , 2002
	Microsatélites	12 <i>loci</i>		

del Mediterráneo, seguido de una posterior recolonización durante los periodos interglaciares desde el Atlántico (BLANQUER *et al.* 1992).

Dentro del área **atlántica**, también se ha observado un alto grado de homogeneidad genética. Blanquer y colaboradores (1992) no encontraron diferenciación entre 7 poblaciones atlánticas. Asimismo, pero a nivel más local, el análisis de 35 *loci* aloenzimáticos tampoco sirvió para encontrar diferenciación entre 3 poblaciones naturales de las costas gallegas ($G_{ST} = 0,012$) (BOUZA *et al.* 1997). Dichos resultados se confirmaron mediante el análisis combinado de 28 *loci* aloenzimáticos ($F_{ST} = 0,002$) y 12 *loci* microsatélites ($F_{ST} = 0,002$) en dos poblaciones de las costas atlántica y cantábrica de Galicia (BOUZA *et al.* 2002). En otras áreas geográficas del Atlántico como Irlanda y Noruega o Golfo de Vizcaya y Mar del Norte tampoco se encontró diferenciación (COUGHLAN *et al.* 1998; NIELSEN *et al.* 2004). Sólo entre el Mar Báltico y el Mar del Norte se han determinado diferencias significativas ($F_{ST} = 0,032$). Además, se detectó una zona de transición entre



ambas áreas, con cambios muy rápidos en la composición genética, y con un claro efecto de aislamiento por distancia. La existencia de dicho patrón de aislamiento por distancia se cuestionó en un estudio posterior al analizar nuevamente un total de 9 poblaciones distintas del Mar Báltico, con valores de diferenciación genética bajos ($F_{ST} = 0,004$) (FLORIN y HÖGLUND 2006). Se ha propuesto que tal discrepancia en los resultados podría deberse a un efecto temporal en los muestreos. En esta zona se producen de forma cíclica cambios en la salinidad y por tanto en el contenido de oxígeno del agua, como consecuencia de la entrada de agua de mayor salinidad procedente del Mar del Norte, condiciones que pueden afectar a la capacidad de dispersión de las larvas y/o a la migración de los individuos adultos (FLORIN y HÖGLUND 2006).

6.2. Diferenciación entre rodaballos salvajes y en cautividad

Al igual que lo observado en otras especies, los resultados de los distintos estudios genéticos en rodaballo indican, de forma general, la existencia de una menor variabilidad genética en las poblaciones criadas en cautividad. En este sentido, la heterocigosidad media determinada en base a 35 *loci* aloenzimáticos de 8 lotes diferentes de rodaballo provenientes de instalaciones de cría de Galicia, Italia y Dinamarca fue menor (0,022-0,023) que la de 3 poblaciones naturales de las costas gallegas (0,029) (BOUZA *et al.* 1997). Resultados similares se obtuvieron con el uso combinado de aloenzimas y microsatélites entre 2 poblaciones naturales de Galicia y una población en cautividad, con valores de heterocigosidad menores tanto con aloenzimas (0,006 frente a 0,021) como con microsatélites (0,68 frente a 0,77) (BOUZA *et al.* 2002). Además, mientras todos los *loci* se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg en las poblaciones naturales de rodaballo, 3 de ellos no lo estaban en la de cautividad, con un descenso acusado en el número medio de alelos por locus (6,50 frente a 11,25 de las poblaciones naturales).

En contraposición con las observaciones anteriores, los valores de heterocigosidad de 2 poblaciones en cautividad de Irlanda (0,66) y Noruega (0,68) fueron similares a los de sus respectivas poblaciones naturales (0,66 y 0,71, respectivamente) (COUGHLAN *et al.* 1998).



7. LENGUADO COMÚN: *Solea solea* (LINNAEUS, 1758)

Esta especie se distribuye en el Atlántico oriental, desde el Mar Báltico hasta Senegal, y por el Mar Mediterráneo (BAUCHOT *et al.* 1986).

7.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico (Tabla 5)

En el **Mediterráneo**, al igual que ocurre en la lubina, los resultados de diversos estudios muestran una diferenciación genética clara entre las poblaciones del Mediterráneo occidental y oriental. La caracterización de aloenzimas (12 *loci*) estableció una correlación positiva entre distancia genética y geográfica (KOTOULAS *et al.* 1995). Del mismo modo, el análisis de marcadores mitocondriales (región de control) mostró la existencia de dos mitotipos diferentes, A y B, de reciente evolución y débilmente soportados. La distribución diferencial de ambos mitotipos (tipo B encontrado principalmente en poblaciones de Sicilia) provocó que se alcanzaran valores de F_{ST} entre 0,23 y 0,49 entre una población del Mar Jónico y otras poblaciones del Mar Adriático, Mar Tirreno y Mar de Liguria (GUARNIERO *et al.* 2002). Dicha estructuración entre Mediterráneo occidental-oriental también se ha puesto de manifiesto mediante marcadores nucleares EPIC ($F_{ST} = 0,135$), detectándose asimismo un alto grado de diferenciación tanto de las poblaciones del Mediterráneo oriental como occidental con respecto a las del Adriático (ROLLAND *et al.* 2006). Este patrón de estructuración se ha explicado en base a distintos factores. Por un lado, las glaciaciones del período cuaternario, con la formación de distintos refugios en el Mediterráneo y posterior recolonización desde el Atlántico, que permitiría distinguir ambas cuencas Mediterráneas. Además, habría que considerar factores ambientales tales como la tolerancia a la temperatura y salinidad de las larvas (GUARNIERO *et al.* 2002; KOTOULAS *et al.* 1995).

Por el contrario, y en relación a la diferenciación **atlántico-mediterránea** en el lenguado común, existen resultados contradictorios. Aunque los primeros análisis basados en aloenzimas reflejaron valores de F_{ST} moderados (0,0147), pero significativos, entre poblaciones



TABLA 5.
Diferenciación genética de poblaciones de lenguado común.

Área geográfica	Marcador		Diferenciación	Autor
Mediterráneo	Aloenzimas	12 <i>loci</i>	análisis multidimensional	Kotoulas <i>et al.</i> , 1995
	Mitocondrial	D-loop	$F_{ST} = 0,23-0,49^{***}$	Guarniero <i>et al.</i> , 2002
	EPIC	3 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,135^{***}$	Rolland <i>et al.</i> , 2006
Atlántico vs Mediterráneo	Aloenzimas	12 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,0147^{***}$	Kotoulas <i>et al.</i> , 1995
	Aloenzimas	33 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,026$ ns	Exadactylos <i>et al.</i> , 1998
	Aloenzimas	9 <i>loci</i>	Diferentes clados	Cabral <i>et al.</i> , 2003
	EPIC	3 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,068^{***}$	Rolland <i>et al.</i> , 2006
Atlántico	Aloenzimas	12 <i>loci</i>	$F_{ST} = -0,0005$ ns	Kotoulas <i>et al.</i> , 1995
	Aloenzimas	33 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,021$ ns	Exadactylos <i>et al.</i> , 1998
	Aloenzimas	9 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,013$ ns	Cabral <i>et al.</i> , 2003
	RAPDs	37 bandas	$F_{ST} = 0,193^{***}$	Exadactylos <i>et al.</i> , 2003
	EPIC	3 <i>loci</i>	$F_{ST} = 0,009$ ns	Rolland <i>et al.</i> , 2006
Cautividad vs salvajes	Aloenzimas	14 <i>loci</i>	Menor diversidad alélica	Exadactylos <i>et al.</i> , 1999
			Menor heterocigiosidad	

comprendidas entre el Mar del Norte y Grecia (KOTOULAS *et al.* 1995), éstos no se confirmaron en estudios posteriores en el mismo área geográfica (33 *loci* aloenzimáticos; F_{ST} global = 0,026) (EXADACTYLOS *et al.* 1998; EXADACTYLOS y THORPE 2001). Sólo mediante un análisis de clusters basado en distancias genéticas se consiguieron diferenciar las poblaciones de ambas cuencas (EXADACTYLOS *et al.* 1998). Esta separación Atlántico-Mediterráneo tampoco quedó totalmente definida en un estudio posterior basado en filogenia (CABRAL *et al.* 2003). Sólo recientemente, mediante marcadores nucleares EPIC, se han obtenido valores de diferenciación mayores ($F_{ST} = 0,068$) (ROLLAND *et al.* 2006)

En el **área atlántica** se considera que las poblaciones de lenguado común están próximas a la panmixia. Mediante el análisis de 33 (EXADACTYLOS *et al.* 1998), 9 (CABRAL *et al.* 2003) o 12 (KOTOULAS *et al.* 1995) *loci* aloenzimáticos no se observó diferenciación significativa desde Portugal hasta el Mar del Norte (F_{ST} entre 0,01-0,02). Idénticos resultados fueron observados mediante marcadores EPIC ($F_{ST} = 0,009$) (ROLLAND *et al.* 2006). Sólo con el análisis de 37 marcadores RAPDs se pudieron diferenciar poblaciones en las Islas Británicas de aquellas con-



tinenciales próximas al Canal de la Mancha y Mar del Norte ($F_{ST} = 0,193$) (EXADACTYLOS *et al.* 2003). La profundidad de la plataforma continental en estas áreas parece que podría actuar como una barrera que dificultaría el flujo genético.

7.2. Diferenciación entre el lenguado común salvaje y en cautividad

En acuicultura, al igual que en otras especies, los lotes en cautividad muestran una reducción en la variabilidad genética. La distancia genética entre 2 lotes de lenguado cultivados calculada mediante 14 *loci* aloenzimáticos fue unas 3 veces inferior a la observada entre poblaciones naturales del mismo área geográfica (noruega o irlandesa) (EXADACTYLOS *et al.* 1999). Esta reducción de la variabilidad genética quedó patente en una menor diversidad genética, menor número de *loci* polimórficos, menor número de alelos por locus, una baja heterocigosidad, así como cambios en las frecuencias génicas con respecto a las poblaciones naturales de origen.

8. LENGUADO SENEGALÉS: *Solea senegalensis* (KAUP, 1858)

El lenguado senegalés posee un área de distribución más restringida que el lenguado común, encontrándose en el Atlántico nororiental desde el Golfo de Vizcaya a Senegal, y en el Mediterráneo occidental (BAUCHOT *et al.* 1986). Actualmente, es una de las especies más prometedoras para la diversificación de la acuicultura por su buena tasa de crecimiento y su aceptación en los mercados (revisado en IMSLAND *et al.* 2003). Su gran potencial en acuicultura ha favorecido el desarrollo del proyecto de genómica y proteómica «Pleurogene» para el estudio de los genes y mecanismos implicados en la reproducción, cría y desarrollo larvario, y de marcadores moleculares para el desarrollo de un mapa genético.

8.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico

Respecto a su estructuración en el área **atlántico-mediterránea**, existe poca información. Un estudio filogenético basado en



las distancias genéticas a nivel de aloenzimas permitió diferenciar una población del Ebro de varias poblaciones atlánticas (CABRAL *et al.* 2003). De igual forma, mediante marcadores mitocondriales (región de control) se ha observado que la población del Ebro posee distintas frecuencias haplotípicas que las atlánticas (MANCHADO *et al.* en preparación).

Por el contrario, todos los datos existentes sugieren que en el **área atlántica** las poblaciones están próximas a la panmixia. El análisis de 9 *loci* aloenzimáticos no reveló diferenciación entre varias poblaciones de la costa de Portugal ($F_{ST} = -0,002$) (CABRAL *et al.* 2003). En base a marcadores mitocondriales (región de control) se ha detectado la existencia de dos linajes distintos, con una divergencia media del 1,1%. La aparición de uno de estos mitotipos preferentemente en las poblaciones portuguesas, desde el Algarve hasta Lisboa, permitió su diferenciación respecto del resto de poblaciones atlánticas, incluyendo Galicia, y costas atlántica y mediterránea andaluzas ($F_{ST} = 0,038$) (MANCHADO *et al.* en preparación). De igual forma, mediante 4 *loci* microsatélites también se observó diferenciación entre poblaciones ($F_{ST} = 0,115$), aunque sin una estructuración geográfica clara, ya que las poblaciones de Valdelagrana y Chipiona (Cádiz) aparecieron más cercanas a poblaciones portuguesas que a las de la Bahía o Río San Pedro en El Puerto de Santa María (DÍAZ FERGUSON *et al.* 2005).

8.2. Diferenciación entre el lenguado senegalés salvaje y en cautividad

Con respecto a poblaciones en cautividad de lenguado senegalés, se ha observado un bajo nivel de variabilidad genética. Al analizar 2 poblaciones en cautividad de Cádiz mediante 12 *loci* aloenzimáticos se encontraron valores muy bajos de variabilidad, con una heterocigosidad entre 0,007-0,008 y un número de alelos por locus entre 1,08-1,17 (VEGA *et al.* 2002). En base a microsatélites, 2 estudios diferentes demostraron que los lotes en cautividad que poseían individuos F1 presentaban déficit de heterocigotos (FUNES *et al.* 2004; PORTA *et al.* 2006). Se ha estimado que el número de alelos por locus se podía reducir hasta en un 50% en una sola generación (PORTA *et al.* 2006).



9. BESUGO: *Pagellus bogaraveo* (BRÜNNICH, 1768)

El besugo es un espárido muy apreciado comercialmente en España, alcanzando precios muy elevados en el mercado. Es hermafrodita protandrio, es decir, se desarrolla sexualmente primero como macho, y en una fase más adulta como hembra. Su hábitat natural se reduce fundamentalmente al Océano Atlántico, desde Noruega hasta las Islas Canarias, y a la región occidental del Mar Mediterráneo, estando poco presente o incluso ausente en el Mediterráneo oriental (BAUCHOT y HUREAU 1986). El besugo es una especie que ha sufrido durante la última década una gran sobreexplotación. De hecho, a partir de 1995 se observó una disminución preocupante de las capturas, descenso que se hizo muy acusado en 1998. Tal circunstancia, unida a la gran demanda por parte de los consumidores por esta especie, hicieron considerar seriamente la importancia de desarrollar programas de producción en acuicultura a escala comercial.

9.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico

Dentro del **área mediterránea** los datos existentes muestran que, a diferencia de otras especies de espáridos, como *Dentex dentex* o *Lithognathus mormyrus*, no existen diferencias significativas entre las poblaciones de besugo. El análisis de muestras procedentes de las costas de Alicante, Mar Adriático y Mar Egeo en base a 17 *loci* aloenzimáticos y la región de control mitocondrial así lo indica (BARGELLONI *et al.* 2003).

Una situación similar nos encontramos entre las poblaciones de besugo presentes en las cuencas **atlántica y mediterránea**. A través del análisis de aloenzimas no se han encontrado diferencias significativas entre una población atlántica de las Islas Azores con respecto a poblaciones mediterráneas (F_{ST} entre $-0,003$ y $0,044$) (BARGELLONI *et al.* 2003). De igual forma, en base al análisis de 7 *loci* microsatélites no se encontraron valores significativos de F_{ST} ($0,016$) al estudiar 4 poblaciones atlánticas (Islas Azores, Madeira, Galicia y Algarve) y una mediterránea (formada por individuos procedentes de Malta y del Mar



Jónico) (LEMONS *et al.* 2006). Sólo los marcadores mitocondriales (región de control) han permitido diferenciar poblaciones de ambas cuencas con un valor global de F_{ST} de 0,022 y nivel de significación moderado (BARGELLONI *et al.* 2003).

A diferencia de lo que ocurre en el Mediterráneo, en el **Atlántico** se ha encontrado un alto grado de diferenciación. Al estudiar 6 poblaciones atlánticas diferentes procedentes de las Islas Azores (4), Madeira y Portugal, las poblaciones de las Azores se diferenciaron claramente de las de Madeira y Portugal, tanto en base al análisis de secuencia de la región de control (F_{ST} entre 0,031 y 0,230) como de 7 *loci* microsatélites (F_{ST} entre 0,018 y 0,020) (STOCKLEY *et al.* 2005).

Habría que destacar que tanto las poblaciones atlánticas como las mediterráneas, mostraron niveles bajos de diversidad genética en base a marcadores mitocondriales (BARGELLONI *et al.* 2003; LEMONS *et al.* 2006; STOCKLEY *et al.* 2005). Esto se ha asociado a un posible cuello de botella ocurrido en la región atlántica, reduciendo drásticamente N_e , e incluso llegando a la extinción de la población mediterránea. El origen probable de dicho cuello de botella podría situarse en la última glaciación, debido a los grandes cambios climáticos que tuvieron lugar hace unos 20.000-30.000 años. Tras este suceso, habría tenido lugar un período de recuperación y expansión, con recolonización reciente de la región mediterránea desde el Atlántico, no habiendo transcurrido aún tiempo suficiente para detectar divergencias genéticas significativas entre ambas cuencas marinas (BARGELLONI *et al.* 2003; STOCKLEY *et al.* 2005).

Además de estos factores históricos, para explicar la baja diversidad genética se han propuesto otras hipótesis tales como la sobrepesca. Cuando una especie está sometida a una gran presión pesquera puede sufrir una disminución importante en N_e , con la consiguiente reducción de la diversidad genética. De hecho, el besugo es una especie que en los últimos años ha estado sometida a una gran esfuerzo pesquero (KRUG 1998). La sobrepesca habría afectado sobre todo a los individuos de mayor tamaño, y puesto que el besugo es hermafrodita protandrio, el impacto habría sido mayor en las hembras. De esta forma, se reduciría la variabilidad genética observada a nivel mitocondrial dada su herencia materna.



10. SARGO COMÚN: *Diplodus sargus* (LINNAEUS, 1758)

El sargo común es una especie ubicua a nivel mundial. Se han descrito hasta un total de 7 subespecies: *D. sargus ascensionis* (Valenciennes 1830), *D. sargus cadenati* (de la Paz, Bauchot y Daget, 1974), *D. sargus capensis* (Smith, 1844), *D. sargus helenae* (Sauvage, 1879), *D. sargus kotschy* (Stendachner, 1876), *D. sargus lineatus* (Valenciennes, 1830) y *D. sargus sargus* (Linnaeus, 1758) (BAUCHOT y DAGET 1971). De ellas, *D. sargus cadenati* se localiza en el Océano Atlántico, desde el estrecho de Gibraltar hasta Cabo Verde, mientras que *D. sargus sargus* aparece en el área Mediterránea (BAUCHOT y HUREAU 1986).

10.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico

En el **Mediterráneo** no se ha observado estructuración entre las cuencas oriental y occidental en base al estudio de 17 *loci* aloenzimáticos ni de la región de control mitocondrial (BARGELLONI *et al.* 2005). Por el contrario, a nivel local y en el área occidental, se han detectado valores de F_{ST} muy moderados (0,0065) pero significativos entre poblaciones de Murcia y Valencia en base a 14 *loci* aloenzimáticos (GONZÁLEZ-WANGÜEMERT *et al.* 2004). Estos autores lo asociaron a un flujo genético restringido en áreas costeras. Cuando estas poblaciones se compararon con otras del Golfo de León y de la Isla de Elba (entre el Mar de Liguria y Mar Tirreno, en la costa occidental de Italia) se encontró una clara asociación entre distancia geográfica y genética, agrupándose las poblaciones del norte y del sur en dos clados separados (PÉREZ-RUZAFA *et al.* 2006).

Respecto a la estructura poblacional de esta especie entre las áreas **atlántica y mediterránea**, los estudios morfológicos han demostrado la existencia de pequeñas variaciones, especialmente en aquellos caracteres relacionados con la anatomía de la cabeza. No obstante, estos cambios se podrían deber a diferencias en la alimentación (PALMA y ANDRADE 2002). A nivel genético, no se han encontrado diferencias entre poblaciones de ambas áreas, ni con aloenzimas ni con marcadores mitocondriales (HANEL y STURMBAUER 2000; SUMMERER *et al.* 2001; PÉREZ *et al.* 2004; BARGELLONI *et al.* 2005). Sólo recientemente se ha



encontrado una diferenciación moderada, pero significativa (F_{ST} entre 0,096 y 0,108), entre una población de Portugal con varias poblaciones mediterráneas (GONZÁLEZ-WANGÜEMERT *et al.* 2006).

En cuanto a causas **ecológicas** como base de la diferenciación poblacional, se ha encontrado una heterogeneidad moderada en base a 26 *loci* aloenzimáticos entre animales procedentes de una reserva marina y las del medio natural más próximo ($F_{ST} = 0,007$). Las reservas favorecen el incremento de la riqueza alélica convirtiéndose en reservorios de alelos raros, preservando así el acervo y la diversidad genética de las poblaciones naturales sometidas a explotación pesquera (PÉREZ-RUZAFA *et al.* 2006).

También es importante destacar en relación con el sargo que se han podido detectar diferencias genéticas **temporales** según cohortes. Así, a través del análisis de 17 *loci* aloenzimáticos se estimaron valores de F_{ST} bajos (0,002) pero significativos sobre cohortes de 10 años, con una correlación negativa entre la heterocigosidad y su abundancia (LENFANT y PLANES 2002). En otro estudio de evolución temporal de la estructura genética de cohortes de 3 años muestreadas durante 3 años sucesivos, se observó como en todos los casos la heterocigosidad dentro de cohorte aumentaba un 20%, debido a fenómenos de selección positiva hacia los heterocigotos. De igual forma, se encontraron valores de F_{ST} significativos entre cohortes interanuales (0,017) asociados a grandes varianzas en el éxito reproductivo individual y a efectos de deriva genética (PLANES y LENFANT 2002).

11. URTA: *Pagrus auriga* (VALENCIENNES 1843)

La urta es un miembro de la familia Sparidae cuyo hábitat natural se sitúa en el Atlántico oriental, desde Portugal a Angola, incluyendo la región occidental del Mar Mediterráneo, Madeira y las Islas Canarias (BAUCHOT y HUREAU 1986). En cuanto al comportamiento reproductivo, es una especie hermafrodita protoginia, es decir, madura sexualmente primero como hembra. Desde un punto de vista comercial, la urta es una especie muy apreciada en Andalucía. Sin embargo, la disminución de capturas observada durante la última década, probablemente consecuencia de la sobreexplotación, han propiciado el desarrollo de



programas para la cría en cautividad (CÁRDENAS *et al.* 2003), obteniéndose grandes avances en el cultivo larvario (PRIETO *et al.* 2003) y de juveniles (MUÑOZ *et al.* 2005), así como la realización de experiencias de engorde en jaulas (PADILLA *et al.* 2005). Un aspecto interesante que merece la pena resaltar es la obtención de híbridos naturales de pargo y urta, híbrido al que se ha denominado *pagurta* (MANCHADO *et al.* 2005; CÁRDENAS *et al.* 2006), que muestra características fenotípicas intermedias entre ambas especies, y que podría ser interesante para la producción en acuicultura.

11.1. Diferenciación entre urta salvaje y en cautividad

No existe información sobre su estructuración en poblaciones naturales. Al analizar una F1 procedente del Centro *El Toruño* (El Puerto de Santa María, Cádiz), se encontró un déficit de heterocigotos y que 7 de los 8 *loci* microsatélites analizados no se ajustaban al equilibrio de Hardy-Weinberg (PONCE *et al.* 2006). Tal sesgo se ha asociado a una contribución muy desigual en la descendencia de los progenitores salvajes mantenidos en cautividad, que provocaría un cuello de botella y una disminución significativa en la variabilidad genética.

El uso conjunto de marcadores mitocondriales (rRNA 16S), microsatélites específicos de urta (locus PauGTTAH4), así como el satélite *EcoRI*, han demostrado su utilidad para la caracterización molecular de los híbridos *pagurta*, demostrando que éstos se producen como consecuencia del cruce entre hembras de pargo y machos de urta. El cruce recíproco no se ha identificado (CÁRDENAS *et al.* 2006; MANCHADO *et al.* 2005).

12. MERO: *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834)

El mero es una especie que se distribuye en el Atlántico, desde las Islas Británicas hasta las Islas Canarias, y por todo el Mediterráneo (TORTONESE 1986b). Según decisión del consejo de 21 de diciembre de 1998 relativa a la aprobación, en nombre de la Comunidad, de la modificación de los anexos II y III del Convenio de Berna relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural de Europa, el



mero se ha incluido en el anexo III referente a las especies protegidas. En este sentido, la acuicultura del mero está principalmente orientada con fines conservacionistas en los que toma un papel fundamental la conservación de los recursos genéticos.

12.1. Diferenciación poblacional según su origen geográfico

Las poblaciones de mero en el **Mediterráneo** se caracterizan por una alta heterogeneidad. Gilles y colaboradores (2000), al estudiar el gen citocromo *b*, describieron la existencia de dos mitotipos filogenéticamente diferentes (A y B). Mientras que el mitotipo A se encontraba sólo en meros capturados en la costa Argelina, el mitotipo B se distribuía por las costas francesas, tunecinas y argelinas. De igual forma a como ocurría con la lubina, el grado de separación entre mitotipos estaba próximo al que existe entre algunas especies, por lo que se podrían considerar como especies crípticas indistinguibles a nivel morfológico (GILLES *et al.*, 2000). En un estudio posterior, al analizar 227 meros de 7 localizaciones mediterráneas (desde el Mediterráneo noroccidental hasta la costa de Túnez, incluyendo muestras de Cerdeña y de los mares Jónico y Tirreno), en base al análisis de 7 microsatélites, se encontraron valores significativos de F_{ST} (0,018) (DE INNOCENTIIS *et al.* 2001). Cuando 3 de estas poblaciones (Jónico, Cerdeña e Isla Lampedusa) se caracterizaron además con 28 *loci* aloenzimáticos, se encontraron discrepancias entre los valores de F_{ST} (0,214 con aloenzimas y -0,002 con microsatélites), de forma análoga a lo observado en la diferenciación ecológica de lubinas según la salinidad. Los altos valores de fijación obtenidos en aloenzimas indican la existencia algún tipo de selección direccional. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que existan diferencias temporales, en lugar de espaciales, entre clases de edad, como consecuencia de las diferencias en el éxito reproductivo (DE INNOCENTIIS *et al.* 2001).

Respecto a la **acuicultura** del mero, tal como se ha comentado con anterioridad, ésta se orienta principalmente a la implementación de planes de repoblación, por lo que resulta fundamental caracterizar los lotes en cautividad y determinar el grado de estructuración genética existente en las poblaciones naturales receptoras. No obs-



tante, existen datos sobre el posible interés de híbridos interespecíficos como *Epinephelus costae* (♀) x *E. marginatus* (♂), o el cruce recíproco (GLAMUZINA *et al.* 1999; 2001), que muestran características productivas similares a los parentales durante el desarrollo larvario tales como supervivencia, crecimiento y tiempos de eclosión más cortos.

13. CONCLUSIONES

En la Tabla 6 se resumen los principales resultados sobre estructuración genética en las 9 especies analizadas. De forma genérica, cada una de ellas presenta un patrón de diferenciación específico según el área geográfica debido a factores biológicos, hidrodinámicos en su área de distribución, históricos, entre otros. Se pueden observar patrones tan diversos como el de la lubina, con una alta estructuración dentro del Mediterráneo así como entre el Mediterráneo y el Atlántico, y el caso opuesto del besugo, con poblaciones panmícticas en el Mediterráneo y un moderado-alto grado de diferenciación en el Atlántico. Estos datos nos indican la necesidad de establecer, para cada especie en particular, el grado de estructuración, diferenciación y variabilidad genética en poblaciones naturales.

TABLA 6.
Estructuración genética de poblaciones según origen geográfico y respecto a poblaciones en cautividad.

	Mediterráneo	Atlántico/ Mediterráneo	Atlántico	Acuicultura
Dorada	Baja/Moderada	Moderada	Moderada	Alta
Lubina	Alta	Alta	Moderada	Alta
Rodaballo	Moderada	Baja	Baja	Moderada
Lenguado común	Alta	Moderada	Baja/Moderada	Alta
Lenguado senegalés	--	Moderada	Baja/Moderada	Alta
Besugo	Baja	Baja	Moderada/Alta	--
Sargo común	Moderada	Baja/Moderada	--	--
Urta	--	--	--	Alta
Mero	Alta	--	--	--



Por el contrario, todas aquellas especies cuya reproducción en cautividad se basa en puestas espontáneas mediante el control del fotoperíodo y/o termoperíodo se diferencian significativamente de las poblaciones naturales. En la mayoría de los casos, se observa un déficit de heterocigotos y desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg con pérdidas significativas de la variabilidad genética. Este fenómeno debe considerarse en el mantenimiento y gestión de los lotes de reproductores, ya que puede conducir a tasas altas de consanguinidad en las poblaciones de crianza con efectos negativos importantes en cuanto a sensibilidad a patógenos, crecimiento o defectos genéticos (KINCAID 1983). Además, habría que considerar que la liberación incontrolada de estos animales podría provocar un gran impacto sobre las poblaciones naturales, como ya se ha demostrado en dorada y lubina, alterando significativamente los patrones de estructuración genética y comprometiendo la respuesta adaptativa de las especies a las condiciones cambiantes del medio.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL, I., G. CATANESE, M. MANCHADO y A. GARCÍA-ALCÁZAR, 2004 Genetic study of wild sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) captured in the Mediterranean sea, pp. 89-90 in *Biotechnologies for Quality*. European Aquaculture society, Barcelona.
- ALARCÓN, J. A., A. MAGOULAS, T. GEORGAKOPOULOS, E. ZOUROS y M. C. ALVAREZ, 2004 Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **230**: 65-80.
- ALLEGRUCCI, G., A. CACCONE, S. CATAUDELLA, J. POWELL y V. SBORDONI, 1995 Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms. *Mar. Biol.* **121**: 591-599.
- ALLEGRUCCI, G., A. CACCONE y V. SBORDONI, 1999 Cytochrome *b* sequence divergence in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and phylogenetic relationships among some Perciformes species. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **37**: 149-156.
- ALLEGRUCCI, G., C. FORTUNATO, S. CATAUDELLA y V. SBORDONI, 1994 Acclimation to fresh water of the sea bass: evidence of selective mortality and allozyme genotypes, pp. 486-502 in *Genetics and Evolution of Marine Organisms*, editado por A. BEAUMONT. Chapman & Hall, London.



- ALLEGRUCCI, G., C. FORTUNATO y V. SBORDONI, 1997 Genetic structure and allozyme variation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* and *D. punctatus*) in the Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* **128**: 347-358.
- APROMAR, 2006 La acuicultura marina de peces en España, pp. in http://www.observatorio-acuicultura.org/Documentos/DescargasOESA_GetFile.aspx?id=1952.
- BAHRI-SFAR, L., C. LEMAIRE, O. K. BEN HASSINE y F. BONHOMME, 2000 Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern Mediterranean as revealed by microsatellite polymorphism. *Proc. Biol. Sci.* **267**: 929-935.
- BAHRI-SFAR, L., C. LEMAIRE, B. CHATAIN, P. DIVANACH, O. K. B. HASSINE *et al.*, 2005 Impact de l'élevage sur la structure génétique des populations méditerranéennes de *Dicentrarchus Labrax*. *Aquat. Living Resour.* **18**: 71-76.
- BARGELLONI, L., J. A. ALARCÓN, M. C. ALVAREZ, E. PENZO, A. MAGOULAS *et al.*, 2005 The Atlantic-Mediterranean transition: discordant genetic patterns in two seabream species, *Diplodus puntazzo* (Cetti) and *Diplodus sargus* (L.). *Mol. Phylogenet. Evol.* **36**: 523-535.
- BARGELLONI, L., J. A. ALARCÓN, M. C. ALVAREZ, E. PENZO, A. MAGOULAS *et al.*, 2003 Discord in the family Sparidae (Teleostei): divergent phylogeographical patterns across the Atlantic-Mediterranean divide. *J. Evol. Biol.* **16**: 1149-1158.
- BATARGIAS, C., E. DERMITZAKIS, A. MAGOULAS y E. ZOUROS, 1999 Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata* (Linnaeus 1758). *Mol. Ecol.* **8**: 897-898.
- BAUCHOT, M., y J. DAGET, 1971 Les Diplodes (Pisces, Sparidae) du groupe cervinus-fasciatus. *Cah. ORSTOM Ser. Oceanogr.* **9**: 319-338.
- BAUCHOT, M. L., M. DESOUTTER y F. LAGARDÈRE, 1986 Soleidae, pp. 1038-1324 in *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*, editado por P. J. P. WHITEHEAD, M. L. BAUCHOT, J. C. JUREAU, J. NIELSEN y E. TORTONESE. United Nations Education Scientific and Cultural Organization, Paris.
- BAUCHOT, M. L., y J. C. HUREAU, 1986 Sparidae, pp. 883-907 in *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*, editado por P. J. P. WHITEHEAD, M. L. BAUCHOT, J. C. JUREAU, J. NIELSEN y E. TORTONESE. United Nations Education Scientific and Cultural Organization, Paris.
- BEN SLIMEN, H., H. GUERBEJ, A. BEN OTHMEN, I. OULD BRAHIM, H. BLEL *et al.*, 2004 Genetic differentiation between populations of gilthead seabream (*Sparus aurata*) along the Tunisian coast. *Cybium* **28**: 45-50.
- BLANQUER, A., J. P. ALAYSE, O. BERRADA-RKHAMI y P. PERREBI, 1992 Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus rhombus*) (Osteichthyes, Pleuronectoformes, Scophthalmidae) throughout their range in Europe. *J. Fish Biol.* **41**: 725-736.



- BOUZA, C., P. PRESA, J. CASTRO, L. SÁNCHEZ y P. MARTÍNEZ, 2002 Allozyme and microsatellite diversity in natural and domestic populations of turbot (*Scophthalmus maximus*) in comparison with other Pleuronectiformes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **59**: 1460-1473.
- BOUZA, C., L. SÁNCHEZ y P. MARTÍNEZ, 1997 Gene diversity analysis in natural populations and cultured stocks of turbot (*Scophthalmus maximus*). Anim. Genet. **28**: 28-36.
- BROWN, R. C., M. TSALAVOUTA, V. TERZOGLU, A. MAGOULAS y B. McANDREW, 2005 Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the Sparidae family. Mol. Ecol. Notes **5**: 605-607.
- CABRAL, H. N., F. CASTRO, D. LINHARES y P. ALEXANDRINO, 2003 Genetic differentiation of *Solea solea* (Linnaeus, 1758) and *Solea senegalensis* Kaup, 1858, (Pisces: Pleuronectiformes) from several estuarine systems of the Portuguese coast. Sci. Mar. **67**: 43-52.
- CACCONE, A., G. ALLEGRUCCI, C. FORTUNATO y V. SBORDONI, 1997 Genetic differentiation within the European Sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays. J. Hered. **88**: 316-324.
- CÁRDENAS, S., J. P. CAÑAVATE, A. SÁNCHEZ-LAMADRID y J. M. NARANJO, 2003 *Domesticación de la hurta (Pagrus auriga)*. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla, Spain.
- CÁRDENAS, S., M. MANCHADO y J. M. NARANJO, 2006 The redbanded seabream *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae): a new promising species in aquaculture, pp. 138 in *AQUA 2006*, editado por W. A. SOCIETY. EAS y WAS, Florence, Italy.
- CASILHO, R., y B. McANDREW, 1998a Microsatellite polymorphisms in wild populations of European seabass: Preliminary results, pp. 265-272 in *Genetics and breeding of Mediterranean aquaculture species* editado por D. M. BARTLEY y B. BASURCO. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza.
- CASILHO, R., y B. McANDREW, 1998b Population structure of seabass in Portugal: evidence from allozymes. J. Fish Biol. **53**: 1038-1049.
- CESARONI, D., F. VENANZETTI, G. ALLEGRUCCI y V. SBORDONI, 1997 Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in natural populations of the european sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Mol. Biol. Evol. **14**: 560-568.
- CHISTIAKOV, D. A., B. HELLEMANS y F. A. VOLCKAERT, 2006 Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special refrence to fish genetics. Aquaculture **255**: 1-29.
- CIFTCI, Y., R. CASILHO y B. McANDREW, 2002 More polymorphic microsatellite markers in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Mol. Ecol. Notes **2**: 575-576.



- COUGHLAN, J., A. K. IMSLAND, P. T. GALVIN, R. D. FITZGERALD, G. NAEVDAL *et al.*, 1998 Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. *J. Fish Biol.* **52**: 916-922.
- COUGHLAN, J. P., E. MCCARTHY, D. MCGREGOR, P. O'DONOGHUE, P. GALVIN *et al.*, 1996 Four polymorphic microsatellites in turbot *Scophthalmus maximus*. *Anim. Genet.* **27**: 441.
- DE INNOCENTIS, S., A. LESTI, S. LIVI, A. R. ROSSI, D. CROSSETTI *et al.*, 2004 Microsatellite markers reveal population structure in gilthead sea bream *Sparus aurata* from the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Fisheries Sci.* **70**: 852-859.
- DE INNOCENTIS, S., E. MIGGIANO, A. UNGARO, S. LIVI, L. SOLA *et al.*, 2005 Geographical origin of individual breeders from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) hatchery broodstocks inferred by microsatellite profiles. *Aquaculture* **247**: 227-232.
- DE INNOCENTIS, S., L. SOLA, S. CATAUDELLA y P. BENTZEN, 2001 Allozyme and microsatellite loci provide discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the Mediterranean Sea. *Mol. Ecol.* **10**: 2163-2175.
- DÍAZ FERGUSON, E., I. CROSS y L. REBORDINOS, 2005 Caracterización genética de poblaciones salvajes de *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) en el Golfo de Cádiz mediante loci microsatélites, pp. in *IV Congreso Nacional de Acuicultura, Libro de Actas*. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Cádiz.
- ESTOUP, A., K. GHARBI, M. SANCRISTOBAL, C. CHEVALET, P. HAFFRAY *et al.*, 1998 Parentage assessment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**: 715-725.
- EXADACTYLOS, A., A. J. GEFFEN, P. PANAGIOTAKI y J. P. THORPE, 2003 Population structure of Dover sole *Solea solea*: RAPD and allozyme data indicate divergence in European stocks. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **246**: 253-264.
- EXADACTYLOS, A., A. J. GEFFEN y J. P. THORPE, 1998 Population structure of the Dover sole, *Solea solea* L., in a background of high gene flow. *J. Sea Res.* **40**: 117-129.
- EXADACTYLOS, A., A. J. GEFFEN y J. P. THORPE, 1999 Growth and genetic variation in hatchery-reared larval and juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture* **176**: 209-226.
- EXADACTYLOS, A., y J. P. THORPE, 2001 Allozyme variation and genetic inter-relationships between seven flatfish species (Pleuronectiformes). *Zool. J. Linn. Soc.* **132**: 487-499.



- FLORIN, A. B., y J. HÖGLUND, 2006 Absence of population structure of turbot (*Psetta maxima*) in the Baltic Sea. Mol. Ecol. en prensa.
- FRITSCH, M., Y. MORIZUR, E. LAMBERT, F. BONHOMME y B. GUINAND, 2006 Assessment of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) stock delimitation in the Bay of Biscay and the English Channel based on mark-recapture and genetic data. Fisheries Res. en prensa.
- FUNES, V., E. ZUASTI, G. CATANESE, C. INFANTE y M. MANCHADO, 2004 Isolation and characterization of ten microsatellite loci for Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). Mol. Ecol. Notes **4**: 339-341.
- GARCÍA DE LEÓN, F. J., L. CHIKHI y F. BONHOMME, 1997 Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Mol. Ecol. **6**: 51-62.
- GERKING, S. D., 1959 The restricted movement of fish populations. Biol Rev: 221-242.
- GILLES, A., A. MIQUELIS, J.-P. QUIGNARD y E. FAURE, 2000 Molecular phylogeography of western Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus*. C R Acad. Sci. III **323**: 195-205.
- GLAMUZINA, B., N. GLAVIC, B. SKARAMUCA, V. KOZUL y P. TUTMAN, 2001 Early development of the hybrid *Epinephelus costae* ♀ X *E. marginatus* ♂. Aquaculture **198**: 55-61.
- GLAMUZINA, B., V. KOZUL, P. TUTMAN y B. SKARAMUCA, 1999 Hybridization of Mediterranean groupers: *Epinephelus marginatus* ♀ x *E. aeneus* ♂ and early development. Aquaculture Res. **30**: 625-628.
- GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, M., A. PÉREZ-RUZAFÁ, J. A. GARCÍA-CHARTON y C. MARCOS, 2006 Genetic differentiation and gene flow of two sparidae subspecies, *Diplodus sargus sargus* and *Diplodus sargus cadenati* in Atlantic and south-west Mediterranean populations. Biol. J. Linn. Soc. **89**: 705-717.
- GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, M., A. PÉREZ-RUZAFÁ, C. MARCOS y J. A. GARCÍA-CHARTON, 2004 Genetic differentiation of *Diplodus sargus* (Pisces: Sparidae) populations in the south-west Mediterranean. Biol. J. Linn. Soc. **82**: 249-261.
- GUARNIERO, I., S. FRANZELLITTI, N. UNGARO, S. TOMMASINI, C. PICCINETTI *et al.*, 2002 Control region haplotype variation in the central Mediterranean common sole indicates geographical isolation and population structuring in Italian stocks. J. Fish Biol. **60**: 1459-1474.
- HANEL, R., y C. STURMBAUER, 2000 Multiple recurrent evolution of trophic types in northeastern Atlantic and Mediterranean seabreams (Sparidae, Percoidei). J. Mol. Evol. **50**: 276-283.
- HARTL, D., y A. CLARK, 1997 *Principles of population genetics*, 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.



- HAUSER, L., G. J. ADCOCK, P. J. SMITH, J. H. RAMIREZ y G. R. CARVALHO, 2002 Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**: 11742-11747.
- HEDGECOCK, D., 1994 Does variance in reproductive success limit effective populations sizes of marine organisms?, pp. 122-134 in *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, editado por A. BEAUMONT. Chapman, Hall, London.
- HUTCHINGS, J. A., y J. D. REYNOLDS, 2004 Marine Fish Population Collapses: Consequences for Recovery and Extinction Risk. *Bioscience* **54**: 297-309.
- ICES MARICULTURE COMMITTEE, 2004 Report of the Working Group on Environmental Interactions of Mariculture (WGEIM), pp., editado por I. C. F. R. ACME. International council for the Exploration of the Sea, Galway, Ireland.
- IGLESIAS, J., y G. RODRÍGUEZ-OJEDA, 1994 Fitness of hatchery-reared turbot, *Scophthalmus maximus* L., for survival in the sea: first year results on feeding, growth and distribution. *Aquac Fish Manag* **25**: 179-188.
- IMSLAND, A. K., A. FOSS, L. E. C. CONCEIÇÃO, M. T. DINIS, D. DELBARE *et al.*, 2003 A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish. Biol. Fish* **13**: 379-407.
- IYENGAR, A., S. PIYATTANAKORN, D. A. HEIPEL, D. M. STONE, B. R. HOWELL *et al.*, 2000 A suite of highly polymorphic microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with potential for use across several flatfish species. *Mol. Ecol.* **9**: 368-371.
- KINCAID, H. L., 1983 Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture* **33**: 215-227.
- KOTOULOS, G., F. BONHOMME y P. BORSA, 1995 Genetic structure of the common sole *Solea vulgaris* at different geographic scales. *Mar. Biol.* **122**: 361-375.
- KRUG, H., 1998 Variation in the reproductive cycle of the black spot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768) in the Azores. *Arquipelago Bull. Univ. Azores Life Mar. Sci.* **16A**: 37-47.
- LAUNNEY, S., F. KRIEG, P. HAFFRAY, J.-S. BRUANT, A. VANNIER *et al.*, 2003 Twelve new microsatellite markers for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism and linkage. *Mol. Ecol. Notes* **3**: 457-459.
- LEMAIRE, C., G. ALLEGRUCCI, M. NACIRI, L. BAHRI-SFAR, H. KARA *et al.*, 2000 Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Mol. Ecol.* **9**: 457-467.
- LEMAIRE, C., J. J. VERSINI y F. BONHOMME, 2005 Maintenance of genetic differentiation across a transition zone in the sea: discordance between nuclear and cytoplasmic markers. *J. Evol. Biol.* **18**: 70-80.



- LEMBO, G., M. T. SPEDICATO, F. OKLAND, P. CARBONARA, I. A. FLEMING *et al.*, 2002 A wireless communication system for determining site fidelity of juvenile dusky groupers *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) using coded acoustic transmitters. *Hydrobiologia* **483**: 249-257.
- LEMO, A., A. I. FREITAS, A. T. FERNANDES, R. GONÇALVES, J. JESUS *et al.*, 2006 Microsatellite variability in natural populations of the blackspot seabream *Pagellus bogaraveo* (Brünnick, 1768): a database to access parentage assignment in aquaculture. *Aquaculture Res.* **37**: 1028-1033.
- LENFANT, P., y S. PLANES, 2002 Temporal genetic changes between cohorts in a natural population of a marine fish, *Diplodus sargus*. *Biol. J. Linn. Soc.* **76**: 9-20.
- LIU, Y. G., L. X. LIU, Z. W. LEI, A. Y. GAO y B. F. LI, 2006 Identification of polymorphic microsatellite markers from RAPD product in turbot (*Scophthalmus maximus*) and a test of cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes* **6**: 867.
- MANCHADO, M., V. FUNES, C. INFANTE, V. ANGUIS, R. CAL *et al.*, 2007 Population structure of Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup) in the Iberian Peninsula revealed by mitochondrial DNA control region sequences. En preparación.
- MANCHADO, M., M. PONCE, E. ASENSIO, C. INFANTE, R. DE LA HERRÁN *et al.*, 2005 PAGURTA, híbrido interespecífico de pargo, *Pagrus pagrus*, x hurta, *Pagrus auriga*: caracterización fenotípica y molecular, pp. 440-441 in *X Congreso Nacional de Acuicultura*, editado por UPV. Universidad Politécnica de Valencia, Gandía (Valencia).
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G., M. C. ÁLVAREZ y B. McANDREW, 1998 Genetic variability of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: data from a hatchery stock. *Aquaculture Res.* **29**: 851-853.
- MUÑOZ, J. L., Y. BENHAMOU, I. LOZANO, F. PADILLA y S. CÁRDENAS, 2005 Cultivo de juveniles de hurta *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae) entre 4 y 9 meses de edad, pp. 404-405 in *X Congreso Nacional de Acuicultura*, editado por UPV. Universidad Politécnica de Valencia, Gandía (Valencia).
- NACIRI, M., C. LEMAIRE, P. BORSA y F. BONHOMME, 1999 Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Hered.* **90**: 591-596.
- NIELSEN, E. E., P. H. NIELSEN, D. MELDRUP y M. M. HANSEN, 2004 Genetic population structure of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) supports the presence of multiple hybrid zones for marine fishes in the transition zone between the Baltic Sea and the North Sea. *Mol. Ecol.* **13**: 585-595.
- NIELSEN, J. G., 1986 *Scophthalmidae*, pp. 1290-1291 in *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*, editado por P. J. P. WHITEHEAD, M.



- L. BAUCHOT, J. C. HUREAU, J. NIELSEN y E. TORTONESE. United Nations Education Scientific and Cultural Organization, Paris.
- PADILLA, F., J. L. MUÑOZ y S. CÁRDENAS, 2005 Engorde de la hurta *Pagrus auriga* en jaulas, pp. 360-361 in *X Congreso Nacional de Acuicultura*, editado por UPV. Universidad Politécnica de Valencia, Gandía (Valencia).
- PALMA, J., y J. P. ANDRADE, 2002 Morphological study of *Diplodus sargus*, *Diplodus puntazzo*, and *Lithognathus mormyrus* (Sparidae) in the Eastern Atlantic and Mediterranean Sea. *Fisheries Res.* **57**: 1-8.
- PARDO, B. G., L. CASAS, G. G. FORTES, C. BOUZA, P. MARTÍNEZ *et al.*, 2005 New microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*) derived from an enriched genomic library and sequence databases. *Mol. Ecol. Notes* **5**: 62.
- PARDO, B. G., M. HERMIDA, C. FERNÁNDEZ, C. BOUZA, M. PÉREZ *et al.*, 2006 A set of highly polymorphic microsatellites useful for kinship and population analysis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture Res.* **37**: 1578.
- PATARNELLO, T., L. BARGELLONI, F. CALDARA y L. COLOMBO, 1993 Mitochondrial DNA sequence variation in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (Serranidae): evidence of differential haplotype distribution in natural and farmed populations. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **2**: 333-337.
- PÉREZ, L., C. INFANTE y M. MANCHADO, 2004 Estructura y diferenciación genética de poblaciones Atlánticas y Mediterráneas de sargo común (*Diplodus sargus*). III congreso iberoamericano virtual de acuicultura: 160-172.
- PÉREZ-RUZAFA, A., M. GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, P. LENFANT, C. MARCOS y J. A. GARCÍA-CHARTON, 2006 Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations. *Biol. Conserv.* **129**: 244-255.
- PIÑERA, J. A., D. BERNARDO, G. BLANCO, E. VÁZQUEZ y J. A. SÁNCHEZ, 2006 Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Ecol. Notes* **6**: 33-35.
- PLANES, S., y P. LENFANT, 2002 Temporal change in the genetic structure between and within cohorts of a marine fish, *Diplodus sargus*, induced by a large variance in individual reproductive success. *Mol. Ecol.* **11**: 1515-1524.
- PONCE, M., C. INFANTE, A. CRESPO, E. ZUASTI, L. PÉREZ *et al.*, 2006 Characterization of microsatellite loci for the redbanded seabream, *Pagrus auriga* (Teleostei, Sparidae). *Mol. Ecol. Notes* **6**: 527-529.
- PORTA, J., J. M. PORTA, G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ y M. C. ALVAREZ, 2006 Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites *Aquaculture* **251**: 46-55.
- PRIETO, A., J. P. CAÑAVATE y S. CÁRDENAS, 2003 *Crecimiento de larvas de hurta (Pagrus auriga) en cultivo*. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla, Spain.



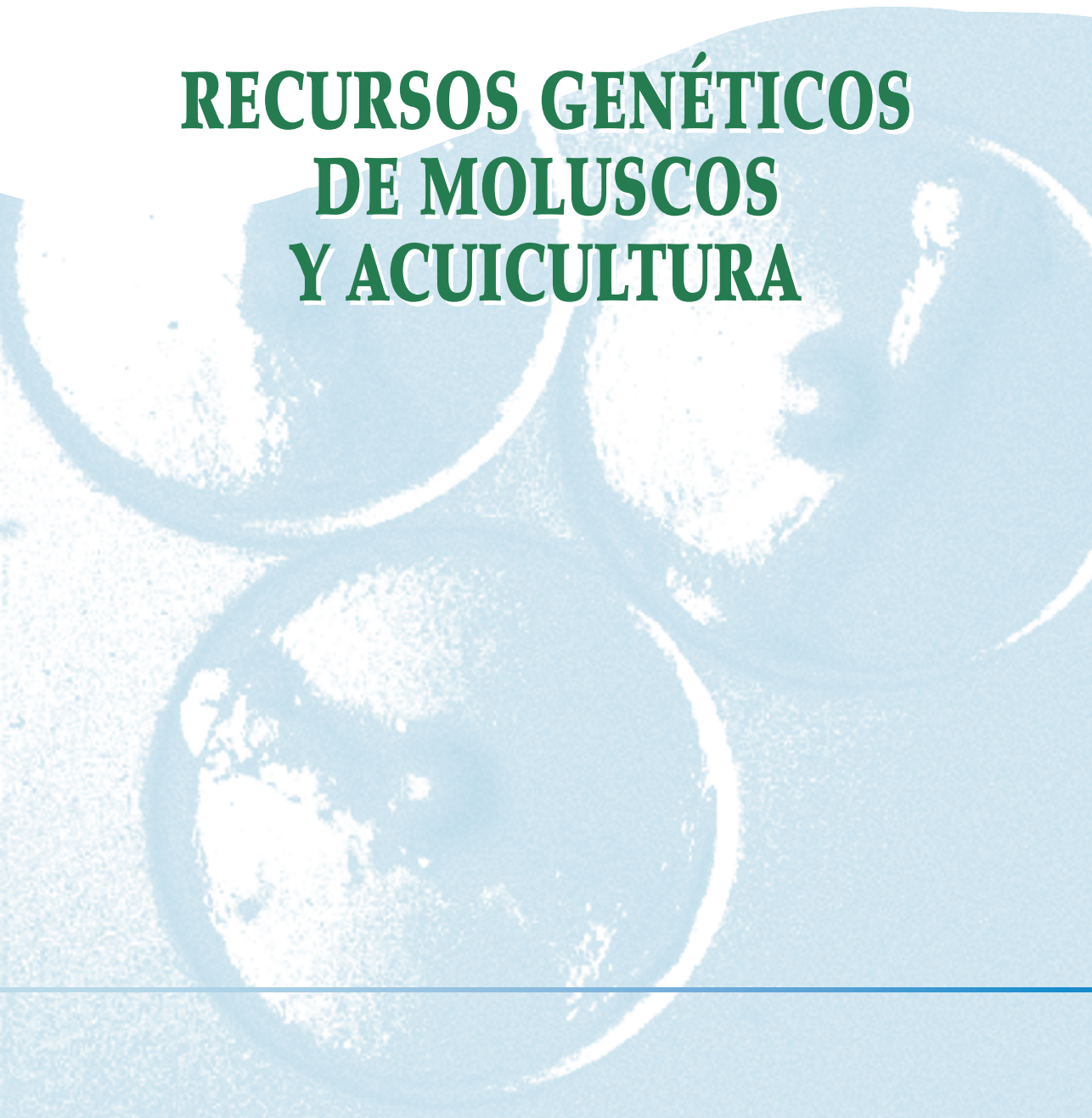
- ROLLAND, J. L., F. BONHOMME, F. LAGARDÈRE, M. HASSAN y B. GUINAND, 2006 Population structure of the common sole (*Solea solea*) in the Northeastern Atlantic and the Mediterranean Sea: revisiting the divide with EPIC markers. Mar. Biol. en prensa.
- SOLA, L., S. DE INNOCENTIS, A. R. ROSSI, D. CROSETTI, M. SCARDI *et al.*, 1998 Genetic variability and fingerling quality in wild and reared stocks of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, pp. 273-280 in *Genetics and breeding of Mediterranean aquaculture species*, editado por D. M. BARTLEY y B. BASURCO. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza.
- STOCKLEY, B., G. MENEZES, M. R. PINHO y A. D. ROGERS, 2005 Genetic population structure in the black-spot sea bream (*Pagellus bogaraveo* Brännich, 1768) from the NE Atlantic. Mar. Biol. **146**: 793-804.
- STOCKLEY, B. M., A. D. ROGERS, A. IYENGAR, G. MENEZES, R. SANTOS *et al.*, 2000 Ten microsatellite loci isolated and developed for the blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brännich 1768). Mol. Ecol. **9**: 999-1000.
- SUMMERER, M., R. HANEL y C. STURMBAUER, 2001 Mitochondrial phylogeny and biogeographic affinities of sea bream of the genus *Diplodus* (Sparidae). J. Fish Biol. **59**: 1639-1652.
- SUZUKI, N., M. NISHIDA, K. YOSEDA, C. ÜSTÜNDAG, T. SAHIN *et al.*, 2004 Phylogeographic relationships within the Mediterranean turbot inferred by mitochondrial DNA haplotype variation. J. Fish Biol. **65**: 580-585.
- TINTORE, J., P. E. LA VIOLETTE, I. BLADE y A. CRUZADO, 1988 A study of an intense density front in the Eastern Alboran Sea: The Almeria-Oran front. J. Phys. Ocean. **18**: 1384-1397.
- TORTONESE, E., 1986a Moronidae, pp. 793-796 in *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*, editado por P. J. P. WHITEHEAD, M. L. BAUCHOT, J. C. JUREAU, J. NIELSEN y E. TORTONESE. United Nations Education Scientific and Cultural Organization, Paris.
- TSIGENOPOULOS, C. S., B. HELLEMANS, D. A. CHISTIAKOV, A. LIBERTINI, G. KOTOULOS *et al.*, 2003 Eleven new microsatellites of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Mol. Ecol. Notes **3**: 352-354.
- TORTONESE, E., 1986b Serranidae, pp. 780-792 in *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*, editado por P. J. P. WHITEHEAD, M. L. BAUCHOT, J. C. JUREAU, J. NIELSEN y E. TORTONESE. United Nations Education Scientific and Cultural Organization, Paris.
- TURNER, T. F., J. P. WARES y J. R. GOLD, 2002 Genetic effective size is three orders of magnitude smaller than adult census size in an abundant, Estuarine-dependent marine fish (*Sciaenops ocellatus*). Genetics **162**: 1329-1339.



- VEGA, L., E. DÍAZ, I. CROSS y L. REBORDINOS, 2002 Caracterizaciones citogenética e isoenzimática del lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. **18**: 245-250.
- WARD, R. D., M. WOODWARK y D. O. F. SKIBINSKI, 1994 A comparison genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. J. Fish Biol. **44**: 213-232.
- WELCOMME, R. L., y U. BARG, 1997 *FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries -5: Aquaculture Development*. Food and Agriculture Organization, Rome.
- ZABALA, M., P. LOUISY, A. GARCÍA-RUBIES y V. GRACIA, 1997 Socio-behavioral context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe. 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). Sci. Mar. **61**: 79-89.

2

RECURSOS GENÉTICOS DE MOLUSCOS Y ACUICULTURA



RECURSOS GENÉTICOS DE MOLUSCOS Y ACUICULTURA

C. Saavedra

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC)

Resumen

Los moluscos cultivados presentan una gran variabilidad en caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y de conducta, que puede tener un componente genético. La mayoría de los moluscos cultivados están en los comienzos del proceso de domesticación, y el estudio de la variabilidad genética intra e interpoblacional puede ser de gran utilidad para la mejora del cultivo. La variabilidad genética puede estudiarse mediante el enfoque de la genética de poblaciones, basado en el uso de marcadores genéticos, o mediante el de la genética cuantitativa, basado en métodos biométricos. Conjuntamente, estos dos enfoques permiten obtener información directamente aplicable en programas de gestión y mejora genética. El uso de marcadores genéticos ha revelado la existencia de una diferenciación genética baja, pero significativa, entre poblaciones de moluscos. En varias especies, como el mejillón, la almeja fina y la vieira, se da una diferenciación mayor entre las cuencas mediterránea y atlántica. Los métodos de la genética cuantitativa permiten estudiar la variabilidad genética específica para un carácter concreto, y han puesto de manifiesto la existencia de niveles moderados o altos de variabilidad genética en caracteres de interés para el cultivo de moluscos. También están comenzando a encontrarse los genes directamente relacionados con la variabilidad de caracteres como la tasa de



crecimiento o la susceptibilidad a las microalgas tóxicas. Es importante resaltar que las prácticas de cultivo pueden tener efectos adversos sobre los recursos genéticos, que es posible evaluar y evitar mediante un planeamiento y seguimiento adecuados.

Abstract

Cultured molluscs show variability at morphological, physiological, biochemical and behavioural traits that can have a genetic component. Most cultured molluscs are in the beginnings of the domestication process, and the study of their genetic variability at both intra and interpopulation levels can be of great value for culture improvement. Genetic variability can be studied through population genetic approaches, based on the use of genetic markers, or through quantitative genetic approaches, based on biometrical methods. All together, these two approaches allow gathering information applicable to management and breeding programs. The use of genetic markers has revealed a low but significant differentiation among populations of molluscs. In several species, such as the Mediterranean mussel, the carpet-shell clam and the great scallop, there is a greater differentiation between the Atlantic and Mediterranean basins. Quantitative genetic methods allow the study of genetic variability for specific traits. These methods have shown moderate or high levels of genetic variability for traits of interest for mollusc culture. Moreover, genes directly related with traits such as growth rate or sensitivity to toxic microalgae, are currently being searched. It is important to stress that culture practices can have negative effects on genetic resources, but these effects can be evaluated and avoided through adequate culture planning and follow up.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura marina en la UE, y especialmente en España, depende en gran medida del cultivo de varias especies de moluscos, especialmente mejillones, ostras y almejas. Otras especies de moluscos están siendo objeto de investigación de cara a su cultivo, como las vieiras, las zamburiñas, las navajas, el pulpo y la oreja de mar. Desde el



momento en que una especie puede reproducirse en cautividad con eficiencia, es posible utilizar las tecnologías genéticas para la mejora de la producción, como se ha hecho durante décadas en ganadería y agricultura, o más recientemente, en peces como el salmón o la tilapia. El ganado y las plantas de interés agrícola fueron domesticados hace largo tiempo, y la genética moderna llegó en un momento en que las especies originales que dieron lugar a la gran mayoría de las variedades domésticas ya habían sufrido una gran transformación debida al proceso de domesticación. Hoy en día, uno de los principales campos de trabajo en ganadería y agronomía es precisamente la caracterización genética de las razas y variedades de las especies de interés, y de sus parientes salvajes más próximos, que son la fuente potencial de nuevos recursos genéticos.

Los moluscos y otras especies marinas tienen la ventaja respecto a las especies ganaderas y agrícolas de que su domesticación todavía se encuentra en un estado incipiente, y por lo tanto disponemos de la totalidad de los recursos genéticos de las poblaciones naturales para utilizarlos en mejora. De hecho, la aplicación de programas de mejora genética en especies acuáticas, suele dar rendimientos espectacularmente mayores que en el ganado (Gjedrem 1997; Gjoen y Bentsen 1997). Estos programas se basan en la disponibilidad de técnicas de cultivo intensivo bien desarrolladas. Sin embargo, la aplicación de las técnicas de cultivo intensivo en moluscos, como en las demás especies, tiene un efecto potencial sobre la integridad de los recursos genéticos, como se explicará más adelante. Es necesario gestionar estos recursos adecuadamente, de forma que su utilización resulte en la mejora de la producción, al tiempo que minimice las lesiones sobre la biodiversidad, uno de cuyos componentes principales es la diversidad genética de las especies.

Pero, ¿a qué nos referimos exactamente con el término «recursos genéticos»? Para definir lo que son los recursos genéticos, se puede empezar constatando que todos los organismos muestran una gran variabilidad en rasgos de carácter morfológico, fisiológico y de conducta. Esta variabilidad puede presentarse en forma de diferencias entre individuos, poblaciones, razas o especies diferentes. En algunos casos, las diferencias observadas pueden deberse al efecto de la variabilidad



en las condiciones ambientales en las que se desarrollan los animales. En muchas situaciones, además, subyacen diferencias de tipo genético, es decir, diferencias en la secuencia nucleotídica que constituye el genoma del organismo en cuestión. Estas diferencias moleculares se pueden estudiar hoy en día con relativa facilidad mediante la secuenciación genómica total o parcial, u otras técnicas moleculares denominadas en conjunto «marcadores genéticos». Cuando hablamos de «recursos genéticos», nos estamos refiriendo al conjunto de la variabilidad del genoma, y a la distribución de esta variabilidad entre individuos, poblaciones, razas o especies. El estudio de las pautas de variabilidad molecular y de los agentes que las determinan se realiza mediante los conceptos y modelos de la genética de poblaciones. Pero, además, el estudio de los recursos genéticos implica también la descripción de los efectos fenotípicos causados por las diferencias moleculares (diferencias en tasa de crecimiento, supervivencia o cualquier rasgo que mejore la calidad del producto o facilite su obtención), y que son en última instancia lo más importante desde el punto de vista de la producción. La determinación genética de estos caracteres es compleja: suelen estar influidos por varios genes, posiblemente muchos, y también por el ambiente. Desde antes del conocimiento del papel del DNA como base de la herencia, ya se habían desarrollado métodos que permitían cuantificar la cantidad de variabilidad de origen genético para un carácter de interés, mediante la utilización de modelos estadísticos aplicados a cruzamientos, conformando una subdisciplina denominada genética cuantitativa. Estos métodos se siguen utilizando hoy en día, y su progresiva sofisticación, junto al desarrollo de la informática, los han convertido en herramientas de enorme potencial en la caracterización de los recursos genéticos. Más recientemente, la incorporación de técnicas moleculares a la genética cuantitativa ha permitido llegar a localizar las regiones genómicas responsables de la variabilidad cuantitativa, e incluso a aislar genes concretos que subyacen a un carácter cuantitativo (QTLs) (ver capítulo 9). Estas metodologías ya se están empezando a aplicar en los moluscos (Yu y Guo 2006).

En este capítulo, se pretende resumir el conocimiento actual de los recursos genéticos en los moluscos cultivados, con atención especial



a las especies de mayor interés en España y en Europa, y atendiendo tanto a la descripción de la estructura genética de las poblaciones basada en métodos de estudio de la variabilidad molecular, como en los referidos a la variabilidad cuantitativa. El conocimiento de los recursos genéticos que se puede obtener mediante estos enfoques es enormemente útil en la mejora de la producción, y, lógicamente, es fundamental para la conservación de los mismos.

2. LOS MARCADORES GENÉTICOS Y EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES NATURALES DE MOLUSCOS

La descripción ideal de los recursos genéticos de una especie sería la colección de la secuencia nucleotídica completa del genoma de todos los individuos de la especie, junto con las consecuencias funcionales (bioquímicas, celulares, fisiológicas y de conducta) de las variaciones nucleotídicas observadas entre individuos, poblaciones o razas. Obviamente, esto es imposible de realizar. Afortunadamente, se dispone de métodos para recoger fragmentos de esta información mediante técnicas diversas.

En primer lugar, se puede obtener información válida para la descripción y gestión de los recursos genéticos a partir del estudio de la variabilidad molecular de una muestra de regiones genómicas en individuos recogidos en localidades repartidas homogéneamente por todo el rango de distribución de la especie. De esta forma se puede cuantificar la distribución de la variabilidad entre individuos y entre poblaciones. Además, si se conoce la existencia de razas o subespecies caracterizadas con anterioridad a partir de rasgos morfológicos, fisiológicos o de conducta, se puede diseñar un muestreo de las poblaciones que permita también cuantificar la magnitud de las diferencias genéticas entre las primeras. La información que se obtiene no es sólo una descripción de la variación molecular *per se*, sino que mediante el ajuste de los datos a modelos genético-poblacionales, se puede obtener información adicional sobre el tamaño efectivo de las poblaciones, el grado de interconexión genética de las mismas (migración), y los



efectos de la selección natural sobre distintas regiones del genoma en diferentes ambientes (y, por lo tanto, el papel de estas regiones en la adaptación de la especie al medio). Estos aspectos se denominan en conjunto como «estructura genética» de las poblaciones. De la misma manera, también se puede estudiar el efecto que las prácticas de cultivo pueden tener sobre la variabilidad genética, lo que resulta de gran interés de cara a una gestión sostenible de los recursos genéticos en acuicultura. La disciplina que se ocupa del estudio de la variación molecular en las poblaciones es la genética de poblaciones.

Las herramientas más utilizadas para los estudios de variabilidad molecular en los moluscos han sido los marcadores genéticos, y en menor medida, la secuenciación de fragmentos de DNA codificante. Un marcador genético es simplemente un fragmento de DNA, o el producto de su expresión (como una proteína o un rasgo morfológico determinado de manera unívoca por el fragmento de DNA), que presenta polimorfismo (es decir, se pueden distinguir al menos dos variantes de ese fragmento, ya sean diferencias de tamaño o de secuencia nucleotídica), y manifiesta una clara pauta de herencia (puede seguirse su transmisión de padres a hijos mediante observación directa o una técnica adecuada). Durante muchas décadas, los marcadores genéticos se limitaron a variantes de coloración o morfología de animales y plantas de laboratorio o de granja, como los colores de los ojos de las moscas o el color del pelaje de los ratones. El desarrollo de la biología molecular nos permite disponer, hoy en día, de distintas clases de marcadores, en grandes cantidades, y aplicables a todo tipo de organismos. La elección de las regiones genómicas, el tipo de variabilidad a estudiar y las técnicas de detección de la variabilidad utilizadas, determinan los diferentes tipos de marcadores posibles. Ciertas combinaciones de estos factores permiten generar marcadores a partir de una sola región genómica o *locus*, como los alozimas, los RFLPs o los microsatélites, mientras que otras combinaciones permiten obtener marcadores de múltiples regiones genómicas, como los RAPD, los AFLP o los ISSR. En general, los marcadores multilocus presentan dos únicos fenotipos (presencia o ausencia del fragmento analizado) y dominancia (el heterocigoto no se puede distinguir de uno de los dos homocigotos). Los marcadores monolocus suelen presentar varios ale-



los y codominancia (todo los genotipos, homocigotos y heterocigotos, se pueden distinguir). Las características del estudio deben guiar la elección de los marcadores apropiados. Para una discusión más detallada de los distintos tipos de marcadores y sus aplicaciones, puede consultarse la obra de Avise (2004) o la revisión de Chenuil (2006).

Una característica importante que facilita los estudios genéticos es que los marcadores sean neutros, es decir, que el hecho de que un individuo posea genotipos diferentes para un marcador no condicione su supervivencia o su capacidad reproductiva (en suma, su eficacia biológica). En general se asume que el tipo de variabilidad molecular detectada por los marcadores genéticos más habituales es neutra, con escasas excepciones que pueden detectarse a partir del análisis conjunto de los datos (Rand 1996; Ford 2002) o de estudios «*ad hoc*». Recientemente, se ha puesto en tela de juicio la naturaleza neutra del polimorfismo observado en los genomas mitocondriales. Bazin *et al.* (2006) han mostrado que los genomas mitocondriales podrían ser muy sensibles a los «barridos selectivos», es decir, a la sustitución rápida de las variantes de mtDNA presentes en las poblaciones cuando surge una variante favorecida por la selección. Mulligan *et al.* (2006) han señalado que esta sensibilidad podría ser notable en los invertebrados. Este aspecto ha de tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados de los estudios basados en este tipo de marcadores.

En los moluscos, los marcadores más utilizados han sido los alozimas y el DNA mitocondrial, y más recientemente, los microsatélites. Los alozimas son simplemente variantes de una proteína que difieren en su carga eléctrica debido a cambios en su secuencia de aminoácidos que, normalmente, no alteran su función. Estas variantes se pueden estudiar mediante electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida (Figura 1A). Esta técnica fue muy popular durante los años 70 y 80 del pasado siglo. En la década de 1980 se comenzaron a aplicar en genética de poblaciones métodos para el estudio directo de las secuencias de DNA, primero mediante el empleo de enzimas que cortan el DNA en secuencias específicas, denominados enzimas de restricción, y más tarde mediante la secuenciación directa de fragmentos de DNA. Esos métodos se generalizaron tras la invención, en 1987, de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite obtener cantidades de DNA sufi-

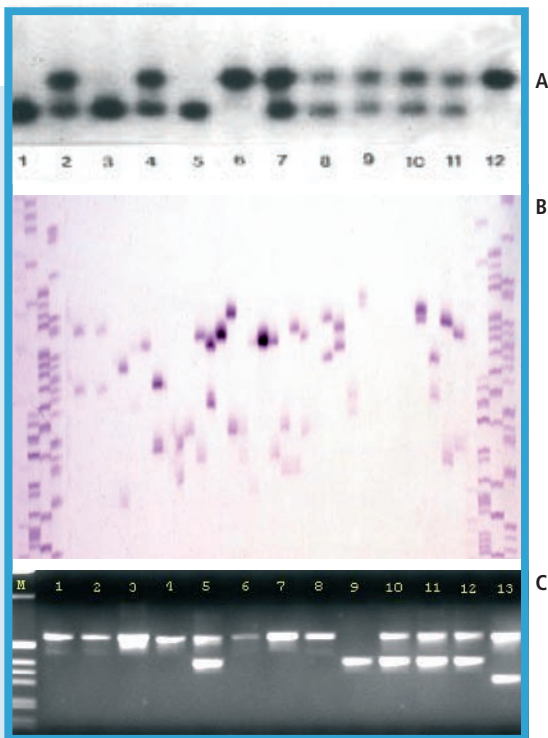
cientes para estudiar casi cualquier zona del genoma. La PCR es la base de la mayoría de marcadores genéticos utilizados hoy en día, como los microsatélites y los AFLPs. En las Figura 1 B y 1 C se muestran dos tipos de marcadores monolocus obtenidos mediante PCR, los microsatélites y

FIGURA 1.

Diferentes tipos de marcadores genéticos moleculares. A. Los alozimas son variantes de proteínas que difieren en su carga eléctrica neta, y se pueden separar mediante electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. En la foto, dos alozimas del enzima arginín kinasa (ARK) de la ostra plana (*Ostrea edulis*). La flecha indica la dirección de la migración en el gel. B. Los microsatélites son fragmentos de DNA compuestos de repeticiones de secuencia sencilla (en este caso TGTGTGT....), en los que el número de veces que la subunidad está repetida varía de unos cromosomas a otros. Las subunidades pueden contener de 2-13 nucleótidos. La región que contiene el microsatélite se amplifica mediante PCR y los fragmentos amplificados se separan en geles de secuenciación (poliacrilamida + urea), agarosas especiales, o, cada vez más, mediante secuenciadores automáticos.

En la foto, microsatélites de ostra japonesa (*Crassostrea gigas*), separados en un gel de secuenciación (foto cortesía de A. Magoulas, Centro Helénico de Investigaciones Marinas).

Las posiciones multibanda a ambos lados del gel contienen un estándar de tamaños. C. Utilizando cebadores diseñados a partir de las secuencias de los exones situados a ambos lados de un intrón, puede amplificarse éste en su totalidad (técnica denominada EPIC-PCR). A menudo los intrones presentan polimorfismos de longitud que pueden detectarse en geles de agarosa o acrilamida, o en secuenciadores automáticos. En la foto, polimorfismo de longitud de un intrón del gen que codifica una proteína de unión a la «TATA box» (TBP) de la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*). Las bandas de la derecha corresponden a un marcador de tamaños conocidos. En todas las fotos, los homocigotos llevan la misma variante alélica, y por lo tanto presentan sólo una banda, y los heterocigotos presentan 2 bandas. M indica un estándar de tamaños.





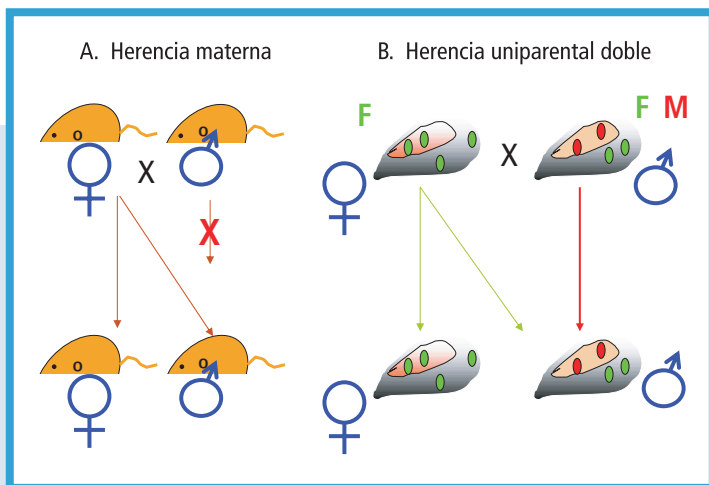
los polimorfismos de intrones. Además, se han diseñado cebadores de PCR «universales» a partir de regiones concretas del genoma que presentan un grado de conservación muy elevado en uno o varios grupos de metazoos. Esto ha permitido estudiar en muchas especies las mismas regiones génicas, como los genes de los RNA ribosómicos (Hillis y Dixon 1991), los genes mitocondriales del citocromo b o de la citocromo oxidasa I (Kocher *et al.* 1989; Folmer *et al.* 1994; Merrit *et al.* 1998), o ciertas regiones intrónicas (Palumbi 1996; Jarman *et al.* 2002).

Una de las regiones genómicas preferidas para los estudios de la estructura genética de las poblaciones animales ha sido el DNA mitocondrial. Una particularidad del DNA mitocondrial de los moluscos, que es de gran importancia a la hora de planificar los estudios interpretar los resultados con marcadores basados en este tipo de genomas, es que presenta un modo de herencia diferente al de otros animales, denominado «herencia doblemente uniparental» (DUI, según sus iniciales en inglés) (Skibinski *et al.* 1994; Zouros *et al.* 1994) (Figura 2). Mientras que en la mayoría de los metazoos existe un único genoma mitocondrial que se hereda exclusivamente por vía materna, en algunos bivalvos existen dos genomas mitocondriales que se transmiten uno por vía materna (genoma F), y otro por vía paterna (genoma M). El genoma M se encuentra exclusivamente en la línea germinal masculina, es decir, en los espermatozoides y sus células precursoras. Es importante por lo tanto, tener en cuenta el sexo de los individuos y el tejido del que se va a extraer el DNA a la hora de planificar los estudios basados en DNA mitocondrial. Aunque este mecanismo de herencia podría estar presente en todos los moluscos, hasta ahora sólo se ha podido demostrar en algunas familias de Bivalvos, como los mejillones marinos (Mitílidos) y de agua dulce (Uniónidos), y las almejas (Venéridos) (Mizi *et al.* 2005, y referencias ahí citadas). No hay evidencias de que se encuentre en los grupos de bivalvos que contienen preponderantemente especies hermafroditas, como las ostras (Fam. Ostreidae) o las vieiras (Fam. Pectinidae), ni en otras clases de moluscos, aunque sería necesario un estudio particularizado de estos y otros grupos taxonómicos para confirmarlo. También se ha comprobado que los genomas F y M pueden presentar recombinación en las especies con DUI (Ladoukakis y Zouros 2001; Rokas *et al.* 2003).

**FIGURA 2.**

Sistemas de herencia del DNA mitocondrial en metazoos. A. El sistema más extendido es la herencia uniparental materna. La progenie de ambos sexos hereda el genoma mitocondrial de su madre, y las mitocondrias presentes en los espermatozoides son destruidas.

B. Herencia doblemente uniparental en los mejillones (*Mytilus*). Existen 2 clases de mitocondrias, que portan, respectivamente, genomas de tipo F (verde) y de tipo M (rojo). El genoma M está presente sólo en la línea germinal de los machos y por lo tanto se detecta sólo en el tejido gonadal. La progenie de ambos sexos hereda el genoma F materno, pero sólo la progenie de sexo masculino hereda el genoma M del padre. Muy ocasionalmente, el genoma F de la madre puede reemplazar al genoma M en los machos, fenómeno conocido como «masculinización» del genoma F.



3. VARIABILIDAD MOLECULAR Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE MOLUSCOS AUTÓCTONOS CULTIVADOS EN EUROPA

La utilización de marcadores genéticos nos ha permitido obtener una visión general de variabilidad molecular de las especies de moluscos cultivadas en Europa. Para describir esta variabilidad es importante distinguir la variabilidad genética intrapoblacional (entre individuos de una población), también denominada diversidad genética o heterozigosis (H), de la variabilidad genética interpoblacional (entre localidades distintas), que refleja la diferenciación genética de las poblaciones, y suele medirse mediante el parámetro F_{ST} (u otro equivalente). Además de cuantificar la variabilidad de las poblaciones, los marcadores gené-



ticos pueden permitir descubrir la existencia de razas, subespecies, o especies crípticas que no habían sido detectadas con anterioridad mediante estudios morfológicos o anatómicos.

La cantidad de variabilidad genética dentro y entre poblaciones está determinada por cuatro factores principales. En primer lugar, por la tasa de mutación, es decir la frecuencia con la que se originan nuevas variantes de un marcador. La tasa de mutación puede variar mucho de unos marcadores a otros: 10^{-4} en los microsatélites, y 10^{-7} en los alozimas, son valores que se manejan habitualmente. El segundo factor a tener en cuenta es el tamaño de la población, que determina la tasa de deriva genética, es decir, el grado de variación de las frecuencias de los alelos de un marcador en el tiempo (entre generaciones). En realidad se trata del «tamaño efectivo», que puede ser muy diferente del tamaño de censo (como se verá más adelante), y que está determinado por aspectos demográficos como la proporción de sexos en la población o la varianza en el tamaño de la familia. Un tercer factor a tener en cuenta es la cantidad de individuos que nacen en una localidad y se reproducen en otra, o tasa de migración, que determina la magnitud del flujo génico entre poblaciones. Cuanto mayor sea éste, menor será el grado de subdivisión poblacional, y por lo tanto más difícil que se establezcan diferencias genéticas entre poblaciones. En los moluscos, que poseen frecuentemente fases larvarias planctónicas relativamente prolongadas, el potencial de dispersión suele ser muy alto, y la diferenciación genética esperada entre poblaciones es pequeña. Aún así, dependiendo de la duración de la fase larvaria, se pueden observar diferencias importantes (Saavedra *et al.* 1993). Por otra parte, la aparición de barreras geográficas u oceanográficas causadas por los movimientos de las masas continentales, los cambios del nivel del mar y de las corrientes, pueden propiciar el aislamiento entre poblaciones durante largos períodos de tiempo, y en consecuencia su diferenciación genética. Finalmente, la variabilidad intra e interpoblacional también se verá afectada por el valor adaptativo de los genes o marcadores, pudiendo resultar en efectos muy diversos, y, además, afectar a otros genes o marcadores situados en su proximidad. Como ya se ha dicho, en los marcadores ideales las diferencias de valor adaptativo entre variantes alélicas son nulas o muy pequeñas. En última instancia, las poblaciones alcanzarán un nivel de variabilidad genética



intra e interpoblacional que resultará de la dinámica establecida entre la cantidad de deriva genética (determinada por el tamaño efectivo), las tasas de mutación y migración, y la selección natural.

En los moluscos comerciales se observa, en general, una gran cantidad de polimorfismo y variabilidad intrapoblacional (H) para casi todos los marcadores genéticos utilizados hasta la fecha (Tabla 1), como cabría esperar en especies con poblaciones muy grandes y tasas de migración potencialmente altas, facilitadas por una fase larvaria planctónica prolongada. Además, en las especies de nuestra área de interés (Atlántico NE y Mediterráneo), se detectan niveles de variabilidad interpoblacional (F_{ST}) relativamente bajos, aunque significativos, incluso entre poblaciones muy alejadas (Tabla 1). En general, los valores medios de F_{ST} son pequeños ($< 5\%$), aunque se ha de tener en cuenta que estos valores implican una diferenciación genética importante. A veces, sin embargo se observan valores muy elevados para algunos marcadores o especies, que pueden indicar efectos de la selección natural o subdivisión poblacional, en la actualidad o en el pasado. Aparte de la magnitud, otro aspecto de la diferenciación genética interpoblacional que es importante para la descripción y gestión de los recursos genéticos es la distribución espacial de la misma, que puede diferir según las especies, pero que a menudo presentan patrones compartidos. El conjunto de estudios genéticos realizados sobre un gran número de especies marinas en el Atlántico NE y el Mediterráneo, ha puesto de manifiesto 4 zonas que suelen estar asociadas a bruscos cambios de frecuencias alélicas en marcadores. Estas zonas de diferenciación genética se localizan en torno a las Islas Británicas, especialmente al N y al S del canal de la Mancha; entre el Atlántico y el Mediterráneo occidental, en torno al frente Almería-Orán; entre las cuencas occidental y oriental del mediterráneo; y entre el Mediterráneo oriental y el Mar Negro. En lo que sigue se resumirán los patrones de diferenciación genética entre poblaciones para distintos tipos de marcadores genéticos en las principales especies de bivalvos cultivados en Europa.

El mejillón cultivado comprende un conjunto de tres especies: *Mytilus trossulus*, localizado en el mar Báltico; *M. edulis* distribuido a lo largo de las costas atlánticas, desde Noruega hasta la frontera entre Francia y España; y *M. galloprovincialis*, que se distribuye desde las islas



TABLA 1.

Diversidad genética intrapoblacional (H) e inter poblaional (F_{ST}) en especies de moluscos de interés en acuicultura, obtenida en estudios de marcadores genéticos moleculares. Se da la media de H para el grupo de poblaciones y la media de F_{ST} para el grupo de genes estudiados, cuando éste es mayor de 1.

Especie	Tipo de Marcador ¹	N.º Marcadores polimórficos ²	Area geográfica	N.º Poblaciones	H (Rango)	FST (Máxima)	Referencia
<i>Crassostrea angulata</i>	Alozymas	8	España SW	10	0,33 (0,29-0,38)	0,031	Michinina et al. 1997
	MtDNA (RFLP)	710 pb, COI	Portugal, España SW, Taiwan	5	0,15 (0-0,25)	0,03	Huvet et al. 2000
	Microsatélites	3	Portugal, España, Taiwan	5	0,93 (0,91-0,95)	0,018 (0,026)	Huvet et al. 2000
<i>Crassostrea gigas</i>	MtDNA (RFLP)	710 pb, COI	Francia, Japón	4	0,09 (0,04-0,18)	0,02	Huvet et al. 2000
	Microsatélites	3	Francia, Japón	4	0,95 (0,94-0,96)	0,006 (0,01)	Huvet et al. 2000
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Alozymas	13	Península Ibérica, S Francia	21	0,35 (0,33-0,36)	0,03 (0,12)	Quesada et al. 1995 c
	Alozymas	7	Mar Egeo	8	0,11 (0,09-0,12)	0,05 (0,12)	Karakousis et al. 1993
<i>Octopus vulgaris</i>	Alozymas	18	Mediterráneo	8	0,09 (0,04-0,13)	0,25	Maltagliati et al. 2002
	Microsatélites	1	Mediterráneo, España NW	9	(0,50-0,84)	0,24	Casu et al. 2002
<i>Ostrea edulis</i>	Alozymas	22	Atlántico NE, Mediterráneo	11	0,09 (0,07-0,12)	0,06 (0,29)	Saavedra et al. 1993
	Microsatélites	5	Atlántico NE, Mediterráneo, Mar Negro	15	0,84 (0,751-0,92)	0,019	Launey et al. 2002
	MtDNA (SSCP)	313 pb, 12S rRNA	Atlántico NE, Mediterráneo, Mar Negro	15	0,49 (0,17-0,71)	0,24	Díaz-Almela et al. 2004

(Continúa)



(Continuación)

Especie	Tipo de Marcador ¹	N.º Marcadores polimórficos ²	Area geográfica	N.º Poblaciones	H (Rango)	FST (Máxima)	Referencia
<i>Pecten maximus / jacobaeus</i>	Alozymas	8	Escocia, UK, Bretaña	11	0,28 (0,22-0,32)	0,02 (0,06)	Beaumont et al. 1993
	Alozymas	14	Península Ibérica, Adriático	6	0,16 (0,13-0,19)	0,03 (0,06)	Ríos et al. 2002
	mtDNA	2000pb, Pma1	Islas Británicas, Bretaña	12	0,80 (0,64-0,87)	0,01	Wilding et al. 1997
	RAPD	51 bandas	Islas Británicas	7	-	0,07	Heipel et al. 1998
	MtDNA	511 pb, 16S rRNA	Atlántico NE, Mediterráneo W, Adriático	7	0,83 (0,65 – 0,90)	0,00	Saavedra y Peña 2005
<i>Ruditapes decussatus</i>	Alozymas	6	Mediterráneo	5	-	0,01 (0,06)	Borsa et al. 1994
	Alozymas	10	Adriático, Túnez	4	0,27 (0,23 - 0,33)	0,10 (0,18)	Pasamonti et al. 1997
	Intrones (longitud, RFLP)	2	Atlántico, Mediterráneo W	2	0,45 (0,31 – 0,54)	0,17 (0,31)	Cordero et al., datos inéditos
<i>R. philippinarum</i>	Alozymas	10	Adriático N	4	0,23 (0,20 - 0,27)	0,05 (0,14)	Pasamonti et al. 1997
	Intrones	3	Japón, Italia	2	0,37 – 0,46	0,02 (0,05)	Cordero et al., datos inéditos

¹ Entre paréntesis, en los casos necesarios, se indica la técnica de detección de polimorfismo utilizada.

² En el caso del mtDNA, se indica el gen y la longitud del fragmento estudiado.



británicas hasta Marruecos, y por todo el Mediterráneo, incluyendo el Mar Negro (Gosling 1992; Comesaña *et al.* 1998; y referencias ahí citadas). Esta última es la principal especie cultivada en Europa, aunque también está presente en otras zonas del mundo (Sanjuán *et al.* 1997; Hilbish *et al.* 2000), en algunas de las cuales ha empezado a cultivarse. Las tres especies hibridan en las zonas de coexistencia (Gosling 1992).

La estructura genética de las poblaciones de *M. galloprovincialis* ha sido estudiada mediante distintos tipos de marcadores. El resultado más llamativo que ha surgido de estos estudios ha sido el descubrimiento de una discontinuidad genética que está asociada a la presencia del frente oceanográfico Almería-Orán (FOAO), entre el SE de la Península Ibérica y el NE de Marruecos. Este frente se forma como consecuencia de la entrada en el Mediterráneo de agua atlántica en superficie a través del Estrecho de Gibraltar (Tintoré *et al.* 1988; Millot 1999). La mezcla de aguas de diferentes temperaturas y salinidades produce remolinos y corrientes entre las costas de Almería y del norte de Marruecos. El agua de procedencia atlántica es desviada a lo largo de la costa norteafricana, formando una corriente que alcanza las costas del N de Túnez. Mediante alozimas, mtDNA e intrones, se ha comprobado que los mejillones de las costas del Mar de Alborán son genéticamente más similares a los del Atlántico, que a los de las poblaciones mediterráneas cercanas, pero situados al otro lado del FOAO (Quesada *et al.* 1995 a, c; Daguin *et al.* 2001) (Figura 3). Esto indica una clara influencia de los factores oceanográficos en el mantenimiento de las diferencias genéticas entre las dos cuencas marinas. Estos estudios, en conjunto, prueban que el Mediterráneo occidental está poblado por mejillones que son genéticamente diferentes de los que viven en el Atlántico y en el Mar de Alborán. Recientemente se han presentado resultados basados en el estudio de 5 microsatélites que corroboran las observaciones realizadas con los otros marcadores (Diz y Presa 2006).

Ningún estudio hasta la fecha ha realizado comparaciones entre las cuencas occidental y oriental del Mediterráneo. Los datos de Rawson y Hilbish (1998) sugieren ligeras diferencias en las frecuencias de las variantes de los genomas mitocondriales F y M entre una población de Venecia y otra del Mediterráneo occidental. Se han realizado comparaciones entre las poblaciones de mejillón del Mediterráneo oriental y el

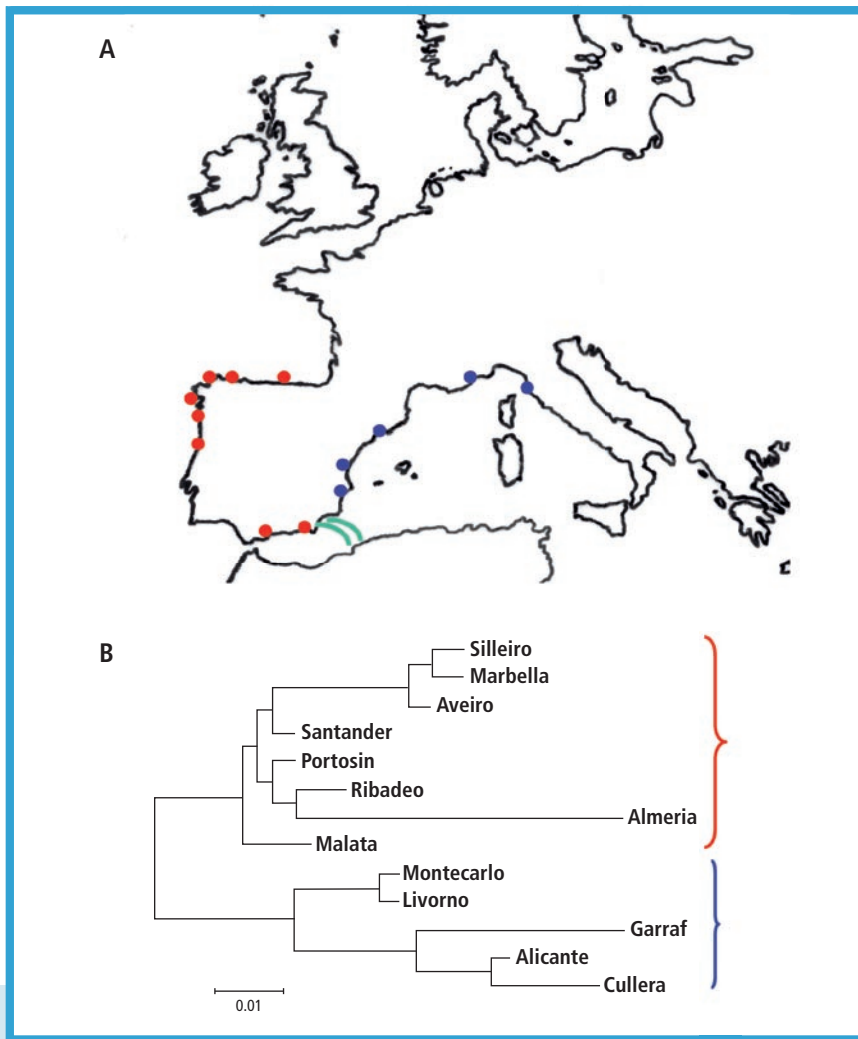


FIGURA 3.

Diferenciación genética de las poblaciones del mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Las frecuencias de los alelos de 13 genes alozímicos estudiados por Quesada et al. (1995 c) en las 13 poblaciones indicadas en el mapa (A) se utilizaron para calcular las distancias genéticas de Nei (1978). La matriz de distancias entre pares de poblaciones se usó posteriormente en un análisis de clúster mediante el método de unión de vecinos (Saitou y Nei 1987). Como resultado se obtuvo un dendrograma (B) que agrupa las poblaciones en 2 grandes grupos (rojo y azul), separados por el frente Almería -Orán (en verde en A).



Mar Negro, aunque basadas sólo en un par de localidades de éste último. Los resultados de un estudio de 6 poblaciones para 5 alozimas sugieren una ausencia de diferenciación genética importante (Ladoukakis, Saavedra y Zouros, datos inéditos). Sin embargo, el estudio del mtDNA ha revelado la existencia de diferencias genéticas entre el Mar Negro y el Mediterráneo, que no se había descrito con anterioridad con otros marcadores genéticos. En este caso, una variante del genoma M, originada recientemente mediante un proceso de masculinización, es preponderante en el Mar Negro, mientras que en el resto del Mediterráneo es más abundante una variante del genoma M relacionada con la que se presenta habitualmente en las poblaciones Atlánticas (Ladoukakis *et al.* 2002). En otro estudio de la variabilidad mitocondrial realizado por Smietanka *et al.* (2004), se aprecian diferencias importantes entre una población del mar Negro y otra del Mediterráneo occidental.

Además de las transiciones abruptas en torno al FOAO y entre el Mediterráneo y el mar Negro, también se ha detectado diferenciación genética entre poblaciones de *M. galloprovincialis* a escalas geográficas menores. En las costas atlánticas ibéricas, la diferenciación genética detectada con alozimas es muy pequeña ($F_{ST} = 0.007$), aunque en las costas del Mediterráneo occidental es tres veces mayor ($F_{ST} = 0.022$) (Quesada *et al.* 1995 c), y en 8 poblaciones del mar Egeo estudiadas por Karakousis *et al.* (1993) se obtuvo un valor promedio de $F_{ST} = 0.05$ basado en 7 loci. El estudio de microsatélites, sin embargo, sugiere una mayor diferenciación entre las poblaciones atlánticas ibéricas, incluyendo las del Mar de Alborán ($F_{ST} = 0.02$), que entre las poblaciones mediterráneas ($F_{ST} = 0.01$) (Diz y Presa 2006).

Al norte de la frontera entre España y Francia, *M. galloprovincialis* coexiste con otra especie (*M. edulis*), con la que hibrida. La zona híbrida es en realidad un mosaico de poblaciones más o menos «puras» de ambos taxones y de poblaciones híbridas, y alcanza hasta las Islas Británicas (Cousteau *et al.* 1991; Gosling 1992; Daguin *et al.* 2001; Bierre *et al.* 2002, 2003). La hibridación ha dado lugar a la introgresión de los genomas mitocondriales, de tal manera que los genomas de tipo «edulis» están presentes en las poblaciones atlánticas de *M. galloprovincialis*, pero disminuyen de frecuencia o desaparecen en las poblaciones del Mediterráneo (Quesada *et al.* 1995b; Rawson y



Hilbish 1998; Smietanka *et al.* 2004). También se ha advertido la presencia de alelos de tipo «*edulis*» de un locus nuclear (intrón *mac-1*) en poblaciones de *M. galloprovincialis*, que se atribuyó a un episodio de introgresión en el pasado (Daguin *et al.* 2001).

La existencia de razas genéticas Atlánticas y Mediterráneas parece ser un fenómeno común en los bivalvos comerciales. En la almeja fina, los primeros estudios mediante 11 polimorfismos alozímicos mostraron una ausencia de diferenciación entre 3 poblaciones de Bretaña (Moraga y Lucas 1983). La comparación de estos datos con los obtenidos por Worms y Pasteur (1982) en una población francesa del Mediterráneo sugiere una escasa diferenciación entre ambas zonas. Sin embargo, el estudio del polimorfismo de longitud de un intrón del gen TBP en 6 poblaciones a ambos lados del FOAO ha revelado la misma pauta que en el mejillón (D. Cordero, J.B. Peña y C. Saavedra, datos inéditos) (Fig. 4). En un segundo intrón, que no presentaba polimorfismo de longitud, el estudio mediante 8 enzimas de restricción no ha permitido detectar diferencias entre las dos cuencas, aunque esto puede deberse a que estos 8 enzimas permiten detectar la variabilidad nucleotídica en regiones que equivalen a sólo el 5% de la longitud total del fragmento. El estudio de estos dos intrones también indica una mayor diferenciación entre las poblaciones atlánticas ($F_{ST} = 0,035 - 0,097$) que entre las mediterráneas ($F_{ST} = 0,004 - 0,012$). Los valores obtenidos para el Mediterráneo con intrones son menores que los obtenidos en un estudio de 6 alozimas en 5 poblaciones distribuidas por toda la cuenca mediterránea por Borsa *et al.* (1994) (F_{ST} comprendido entre 0 – 0,057). El interés de todos estos resultados parciales, a veces contradictorios, indica la necesidad de un estudio detallado de la genética de las poblaciones de almeja fina con distintos tipos de marcadores.

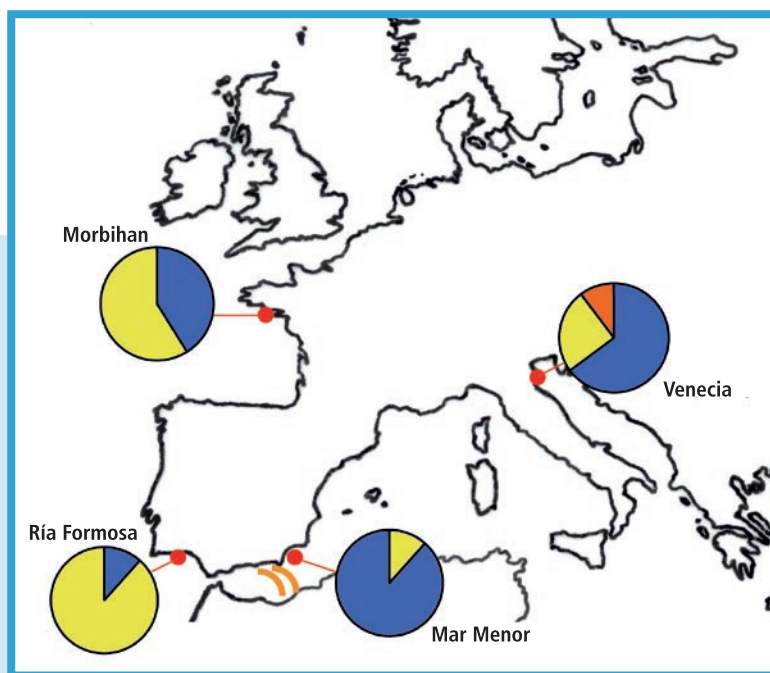
En la vieira, la existencia de dos tipos diferentes en el Atlántico y el Mediterráneo se conoce desde los tiempos de Linneo, que las consideró especies distintas (*Pecten maximus* en el Atlántico y *P. jacobaeus* en el Mediterráneo). Estas dos formas se diferencian bien por sus características morfológicas, especialmente la escultura de las valvas (Figuras 5 A y B). Los estudios iniciales con alozimas demostraron que la diferenciación genética entre las dos «especies» era mínima, y no sobrepasaba lo que es habitual entre poblaciones geográficamente



FIGURA 4.

Diferenciación genética entre poblaciones europeas de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) para el intrón 1 del gen de la TATA Box binding protein (TBP). El intrón muestra un polimorfismo de longitud

con 3 alelos, de 597, 583 y 573 pares de bases. Las frecuencias de los 3 alelos en 4 poblaciones europeas se presentan en diagramas de tartas. El alelo más común en las poblaciones atlánticas es el de 597 pares de bases (amarillo), mientras que en las poblaciones mediterráneas el más abundante es el de 573 pb (azul). Las rayas naranjas indican la posición del frente Almería-Orán.



separadas dentro de una misma especie (Wilding *et al.* 1999, y referencias ahí citadas). Se comprobó que las dos especies eran reproductivamente compatibles en cautividad, y los híbridos de la F1 eran morfológicamente intermedios (J. C. Cochard, citado en Wilding *et al.* 1999). Ríos *et al.* (2002) estudiaron mediante alozimas 6 poblaciones localizadas estratégicamente a ambos lados del FOAO, y comprobaron que, tras un análisis de clúster basado en distancias genéticas, las poblaciones a ambos lados del FOAO formaban dos grupos diferentes (Figura 5 C y D). Los estudios de mtDNA también mostraron una diferencia significativa entre ambos taxones, con un valor de F_{ST} entre taxones de 0,034 (Saavedra y Peña 2005) (Figura 5 E). Estaríamos por lo tanto, en presencia de 2 razas morfológicas o subespecies.

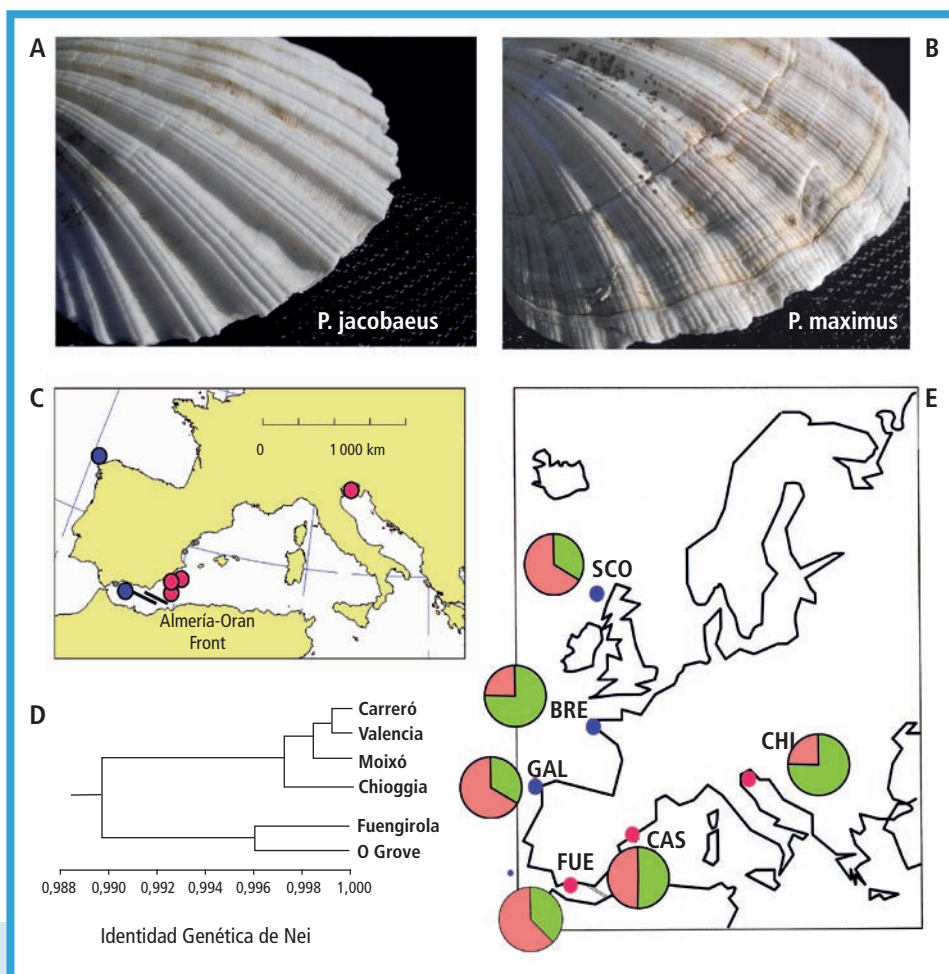


FIGURA 5.

Diferenciación genética en las vieiras europeas (*Pecten* sp.). A. Morfología de la valva derecha en *P. jacobaeus* (PJ) del Atlántico. B. Morfología de la valva derecha de *P. maximus* (PM) del Mediterráneo. Nótese las costillas cuadrangulares en PJ y redondeadas en PM, y la ausencia de estrías longitudinales entre las costillas en PJ. C. Poblaciones de PJ (rojo) y PM (azul) muestreadas por Ríos et al. (2002). D. Dendrograma que muestra el agrupamiento de las poblaciones de PJ y PM en dos grupos genéticamente diferentes, en el estudio de variabilidad alozímica de Ríos et al. (2002). E. Distribución de frecuencias de los dos principales variantes del gen mitocondrial del rRNA 16S en poblaciones atlánticas y mediterráneas (datos de Saavedra y Peña, 2005).

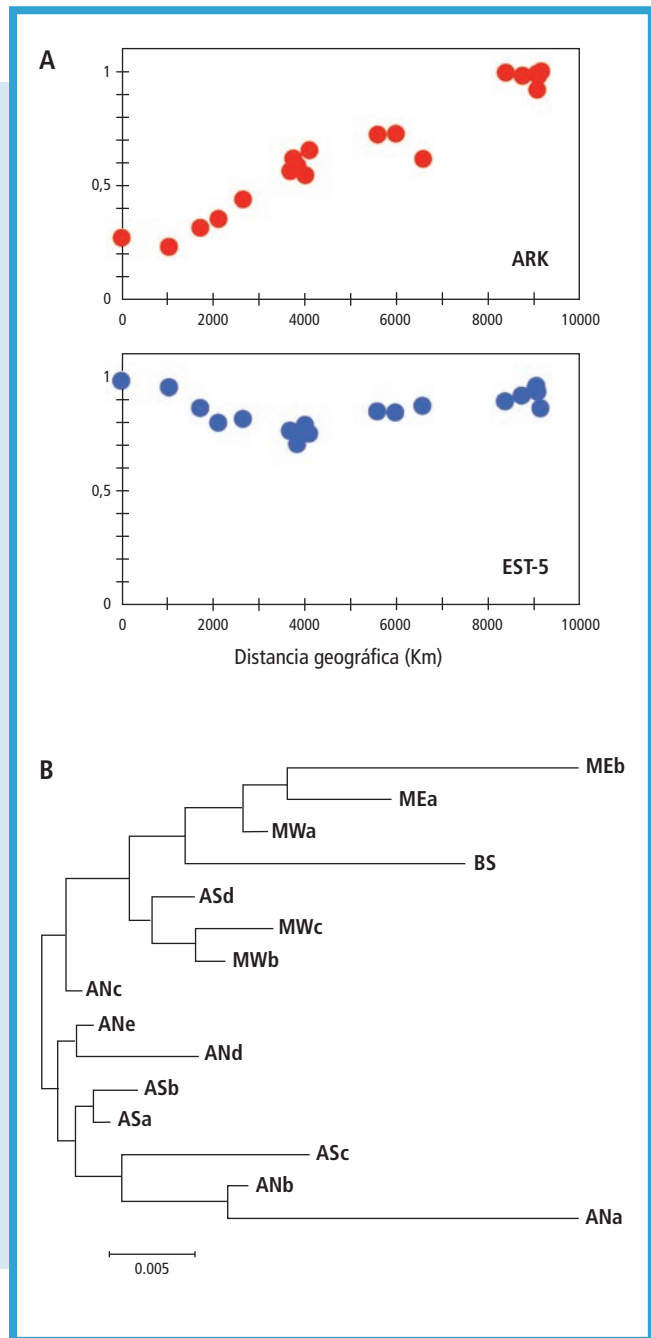


Algunas especies de moluscos parecen no ajustarse a este patrón de cambio genético entre el Mediterráneo y el Atlántico. En la ostra plana, los estudios de 14 alozimas polimórficos demostraron la existencia de cambios graduales de las frecuencias génicas (clinas) en varios alozimas a lo largo de las costas europeas, con valores de F_{ST} muy elevados en los genes *Ark** y *Ap-2** (Saavedra *et al.* 1993, 1995). En ocasiones las clinas se distribuían continuamente desde Noruega hasta Turquía. En otras, se presentaban independientemente en sentidos opuestos dentro de cada cuenca (Figura 6 A). Los autores propusieron una explicación basada en la mezcla reciente de dos poblaciones que se habrían diferenciado genéticamente durante el Pleistoceno debido al cierre del estrecho de Gibraltar y a los cambios climáticos asociados a las glaciaciones. Como es sabido, la ostra plana presenta un hábito incubador, y las larvas permanecen unos 10 días en la cavidad paleal del animal antes de ser liberadas, lo que reduce la fase planctónica a otros 10-15 días y por lo tanto disminuye el potencial migrador de la especie. La formación de clinas se habría visto favorecida, por lo tanto, por tasas de flujo génico relativamente bajas. Los grupos resultantes de un análisis de clúster basado en alozimas indican que las poblaciones del Mediterráneo oriental y del Mar del Norte están relativamente más diferenciadas que las poblaciones de las costas ibéricas y francesas, a ambos lados del Estrecho de Gibraltar. Sin embargo, un estudio posterior basado en 5 microsatélites detectó un pauta de mayor diferenciación genética cuanto mayor era la distancia que separaba las localidades muestreadas (aislamiento por la distancia), pero no una diferenciación mayor entre cuencas (Launey *et al.* 2002) (Fig 6 B). Los autores de este estudio reinterpretaron el significado de las clinas observadas con alozimas por Saavedra *et al.* (1995), sugiriendo que podrían ajustarse también a un modelo de aislamiento por distancia, con excepción de las observadas en *Ark** y *Ap-2**. Estas dos clinas serían debidas a la selección natural, en respuesta a la adaptación a factores ambientales que variaban a lo largo de las costas europeas, como la temperatura del agua o la salinidad. Un tercer estudio basado en mtDNA no halló diferencias entre las cuencas atlántica y mediterránea (Díaz-Almela *et al.* 2004), pero indicaba un flujo genético reducido, al menos en las hembras, confir-



FIGURA 6.

Diferenciación genética entre poblaciones de ostra plana (*Ostrea edulis*). A. Variación clinal a lo largo de las costas europeas en el polimorfismo enzimático de la argininkinasa (ARK). La distancia se mide a partir de la localidad más norteña (Vagstranda, en Noruega). Un segundo locus (AP-2) presenta una pauta similar. (Saavedra et al., 1995). B. clinas de sentido opuesto en el Atlántico y en el Mediterráneo del polimorfismo enzimático de la Esterasa 5 (EST-5). Otros 3 genes muestran una pauta similar (Saavedra et al. 1995). C. Dendrograma que muestra la similaridad genética de 15 poblaciones europeas, basado en las frecuencias alélicas de 5 microsatélites estudiados por Launey et al. (2002). Las denominaciones de las poblaciones estudiadas indican la región de procedencia: Atlántico norte (AN), Atlántico sur (AS), Mediterráneo occidental (MW), Mediterráneo oriental (ME) y mar Negro (BS). Se observa que las poblaciones geográficamente próximas tienden a agruparse juntas.





mando en parte la suposición de Saavedra *et al.* (1995). La resolución de los problemas de interpretación de la variabilidad interpoblacional de la ostra plana requerirá el estudio detallado de la variabilidad nucleotídica de los genes responsables de los alozimas y de un mayor número de microsatélites. Lo que está claro es que existen diferencias genéticas significativas entre las poblaciones de ostras, y que la diferenciación se incrementa cuanto más alejadas estén. Este es un aspecto importante para la gestión de los recursos genéticos de esta especie. El caso de la ostra ilustra las dificultades de interpretación que pueden aparecer en los estudios con marcadores genéticos, pero también la importancia de estudiar distintos tipos de marcadores para obtener una visión de conjunto.

Otras especies que se han incorporado más recientemente a la acuicultura, como el pulpo, apenas han sido estudiadas desde el punto de vista de la genética de poblaciones. La especie de pulpo cultivada en Europa (*Octopus vulgaris*) se consideraba de distribución cosmopolita. Recientemente, sin embargo, el estudio del DNA mitocondrial ha permitido descubrir la existencia de un complejo de especies crípticas (Söller *et al.* 2000). En principio, *O.vulgaris sensu stricto* podría estar restringida al Atlántico NE y al Mediterráneo exclusivamente. Los estudios de las poblaciones mediterráneas, basados en 20 alozimas, indican un grado de diferenciación genética muy elevado entre las poblaciones de esta zona, con un valor medio de F_{ST} de 0.26 (Tabla 1). Este valor está muy influido por el locus *Ldh-1**, que muestra una clara divergencia entre el Mediterráneo oriental y el occidental, con alelos alternativos fijados en cada una de las dos regiones. Un locus microsatélite analizado posteriormente dio un valor similar de F_{ST} (0,24) (Tabla 1). En el Mediterráneo occidental, el valor medio de F_{ST} fue 0,09 (6 poblaciones), y en el oriental alcanzó 0,21 (2 poblaciones). El pulpo tiene un fase larvaria planctónica que puede durar entre 50 y 90 días (Maltagliati *et al.* 2002). Por lo tanto, para explicar la elevada diferenciación genética observada, habría que proponer un relativo sedentarismo de las larvas, que resultase en una tasa de flujo génico moderado o bajo, o un efecto de la selección natural sobre muchos loci, lo que es poco probable. Otra explicación alternativa sería que el Mediterráneo alberga un pequeño complejo de especies crípticas. Los



alozimas también muestran diferencias importantes entre las poblaciones de pulpo para los valores medios de diversidad genética intra-poblacional (Tabla 1), que podrían deberse a diferencias paralelas en los tamaños efectivos de las poblaciones junto a la ausencia de niveles altos de flujo genético.

4. LAS ESPECIES ALÓCTONAS Y EL MANEJO DE SUS RECURSOS GENÉTICOS

Dos de las especies de moluscos más importantes en la acuicultura europea son especies exóticas introducidas desde Asia: la ostra japonesa *Crassostrea gigas*, y la Almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum*. Ambas se introdujeron en los años 70 en Francia con fines experimentales. Posteriormente se comenzaron a cultivar en criadero (*hatchery*) con relativa facilidad, y se introdujeron en otros países: Reino Unido e Italia, y posteriormente, España y Portugal. Ambas especies presentaban características de robustez, rápido crecimiento y resistencia a enfermedades, que favorecieron su cultivo generalizado, desplazando a la ostra plana, la ostra portuguesa y las almejas fina y babosa en las preferencias de los cultivadores. Posteriormente, las dos especies se han naturalizado en amplias regiones de las costas europeas. Gran parte de las poblaciones explotadas se basan en estos bancos naturales, como los de ostra japonesa en la costa atlántica de Francia, y los de almeja japonesa en el Adriático norte italiano y en zonas de las costas española, francesa y británica.

Desde el punto de vista de los recursos genéticos, la introducción de especies exóticas es problemática por varias razones. En primer lugar, porque puede desplazar a especies nativas en un proceso de competencia ecológica. En segundo lugar, porque podría hibridar con especies próximas y amenazar la integridad del acervo génico de éstas. En tercer lugar, la introducción podría dar lugar a pérdidas de variabilidad genética en las poblaciones introducidas, si estas proceden de criaderos y de un número reducido de reproductores. Por estas razones, el Código de Conducta para una Pesca Responsable de la FAO, que fue hecho público en 1994 y ha sido adoptado por la UE como base de su política en este campo, recomienda en su Artículo



9, dedicado a la Acuicultura, evitar las introducciones de exóticas a menos que haya poderosas razones y estudios previos que permitan identificar y prevenir sus riesgos (<http://www.fao.org/docrep/005/v9878e/v9878e00.htm>). Desgraciadamente, estas recomendaciones llegaron cuando ya se habían introducido en Europa varias especies de moluscos, 3 de las cuales han conformado en el pasado y en la actualidad gran parte de la producción de este sector. Se trata de las ostras portuguesa y japonesa y de la almeja japonesa.

La ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*) fue descrita por Lamarck como una ostra autóctona de Europa, distribuida por las costas atlánticas de la Península Ibérica. Sin embargo, diversos autores hicieron notar a mediados del siglo xx que apenas existían diferencias entre esta especie y la ostra japonesa en cuanto a morfología, cariotipo y polimorfismos de proteínas, y que podían cruzarse sin problemas (Menzel, 1974; Mathers *et al.* 1974; Buroker *et al.* 1979). Se sugirió entonces que la ostra portuguesa era en realidad un especie asiática, quizá idéntica a la ostra japonesa, que había sido introducida en Europa por los barcos portugueses que comerciaban con el lejano Oriente en el siglo xvi (Menzel 1974; Buroker *et al.* 1979). Los estudios de secuencias de DNA mitocondrial permitieron determinar que, en efecto, las dos especies eran filogenéticamente muy próximas, y que la ostra portuguesa en realidad era genéticamente similar a las ostras de Taiwan, no a las *C. gigas* de Japón (Banks *et al.* 1993; Boudry *et al.* 1998; O'Foighil *et al.* 1998). Por lo tanto, lo más probable es que ambas ostras hayan sido introducidas en Europa por el hombre, sólo que con una diferencia de 3 ó 4 siglos. Se ha comprobado en el laboratorio la fertilidad de los híbridos de estas dos especies hasta la 2.^a generación (Huvet *et al.* 2002). Esto sugiere que no se deben considerar especies diferentes, sino subespecies o razas geográficas, aunque harían falta estudios detallados en el área de distribución original en Asia para ser concluyente. Recientemente, también se ha comprobado mediante estudios de DNA mitocondrial la presencia de ostras similares a *C. angulata* de Europa y Taiwan en el N de China, que habían sido clasificadas antiguamente como otra especie denominada *C. talienwhanensis* (Lapègue *et al.* 2004). Aunque todos los estudios con marcadores genéticos indican que las ostras japonesas y portu-



guesa son genéticamente muy similares, también indican que están genéticamente diferenciadas, y el mantenimiento de estas poblaciones diferenciadas es importante desde el punto de vista de la conservación de los recursos genéticos.

La ostra portuguesa se introdujo masivamente en Francia en 1868 para sustituir el cultivo de ostra plana, que por entonces sufría una epidemia que diezmó sus poblaciones (Fabioiux *et al.* 2002). La historia se repitió casi 100 años más tarde, en la década de 1970, cuando una viriasis diezmó las poblaciones francesas de ostra portuguesa. Se introdujo entonces la ostra japonesa en Francia (Grizel y Heral 1991), y también se naturalizó rápidamente. Las dos especies se pueden distinguir mediante marcadores genéticos diagnóstico basados en DNA mitocondrial (Boudry *et al.* 1998), y mediante el uso de los mismos se ha podido comprobar que el área de distribución de la ostra portuguesa en Europa se limita hoy en día a sólo unas pocas localidades de las costas del S de Portugal, SW de España y N de Marruecos, algunas de las cuales son explotadas comercialmente (Fabioiux *et al.* 2002). Mediante el empleo de un microsatélite diagnóstico, también se ha comprobado que la introducción de ostra japonesa para el cultivo en algunas de estas poblaciones a dado lugar a híbridos entre las dos especies (Huvet *et al.* 2004). Sería aconsejable diseñar una política de protección eficaz de los recursos genéticos de *C. angulata*, restringiendo la introducción de *C. gigas* en las zonas de presencia de ostra portuguesa, o autorizando sólo el cultivo de ostra japonesa estéril (por ejemplo, triploide).

La variabilidad genética de las poblaciones de ostra portuguesa del Atlántico es alta para distintos tipos de marcadores genéticos (Tabla 1), y similar a las poblaciones de Taiwan, por lo que se deduce que debió introducirse un número suficientemente grande de individuos, quizá en múltiples ocasiones. En las poblaciones relictas europeas y norteafricanas, la diferenciación genética detectada con alozimas, DNA mitocondrial y microsatélites es muy pequeña (Tabla 1). En el caso de la ostra japonesa, la introducción se realizó a partir de decenas de miles de individuos juveniles, a partir de los cuales se realizó la expansión posterior (Utting y Spencer 1992). Por lo tanto, es natural que las poblaciones europeas naturalizadas de esta especie presenten



niveles de variabilidad elevados, similares a los de otras especies de moluscos (Tabla 1).

Por su parte, la almeja japonesa fue introducida accidentalmente en la costa americana del Pacífico en los años 30 y rápidamente se propagó hasta Méjico. En la década de 1970 se introdujo en las Islas Británicas, Francia e Italia, a partir de semilla originaria de Norteamérica y Japón. Posteriormente se introdujo en España. La especie se ha naturalizado rápidamente en todos estos países (Flasch y Leborgne 1992; Utting y Spencer 1992; Breber 2002; Jensen *et al.* 2004; Drummond *et al.* 2006). Aunque el efecto de la introducción sobre las especies autóctonas ha sido muy poco estudiado, en la laguna de Venecia, una de las principales zonas de producción europeas, los estudios disponibles indican que ha desplazado a otras especies de interés económico, como la almeja fina y el berberecho (Pranovi *et al.* 2006). Recientemente, utilizando marcadores genéticos, Hurtado *et al.* (2006) han comprobado la hibridación con la almeja fina en la Ría de Vigo. Estos casos son limitados en número, y aparentemente se restringen a la 1.^a generación de híbridos. Aunque los autores no disponían de marcadores genéticos adecuados para estudiar la presencia de generaciones posteriores de hibridación (F_2 , retrocruzamientos con las formas parentales), las meiosis de los híbridos eran normales, lo que sugiere que las fases posteriores son posibles. Dado el interés económico de ambas especies, y el efecto potencial sobre los recursos genéticos de ambas especies de almejas, esta situación merece ser estudiada en profundidad. Los marcadores genéticos moleculares serán una herramienta fundamental en esta tarea.

En la almeja japonesa, los estudios de variabilidad han sido escasos, limitándose al estudio de alozimas y, recientemente, polimorfismos de longitud de intrones. Ambos estudios indican niveles de variabilidad similares a los de otras especies de almeja (Tabla 1). Los polimorfismos de intrones indican que los niveles de variabilidad de las poblaciones europeas son similares a los de las poblaciones japonesas, y apenas existe diferenciación genética entre estas dos áreas (Cordero, Peña y Saavedra, datos inéditos). Estas conclusiones deben considerarse provisionales dado el limitado número de genes y poblaciones estudiadas.



5. RECURSOS GENÉTICOS Y CARACTERES PRODUCTIVOS

Los estudios basados en marcadores genéticos que se han descrito hasta aquí ofrecen un panorama sobre la variabilidad genética promedio en el genoma de las especies. Sin embargo, desde el punto de vista aplicado es de gran interés el estudio de genes que están directamente implicados en la variabilidad fenotípica observada en rasgos de interés para la producción. El desarrollo de la investigación fisiológica y molecular ha permitido que muchos genes implicados directamente en este tipo de rasgos se estén estudiando ya en cuanto a la relación de la variabilidad molecular y la fenotípica en los vegetales de interés agrícola, en los animales de granja y en los peces de interés para el cultivo. Desgraciadamente el desarrollo de este tipo de investigaciones en los moluscos ha ido muy por detrás, a pesar de ser el principal producto de la acuicultura europea. Muy recientemente, sin embargo, se han descrito dos casos en que la variabilidad molecular ha podido relacionarse directamente con la variabilidad fenotípica en caracteres de gran interés desde el punto de vista de la acuicultura en especies de bivalvos.

El primero de estos casos se ha descrito en la almeja *Spisula solida*, que habita las costas Atlánticas de EEUU y Canadá, y se trata de la relación entre el polimorfismo de un gen que codifica la proteína de un canal de sodio, con la resistencia a las toxinas fitoplanctónicas generadas durante las mareas rojas (Bricelj *et al.* 2005). Un aspecto muy interesante de este estudio es que el polimorfismo estudiado era inter-poblacional, y las variantes resistentes se presentaban en una población con un larga historia de episodios tóxicos. Este estudio representa una aproximación integradora y multidisciplinar de gran interés para otras especies que se ven asimismo afectadas por las mareas rojas. El segundo ejemplo se refiere a la asociación entre el polimorfismo de genes que codifican enzimas digestivos y la tasa de crecimiento en la ostra japonesa. En una población de criadero se pudo establecer que había grandes diferencias en cuanto a crecimiento entre los diferentes genotipos de los dos genes de amilasa (Prudence *et al.* 2006).

Estos estudios, que permiten relacionar directamente la variabilidad molecular con la variabilidad fenotípica en rasgos de interés producti-



vo son, desgraciadamente, excepcionales, aunque es de esperar que vayan haciéndose más y más comunes a medida que avance el estudio de las bases moleculares de la fisiología de los moluscos. El enfoque más habitual para estudiar la variabilidad genética de caracteres cuantitativos ha sido el uso de diseños experimentales basados en cruzamientos, que permiten determinar los componentes genéticos y ambientales de la variabilidad mediante los métodos de la genética cuantitativa. Estos estudios se basan en la descripción de los caracteres en términos estadísticos: medias, varianzas y covarianzas. Así, la varianza fenotípica, es decir, la varianza total observada entre individuos para un carácter, se puede descomponer en un término debido al efecto del ambiente, y otro debido al efecto de los genotipos. A su vez, la varianza genética puede descomponerse en diferentes términos debidos a distintos tipos de efectos, de los cuales los más elementales son los efectos aditivos y la dominancia. La varianza aditiva se origina a partir de las desviaciones respecto al valor medio de la población de los individuos que portan alelos diferentes (por ejemplo, individuos de genotipos AA y BB). La varianza dominante se debe a las desviaciones de los individuos heterocigotos (por ejemplo, AB), respecto a la media de los homocigotos. Existen otros componentes de la varianza fenotípica, como la varianza debida a efectos maternos, o a las interacciones entre genotipo y ambiente, que pueden estimarse mediante diseños experimentales específicos (Falconer y McKay 1995; Lynch y Walsh 1998). El conocimiento de estos aspectos de la variabilidad cuantitativa de las poblaciones es de gran interés de cara a la mejora de la acuicultura, ya que permite orientar las estrategias de mejora mediante metodologías genéticas. Valores elevados de varianzas dominantes podrían sugerir el uso de métodos basados en cruzamientos entre líneas o hibridación entre poblaciones para mejorar el carácter. Valores de varianzas aditivas altos, sugerirían que podrían obtenerse respuestas interesantes a través de programas de selección genética. En este contexto, el cálculo de la heredabilidad, un parámetro que se define como el cociente de la varianza aditiva respecto a la varianza fenotípica total, es de gran interés. En moluscos se han llevado a cabo experimentos para determinar los valores de los distintos componentes de la varianza genética en poblaciones cultivadas (para una revisión véase Beaumont, 1994).



Estos estudios indican que existe una varianza genética sustancial, a veces bastante alta, para caracteres de interés productivo en casi todas las especies estudiadas, aunque a menudo los problemas de diseño experimental no permiten determinar si estas estimaciones son estadísticamente significativas.

Dada la relación entre la varianza aditiva y la respuesta a la selección, otro enfoque posible para calcular la variabilidad es ir directamente a la realización de un programa de selección, y utilizar la respuesta observada para estimar la heredabilidad de la población. En este caso se habla de heredabilidad realizada. En moluscos, ha habido un gran interés por evaluar la posibilidad de selección en numerosas especies comerciales, y se han obtenido estimas de heredabilidad realizada para caracteres de interés productivo. En la Tabla 2 se presentan los resultados de un conjunto escogido de experiencias de este tipo. Los caracteres más estudiados han sido la tasa de crecimiento y la resistencia a diferentes tipos de enfermedades. Los estudios coinciden en indicar la existencia de niveles de variabilidad genética suficientemente elevados para obtener respuestas claras en sólo 1 ó 2 generaciones de selección. Algunas de estas experiencias iniciales se han traducido en programas estables de selección (e.g.: Nell y Perkins 2005, 2006).

Aunque estos estudios indican la existencia de variabilidad genética para caracteres de interés productivo, en general se limitan a una

TABLA 2.

Heredabilidad realizada en diversas especies de moluscos de interés en acuicultura.

Especie	Carácter seleccionado	Gene- ración	Heredabilidad realizada	Referencia
<i>Argopecten irradians</i> stock A	Longitud a los 5 meses	1	0,080 ± 0,009	Zheng et al. 2004
<i>Argopecten irradians</i> stock B		1	0,338 ± 0,015	
		2	0,349 ± 0,057	Zheng et al. 2006
<i>Euvola ziczac</i>	Longitud a los 10 meses	2	0,47	Pérez y Alfonsi 1999
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Longitud a los 2 años	1	0,42 ± 0,10	Hadley et al. 1991
<i>Ostrea edulis</i>	Peso a los 18 meses	1	0,243 ± 0,202	Toro y Newkirk 1990
	Longitud a los 18 meses	1	0,194 ± 0,070	
<i>Sacostrea cucullata</i>	Crecimiento a los 2 años	2	0,277 ± 0,006	Jarayabhand y Thavornyutikarn 1995



población de criadero formada por individuos recogidos de una o pocas localidades cercanas. Frente a estos estudios de variabilidad genética cuantitativa intrapoblacional, resulta de gran interés realizar estudios para evaluar la varianza genética interpoblacional. Estos estudios requieren la realización de cruzamientos entre individuos recogidos en localidades diferentes, idealmente a lo largo del área de distribución de la especie, de manera similar a los estudios realizados con marcadores genéticos. Los cruzamientos han de realizarse en un ambiente común, para evitar confundir los efectos genéticos y ambientales, de ahí que estos experimentos se suelen denominar «common garden», según la expresión inglesa procedente de la genética vegetal. Es fácil darse cuenta que el número de cruzamientos y de poblaciones necesarios resulta en experimentos cuyos requerimientos suelen sobrepasar los recursos de tiempo, espacio de criaderos y personal disponible. Por esta razón, los estudios de este tipo son escasos, y el número de las poblaciones comparadas, pequeño. Las diferencias genéticas entre poblaciones para un carácter cuantitativo suelen medirse mediante el estadístico Q_{ST} (Wright 1951), que representa la proporción de la varianza genética total debida a diferencias genéticas entre poblaciones, y es análogo al estadístico F_{ST} utilizado en el contexto de los marcadores genéticos moleculares. Las comparaciones entre los valores de Q_{ST} y F_{ST} pueden utilizarse, además, para determinar si los caracteres estudiados están siendo objeto de selección natural, y por lo tanto, si tienen valor adaptativo. En este caso, las diferencias entre ambos serían notorias.

Un ejemplo de este tipo de estudios ha sido llevado a cabo por Luttikhuisen *et al.* (2003). Estos autores estudiaron la varianza genética entre poblaciones de *Macoma balthica*, una especie de la familia de los Tellínidos, en Holanda. Las conchas de esta especie presentan diferencias morfológicas notorias entre las poblaciones oceánicas del Mar del Norte y las poblaciones lagunares del Mar de Wadden, que están separadas por una barra costera. Las conchas del ambiente lagunar son más globosas. Mediante cruzamientos en criadero de individuos recogidos en dos localidades lagunares y dos oceánicas, y estudiando un total de 72 familias, los autores demostraron que existía variación genética interpoblacional para el grado de globosidad, y obtuvieron un valor



de $Q_{ST} = 0.41$, indicando la existencia de grandes diferencias entre las dos áreas para los genes responsables de la globosidad de la concha. Además, llevaron a cabo un estudio de las mismas poblaciones mediante marcadores genéticos (alozimas), que arrojó un valor medio de $F_{ST} = 0.012$ para 5 alozimas y otro no significativamente distinto de 0 para un fragmento de 393 pb del gen COI del mtDNA. De estas grandes diferencias entre los valores de F_{ST} y Q_{ST} , y de otros resultados, los autores concluyeron que la globosidad de las poblaciones lagunares estaba favorecida por conferir una mejor adaptación a ese tipo de ambiente, que podría estar relacionada con las diferencias entre los individuos más y menos globosos en cuanto a la facilidad de arrastre por el oleaje y a la predación por cangrejos y aves. Aunque ni la especie ni el carácter son de especial interés para la acuicultura, se trata de un estudio muy riguroso y bien diseñado que puede utilizarse como modelo para estudios similares en especies y caracteres de interés comercial.

Desgraciadamente, el número de familias necesarias para estimas precisas de heredabilidad o de Q_{ST} es a menudo difícil de obtener. Aún así, puede conseguirse información de gran interés para la gestión de los recursos genéticos con un número menor de apareamientos. En la ostra plana (*Ostrea edulis*), Mirella da Silva *et al.* (2005) estudiaron las diferencias genéticas para la tasa de crecimiento y la mortalidad entre 4 poblaciones (Irlanda, 2 localidades gallegas y Grecia), que se eligieron por proceder de zonas que presentaban claras diferencias genéticas en los estudios de marcadores genéticos realizados por Saavedra *et al.* (1995) y Launey *et al.* (2002). Los autores obtuvieron 4-5 familias de ostras por población en un criadero de Galicia, y observaron diferencias significativas e importantes entre las poblaciones de origen para los caracteres estudiados. También encontraron una asociación entre mortalidad e infestación por el haplosporidio *Bonamia ostreae*, y por lo tanto los resultados sugieren diferencias genéticas entre poblaciones en cuanto a la susceptibilidad al parásito. La base genética de tasa de crecimiento y la susceptibilidad a *Bonamia* está apoyada además por la existencia de diferencias significativas entre las familias de cada localidad. En otro experimento, Soletchnik *et al.* (2002) estudiaron las diferencias en crecimiento, supervivencia y reproducción entre las ostras portuguesa y japonesa de diferentes orígenes



geográficos (Taiwan y España en la primera especie, y Japón y Francia en la segunda). En este caso se utilizaron cruzamientos masales puros e híbridos. Las progenies se cultivaron juntas en una localidad de la costa atlántica francesa. Los autores pudieron determinar que existían importantes diferencias genéticas entre las poblaciones en cuanto a la tasa de crecimiento y la mortalidad. Los mejores resultados se obtuvieron en el caso de la ostra japonesa originaria de Francia, lo que sugiere que ha habido una adaptación a este ambiente local desde su introducción en la década de 1970. Los híbridos mostraron un claro efecto materno.

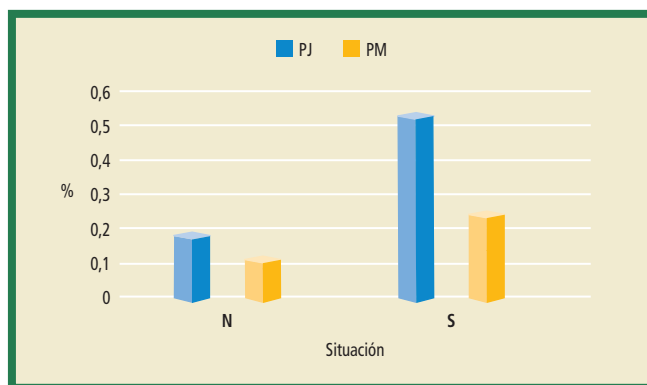
En ocasiones, no es posible realizar cruzamientos, o éstos son muy onerosos, o simplemente el método habitual de cultivo no se basa en la obtención de semilla en criadero. En estas situaciones, un enfoque alternativo es examinar el comportamiento de individuos juveniles recogidos en varias localidades, donde los caracteres de interés muestran diferencias, y transplantarlos a uno o más ambientes donde se pueda realizar su seguimiento. Si las diferencias entre caracteres desaparecen al cultivarse en un ambiente común, la existencia de una base genética para las diferencias entre poblaciones es poco probable. De lo contrario, se tiene una buena base para sospechar que tienen un origen genético, al menos en parte. Este enfoque presenta el problema de que las diferencias observadas podrían haber sido causadas por la selección, previa a la recolección de la semilla, sobre caracteres correlacionados con el carácter estudiado en las distintas localidades de origen, pero de todas formas tiene una utilidad práctica, especialmente en especies en las que el cultivo se basa en el engorde de juveniles recogidos en el medio natural. No es de extrañar, por tanto, que este enfoque se haya realizado especialmente en el mejillón. En los estudios realizados por Fuentes *et al.* (1994, 1995), la semilla recogida en el medio natural en cuatro localidades gallegas se cultivó en bateas en tres zonas de la Ría de Arousa (exterior, media e interior), con características ambientales bien diferentes. El crecimiento y la supervivencia de los mejillones marcados individualmente demostró que la mortalidad de la semilla en los nuevos ambientes estaba más influida por la localidad de origen que por el ambiente de cultivo, mientras que en la tasa de crecimiento ocurría al revés. Aún así, las diferencias



entre localidades de origen y ambientes de cultivo era relativamente pequeñas al alcanzar la talla comercial, y por lo tanto no representaba una ganancia sustancial el recoger semilla específica de ciertas zonas para cultivar en una localidad dada.

Otro estudio similar en curso, se propone comparar las diferencias en el crecimiento y supervivencia de la semilla de las razas atlántica y mediterránea de la vieira (*Pecten sp.*) (Peña, Saavedra y Cordero, resultados inéditos). Como se ha explicado más arriba, estas dos variedades presentan un pequeño grado de diferenciación genética en estudios con marcadores genéticos. La semilla de dos poblaciones mediterráneas, una de *P. jacobaeus* y otra de *P. maximus*, se está cultivando en la costa de Castellón, en un sistema de policultivo con jaulas de dorada (*Sparus aurata*). Las vieiras se engordan en dos ambientes muy diferentes: corriente arriba, una zona de menor alimento y aguas limpias, y corriente abajo, donde los animales pueden aprovechar como alimento los residuos de los piensos de la granja piscícola, pero la calidad del agua es menor. Tras tres meses de seguimiento, los primeros resultados indican que *P. jacobaeus*, la raza local, crece el doble de rápido que *P. maximus* en los dos ambientes (Figura 7). También se observa que el crecimiento de ambas razas es mayor corriente abajo, donde dispone de mayor cantidad de alimento.

FIGURA 7. Crecimiento relativo de las razas atlántica (PM) y mediterránea (PJ) de la vieira (*Pecten sp.*) en la costa de Castellón, a los 3 meses de edad, corriente arriba (N) y corriente abajo (S) de una granja de dorada (*Sparus aurata*).



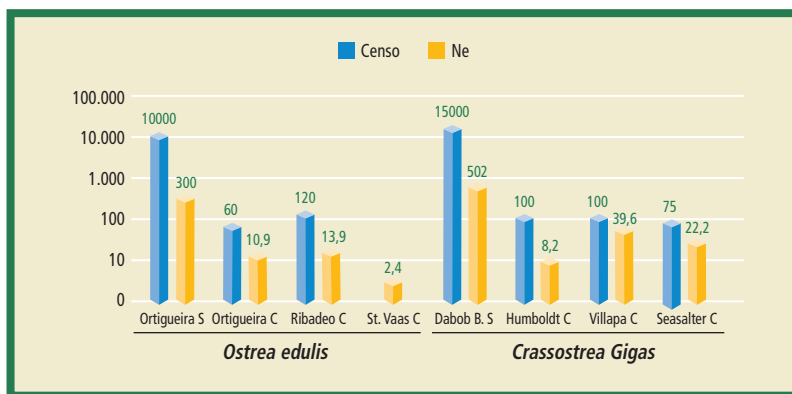


6. EL IMPACTO DE LA LA ACUICULTURA SOBRE LOS RECURSOS GENÉTICOS DE LAS POBLACIONES NATURALES

Existen dos fuentes principales de impacto genético de la acuicultura sobre las poblaciones naturales. Por una parte, los animales cultivados se crían habitualmente en condiciones diferentes de las que experimentarían en el medio natural. Esto conlleva obligatoriamente un efecto de la selección natural en esas poblaciones cultivadas, que favorece los caracteres más adecuados para este nuevo hábitat. En consecuencia, se puede llegar a producir una diferenciación genética apreciable entre las poblaciones cultivadas y las naturales para características influidas por el proceso de cultivo o «rasgos de domesticación». Esta diferenciación puede tener consecuencias negativas sobre las poblaciones naturales en caso de sueltas o escapes de los individuos cultivados. En peces salmónidos existe una gran preocupación por este tema, y se ha visto que los animales escapados de granjas pueden cruzarse con animales salvajes y producir híbridos mal adaptados (McGinnity *et al.* 2003). En los moluscos, este problema parece *a priori* menor, porque en general, los reproductores de los criaderos se cambian cada poco tiempo por otros de origen salvaje. Sin embargo este fenómeno podría tener una incidencia potencial mayor en situaciones en las que se producen poblaciones cerradas de criadero, como por ejemplo, poblaciones seleccionadas.

Por otra parte, la utilización de una población reproductora pequeña en el criadero tiene consecuencias sobre otras dos características de la semilla. En primer lugar, cabe esperar que su variabilidad genética sea menor que la de las poblaciones naturales, ya que se espera que el tamaño efectivo de la población de criadero sea más pequeño (Hedgcock *et al.* 1992). Esta previsión ha sido comprobada en varias ocasiones mediante el estudio de marcadores genéticos. En la Figura 8 se muestran los resultados de estudios realizados en ostra japonesa y en ostra plana. Los tamaños efectivos de las poblaciones de criadero fueron mucho menores que los tamaños de censo. Además, fueron de uno a dos órdenes de magnitud menores que los de las poblaciones naturales, que en varios casos fueron las mismas a partir de las cuales se

FIGURA 8. Tamaños efectivos (N_e) y de censo (número total de individuos reproductores) en poblaciones naturales (S) y cultivadas (C) de ostra plana (Saavedra 1997) y ostra japonesa (Hedgewood y Sly 1990).



obtuvieron los reproductores de los criaderos. Las grandes diferencias entre los tamaños de censo y los tamaños efectivos, y la disminución del tamaño efectivo de las poblaciones de criadero respecto a las salvajes, se puede ver magnificada debido a que en los bivalvos la varianza del tamaño de la familia (el número de descendientes que deja cada reproductor) es muy grande, como se ha podido comprobar mediante análisis de parentesco en poblaciones de ostra japonesa (Boudry *et al.* 2003). Una segunda consecuencia de la producción en criadero sobre la semilla es que los individuos de la progenie de criadero van a estar más emparentados entre sí, en promedio, que los individuos del medio natural, ya que una gran proporción serán hermanos o hermanastros.

Si la semilla de criadero, de menor variabilidad genética y mayor grado de parentesco, se libera en el medio natural y se reproduce, la consecuencia para la población natural es una disminución del tamaño efectivo. La magnitud de esta disminución depende de los valores de los tamaños eficaces de la población salvaje (N_s) y del criadero (N_c), y de la magnitud relativa de la semilla introducida (x) respecto a la procedente de los reproductores salvajes ($1-x$) (Figura 9). Se puede demostrar que el tamaño efectivo sólo permanecerá igual cuando la relación entre estas variables cumpla la relación $x = N_c / (N_c + N_s)$. En las demás situaciones, el tamaño efectivo de la población se reducirá



tras la introducción de la semilla. La principal consecuencia genética es que la variabilidad de la población disminuirá. Otra consecuencia podría ser la manifestación de efectos deletéreos debidos al incremento de la proporción de apareamientos consanguíneos, que podrían resultar en infertilidad o en viabilidad reducida en las siguientes generaciones. Estas consecuencias podrían ser muy leves en la primera generación, pero podrían acentuarse si se repite año tras año la liberación de animales de criadero, y especialmente si los reproductores del criadero se obtienen siempre de la misma población en la que se ha introducido la semilla. Esto no quiere decir que no se deba sembrar semilla en bancos naturales, sino que hay que hacerlo teniendo en

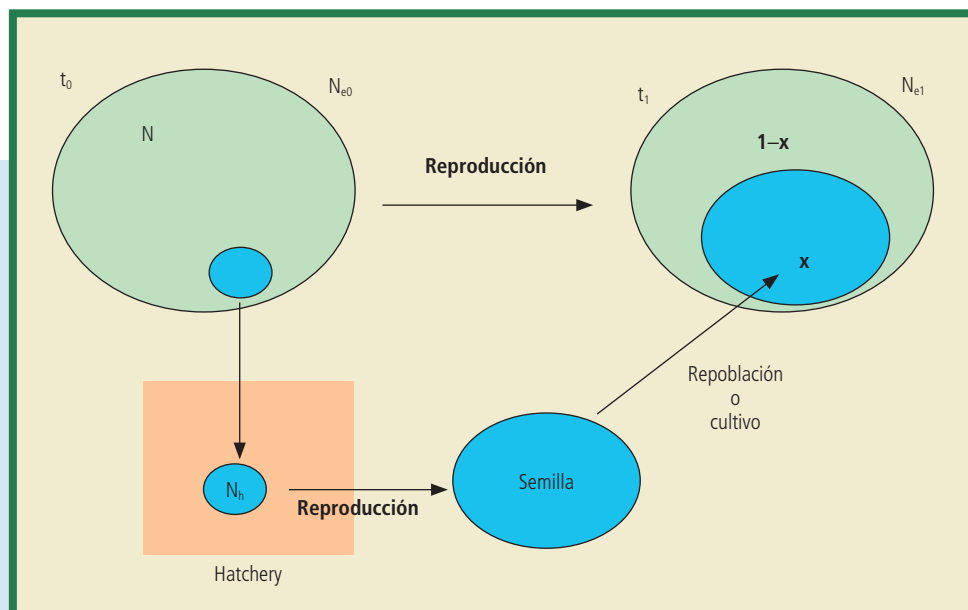


FIGURA 9.

Modelo del efecto de la repoblación con semilla de criadero sobre el tamaño efectivo de una población natural (según Ryman 1991). Una población natural de tamaño de censo N y tamaño efectivo N_{e0} en el tiempo t_0 se utiliza como fuente de reproductores para un criadero (*hatchery*), con un tamaño efectivo N_h . La semilla obtenida se puede utilizar para repobalación o cultivo, y eventualmente se podrá reproducir. En este caso, el tamaño efectivo de la población repoblada (N_{e1}) se reduce en función de la magnitud de N_h y de la proporción de la población procedente del criadero (x).



cuenta estos aspectos y utilizando las herramientas necesarias (i.e.: marcadores genéticos) para hacer un control de la semilla liberada y un seguimiento de las poblaciones, especialmente cuando éstas están sufriendo de por sí un problema de reclutamiento y la semilla se utiliza con objeto de repoblar.

BIBLIOGRAFÍA

- AVISE, J.C., 2004 Molecular markers, natural history and evolution. 2.^a ed. Sinauer, Sunderland.
- BANKS, M. A., D. HEDGECOCK y C. WATERS, 1993 Discrimination between closely related Pacific oyster spp. (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**: 129-136.
- BAZIN, E., S. GLÉMIN y N. GALTIER, 2006 Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* **312**: 570-572.
- BEAUMONT, A.R., 1994 The application of genetics in aquaculture. En: Beaumont A.R. (ed), *Genetics and evolution of aquatic organisms*, Chapman & Hall, Londres, pp 467-485.
- BEAUMONT, A.R., C. MORVAN, S. HUELVAN, A. LUCAS y A. D. ANSELL, 1993 Genetics of indigenous and transplanted populations of *Pecten maximus*: no evidence for the existence of separate stocks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **169**: 77-88
- BIERNE, N., P. BORSA, C. DAGUIN, D. JOLIVET, F. VIARD, F. BONHOMME y P. DAVID, 2003 Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Mol. Ecol.* **12**: 447-461.
- BIERNE, N., P. DAVID, A. LAGLADE y F. BONHOMME, 2002 Can habitat specialisation maintain a mosaic hybrid zone in marine bivalves ? *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **245**: 157-170.
- BORSA, P., M. NACIRI, L. BAHRI, L. CHIKHI, F.J. GARCIA DE LEON, G. KOTOUHAS, y F. BONHOMME, 1997 Zoogeographie infra-spécifique de la mer Méditerranée : analyse des données génétiques populationnelles sur seize espèces atlanto-méditerranéennes (Poissons et Invertébrés). *Vie Milieu* **47** : 295-305.
- BOUDRY, P., B. COLLET, F. CORNETTE, V. HERVOUET y F. BONHOMME, 2003 High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture* **204**: 283-296.
- BOUDRY, P., S. HEURTEBISE, B. COLLET, F. CORNETTE y A. Gérard, 1998 Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata*



- (Lamark) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **226**: 279-291.
- BREBER, P., 2002 Introduction and acclimatisation of the Pacific carpet clam, *Tapes philippinarum*, to Italian waters. En: Leppaköski, E., S. Gollasch, y S. Olenin (eds.) Invasive aquatic species of Europe: distribution, impacts and management. Kluwer, Dordrecht.
- BRICELJ, V.M., L. CONNELL, K. KONOKI, S. P. MACQUARRIE, T. SCHEUER, W. A. CATTERALL y V. L. TRAINER, 2005 Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increase risk of PSP. Nature **434**: 763-767.
- BUROKER, N., W. K. HERSHBERGER y K. K. CHEW, 1979 Population genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. Mar. Biol. **54**: 157-169.
- CASU, M., F. MALTAGLIATI, M. MELONI, D. CASU, P. COSSU, G. BINELLI, M. CURINI-GALLETI y A. CASTELLI, 2002 Genetic structure of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) from the Mediterranean Sea as revealed by a microsatellite locus. It. J. Zool. **69**: 295-300.
- CHENUIL, A., 2006 Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity : from molecular evolution to practical aspects. Genetica **127**: 101-120.
- COMESAÑA, A., D. POSADA y A. SANJUÁN, 1998 *Mytilus galloprovincialis* Lmk. In northern Africa. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **223**: 271-283.
- COUSTEAU, C., F. RENAUD y B. DELAY, 1991 Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on the Atlantic coast of France. Mar. Biol. **111**: 87-93.
- DAGUIN, C., F. BONHOMME y P. BORSA, 2001. The zone of sympatry and hybridization between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus mac-1. Heredity **86**: 342-354.
- DIAZ-ALMELA, E., P. BOUDRY, S. LAUNEY y S. LAPÈGUE, 2004 Reduced female gene flow in the European flat oyster *Ostrea edulis*. J. Hered. **95**: 510-516.
- DIZ, A., y P. PRESA, 2006 Genetic structuring of *Mytilus galloprovincialis* at Iberian coasts. En: Malchus N., y J. M. Pons (eds), Abstracts and Posters of the «International Congress on Bivalvia» at the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, 22-27 July 2006, Organisms Diversity and Evolution, electronic supplement 06-16, part 1: 41, y póster.
- DRUMMOND, L., M. MULCAHY y S. CULLOTY, 2006 The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. Aquaculture **254**: 326-340.
- FABIOUX, C., A. HUVET, S. LAPÈGUE, S. HEURTEBISE y P. BOUDRY, 2002. Past and present geographical distribution of populations of Portuguese (*Crassostrea angu-*



- lata*) and Pacific (*C. gigas*) oysters along the European and North African coasts. *Haliotis* **31**: 33-44.
- FALCONER, D. S., y T. MCKAY, 1996 *Introduction to quantitative genetics*. 4.ª ed. Prentice-Hall, Nueva York.
- FLASCH, J.P., e Y. LEBORGNE, 1992 Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement. *ICES Mar. Sci. Symp.* **194**: 92-96.
- FOLMER, O., M. BLACK, W.V. HOEH, R. LUTZ, y R. VIJENHOEK, 1994 DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Biol. Biotechnol.* **3**: 294-9.
- FORD, M.J., 2002 Applications of selective neutrality test to molecular ecology. *Mol. Ecol.* **11**: 1245-1262
- FUENTES, J. M., I. REYERO, C. ZAPATA y G. ÁLVAREZ, 1994 Production traits of the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW of Spain): relative effects of source of seed and growing environment. *Aquaculture* **122**: 19-31
- FUENTES, J. M., I. REYERO, C. ZAPATA y G. ÁLVAREZ, 1995 Influence of stock and culture site on growth rate and mortality of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) in Galicia, Spain. *Aquaculture* **105**: 131-142
- GJEDREM, T., 1997 Contribution from selective breeding to future aquaculture development. *J. World Aquaculture Soc.* **28**: 33-45
- GJOEN, H.M., y H.B. BENTSEN, 1997 Past, present, and future of genetic improvement in salmon aquaculture. *ICES J. Mar. Sci.* **54**: 1009-1014.
- GRIZEL, H., y M. HÉRAL, 1991 Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Expl. Mer* **47**: 399-403.
- GOSLING, E.M., 1992 Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. En: Gosling, E. (ed.), 1992 *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, Amsterdam.
- HADLEY, N.H., R.T. DILLON Jr. y J.J. MANZI, 1991 Realized heritability of growth rate in the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture* **93**: 109-119.
- HEDGECOCK, D., V. CHOW y R.S. WAPLES, 1992. Effective population numbers of shellfish broodstocks estimated from temporal variance in allelic frequencies. *Aquaculture* **108**: 215-232
- HEDGECOCK, D., y F. L. SLY, 1990 Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **88**: 21-38.
- HEIPEL, C., J.D.D. BISHOP, A.R. BRAND y J.P. THORPE, 1998 Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maximus* in western Britain investi-



- gated by randomly amplified polymorphic DNA. Mar. Ecol. Progr. Ser. **162**: 163-171.
- HILBISH, T.J., A. MULLINAX, S.I. DOLVEN, A.MEYER, R.K. KOEHN y P.D. RAWSON, 2000 Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of trasequatorial migration. Mar. Biol. **136**: 60-77.
- HILLIS, D.M., y M.T. DIXON, 1991 Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q. Rev. Biol. **66**:411- 453.
- HURTADO, S., P. MORÁN y J.J. PASANTES, 2006 Genetic evidence of natural hybridization between *Ruditapes decussatus* and *R.philippinarum*. International Congress on Bivalvia, Bellaterra (Spain).
- HUVET, A., C. FABIoux, H. McCOMBIE, S. LAPÈGUE y P. BOUDRY, 2004. Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. agulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. Mar. Ecol. Progr. Ser. **272**: 141-152.
- HUVET, A., A. GÉRARD, C. LEDU, P. PHÉLIPOT, S. HEURTEBISE, y P. BOURDRY, 2002. Is fertility of hybrids enough to conclude that the two oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species? Aquat. Living Resour. **15**: 45-52.
- HUVET, A., S. LAPÈGUE, A. MAGOULAS, y P. BOUDRY. 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea agulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. Conserv. Genet. **1**: 251-262.
- JARAYABHAND, P., y M. THAVORNUTIKARN, 1995 Realized heritability estimation on growth rate of oyster, *Saccostrea cucullata* Born, 1778. Aquaculture **138**: 111-118.
- JARMAN, S.N., R. D.WARD, y N.G. ELLIOTT, 2002. Oligonucleotide primers for PCR amplification of coelomate introns. Mar Biotechnol **4**: 347-355.
- JENSEN, A.C., J.HUMPHREYS, R.W.G. CALDOW, C. GRISLEY, y P.E. J. DYRYNDA, 2004 Naturalization of the Manila clam (*Tapes philippinarum*), an allien species, and sptabishment of a clam fishery within Poole Harbour, Dorset. J. Mar. Biol. Ass.U.K. **84**: 1069-1073.
- KARAKOUSIS, Y., E. SPANDOU, K. SOPHRONIDIS, y C. TRYANTAPHYLIDIS, 1993 Morphological and allozymic variation in populations of *Mytilus galloprovincialis* from the Aegean Sea. J. Moll. Stud. **59**: 165-173.
- KOCHER, T.D., W.K. THOMAS, A. MEYER, S.V. EDWARDS, S. PZZBO, F.X. VILLABLANCA, y A.C. WILSON, 1989 The dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 6196-6200.



- LADOUKAKIS, E., C. SAAVEDRA, A. MAGOULAS y E. ZOUROS, 2002 Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Mol. Ecol.* **11**: 755-770.
- LADOUKAKIS, E.D., y E. ZOUROS, E., 2001 Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 1168–1175.
- LAPÈGUE, S., F.M. BATISTA, S. HEURTEBISE, Z. YU y P. BOUDRY, 2004. Evidence for the presence of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata*, in northern China. *J. Shellfish Res.* **23**: 759-763.
- LAUNEY, S., C. LEDU, F. BONHOMME, y Y. NACIRI-GRAVEN, 2002 Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *J. Hered.* **93**: 331-338.
- LUTTIKHUIZEN, P.C., J. DRENT, W. VAN DELDEN, y T. PIERSMA, 2003. Spatially structured genetic variation in a broadcast spawning bivalve: quantitative vs. molecular traits. *J. Evol. Biol.* **16**: 260-272.
- LYNCH, M., y B. WALSH 1998 *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer, Sunderland.
- MALTAGLIATI, F., P. BELCARI, D. CASU, M. CASU, P. SARTOR, G. VARGIU, y A. CASTELLI, 2002. Allozyme genetic variability and gene flow in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda, Octopodidae) from the Mediterranean Sea. *Bull. Mar. Sci.* **71**: 473-486.
- MATHERS, N.F., N.P. WILKINS, y P.R. WAINE, 1974 Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) and *C. gigas*. *Biochem. System. Ecol.* **2**: 93-96.
- MCGINNITY, P., P. PRODÖHL, A. FERGUSON, R. HYNES, N. Ó MAOILÉIDIGH, N. BAKER, D. COTTER, B. O'HEA, D. COOKE, G. ROGAN, J. TAGGART, y T. CROSS, 2003 Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon *Salmo salar* as a result of interactions with escaped farm salmon. *Proc. R. Soc. Lond. B* **270**: 2443–2450.
- MENZEL, R.W., 1974 Portuguese and Japanese oysters are the same species. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **31**: 453-456.
- MERRIT, T.J.S., L. SHI, M.C. CHASE, M.A. REX, R.J. ETTER, and J.M. QUATTRO, 1998 Universal *cytochrome b* primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol. Mar. Biol. Evol.* **7**: 7-11.
- MILLOT, C., 1999 Circulation in the western Mediterranean sea. *J. Mar. Syst.* **20**: 423-442.



- MINCHININA, S.R., y REBORDINOS, L., 1997. Genetic differentiation in marine and estuarine natural populations of *Crassostrea angulata*. Mar. Ecol. Progr. Ser. **154**: 167-174.
- MIZI, A., E. ZOULOS, N. MOSCHONAS, G.C. RODAKIS, 2005 The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: implications for the Doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. Mol. Biol.Evol. **22**: 952-967.
- MIRELLA DA SILVA, P., J. FUENTES, y A.VILLALBA, 2005. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). Mar. Biol. **147**: 965-977.
- MORAGA, D., y A. LUCAS, 1983 Polymorphisme enzymatique de trois populations de palourdes (*Ruditapes decussatus* L.) de Bretagne. IFREMER Actes de Colloques 1: 139 150.
- MULLIGAN, C.J., A.KITCHEN, y M.M. MIYAMOTO, 2006. Comment on »Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals«. Science **314**: 1390a
- NEI, M., 1978 Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics **89**: 583-590.
- NELL, J.A., y B. PERKINS, 2005 Evaluation of fourth generation Sidney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines. Aquaculture Res. **36**: 753-757.
- NELL, J.A., y B. PERKINS, 2006 Evaluation of the progeny of third-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850) breeding lines for resistance to QX disease *Marteilia sydneyi* and winter mortality *Bonamia roughleyi*. Aquaculture Res. **37**: 693-700.
- O'FOGHIL, D., P. M. GAFFNEY, A. E. WILBUR, y T. J. HILBISH, 1998 Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Cassostrea angulata*. Mar. Biol. **131**: 497-503.
- PÉREZ, J.E., y C. ALFONSI, 1999 Selection and realized heritability for growth in the scallop, *Eurola ziczac* (L.) Aquaculture Res. **30**: 211-214.
- QUESADA, H., C. M. BEYNON, y D.O.F. SKIBINSKI, 1995 a A mitochondrial DNA discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk: Pleistocene vicariance biogeography and secondary intergradation. Mol. Biol. Evol. **12**: 521-524.
- QUESADA, H., R. WENNE, y D. SKIBINSKI, 1995 b Differential introgression of mitochondrial DNA across species boundaries within the marine mussel genus *Mytilus*. Proc. R. Soc. Lond. B **262**: 51-56



- QUESADA, H., C. ZAPATA, y G. ÁLVAREZ, 1995 c A multilocus allozyme discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: the interaction of ecological and life-history factors. Mar. Ecol. Progr. Ser. **116**: 99-115.
- PALUMBI, S. R., 1996 Nucleic Acids II: the polymerase chain reaction. En Hillis, D.M., C. Moritz, y B.K. Mable (eds) Molecular Systematics, 2.^a ed. Sinauer, Sunderland, pp 205-247.
- PASSAMONTI, M., B. MANTOVANI, y V. SCALI, 1997 Allozymic characterization and genetic relationships among four species of Tapetinae (Bivalvia, Veneridae). Ital. J. Zool. **64**: 117.
- PRANOVI, F., G. FRANCESCHINI, M. CASALE, M. ZUCHETTA, P. TORRICELLI, y O. IOVANVARDI, 2006 An ecological imbalance induced by a non-native species: the Manila clam in the Venice lagoon. Biol Invasions **8**: 595-609.
- PRUDENCE, M., J. MOAL, P. BOUDRY, J. Y. DANIEL, C. QUÉRÉ, F. JEFFROY, C. MINGANT, M. ROBERT, E. BÉDIER, A. VAN WORMHOUDT, J. F. SAMAIN, y A. HUVET, 2006 An Amylase gene polymorphism is associated with growth differences in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*. Animal Genet. **37**: 348-351.
- RAND, D. M., 1996 Neutrality tests and the connection between DNA polymorphism, demography and conservation biology. Coserv. Biol. **10**: 665-671.
- RAWSON, P.D., y T.H. HILBISH, 1998. Asymmetric introgression of mitochondrial DNA among European populations of blue mussels (*Mytilus* spp.). Evolution **52**: 100-108.
- RÍOS, C., S. SANZ, C. SAAVEDRA, y J.B. PEÑA, 2002 Allozyme variation in populations of scallops, *Pecten jacobaeus* (L.) and *P. maximus* (L.) (Bivalvia: Pectinidae), across the Almeria-Oran front. J. Exp.Mar. Biol. Ecol. **167**: 223-244
- ROKAS, A., E. LADOUKAKIS, E. ZOUROS, 2003 Animal mitochondrial DNA recombination revisited. Trends. Ecol. Evol. **18**: 411-417.
- RYMAN, N., 1991. Conservation genetics considerations in fishery management. J. Fish. Biol. **39** (sup. A):211-224
- SAAVEDRA, C., 1997 Low effective sizes in hatchery y populations of the European oyster (*Ostrea edulis*): implications for the management of genetic resources. J. Shellfish Res. **16**: 441-447
- SAAVEDRA, C., y J. B. PEÑA, 2005 Nucleotide diversity and Pleistocene population expansion in Atlantic and Mediterranean scallops (*Pecten maximus* and *P. jacobaeus*) as revealed by the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **323**: 138-150
- SAAVEDRA, C., C. ZAPATA, GUERRA, A., y G. ÁLVAREZ, 1993. Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. Mar. Biol. **115**: 85-95
- SAAVEDRA, C., C. ZAPATA, y G. ÁLVAREZ, 1995. Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster *Ostrea edulis*. Mar. Biol. **122**: 95-104.



- SAITOU, N, y M. NEI, 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- SANJUÁN, A., C. ZAPATA, y G.ÁLVAREZ, 1997 Genetic differentiation in *Mytilus galloprovincialis* Lmk throughout the world. *Ophelia* **47**: 13-31.
- SKIBINSKI, D.O.F., C. GALLAGHER, y C.M. BEYNON, 1994 Sex-limited Mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* **138**: 801-809.
- SMIETANKA, B., M. ZBAWICKA, M. WOLOWICZ, y R. WENNE, 2004 Mitochondrial DNA lineages in the European populaions of mussels (*Mytilus* spp.) *Mar. Biol.* **146**: 79-92.
- SOLETSNIK, P., A. HUVET, O. LE MOINE, D. RZET, P. GEAIRON, N.FAURY, P. GOULLETQUER, P. BOUDRY, 2002 A comparative study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids. *Aquat. Living Resour.* **15**: 243-250.
- SÖLLER, R., K. WARNKE, U. SAINT-PAUL, D. BLOHM, 2000 Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopidae). *Mar. Biol.* **136**: 29-35.
- TINTORÉ, J., P.E. La Violette, I.Blade, y A.Cruzado, 1988 A study of an intense density front in the eastern Alboran sea: the Almeria-Oran front. *J. Phys. Ocnogr.* **18**: 1348-1397.
- TORO, J. E., y G. F. NEWKIRK, 1990 Divergent selection for growth rate in the European oyster *Ostrea edulis*: response to selection and estimation of genetic parameters. *Mar. Ecol. Progr.Ser.* **62**: 219-227.
- UTTING, S.D., y B.E. SPENCER, 1992 Introductions of marine bivalve molluscs into the United Kingdom for commercial culture – case histories. *ICES Mar. Sci. Symp.* **194**: 84-91.
- WILDING, C.S., A.R. BEAUMONT, y J.W. LATCHFORD, 1997 Mitochondrial DNA variation in the scallop *Pecten maximus* (L.) assessed by a PCR-RFLP method. *Heredity* **79**: 178-189.
- WILDING, C.S., A.R. BEAUMONT, y J.W. LATCHFORD, 1999 Are *Pecten maximus* and *Pecten jacobaeus* different species? *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **79**: 949-952.
- WORMS, J., y N. PASTEUR, 1982 Polymorphisme biochimique de la palourde *Venerupis decussata*, de l'étang du Prévost (France). *Oceanol. Acta* **5** : 395-397.
- WRIGHT, S., 1951 The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**: 323-354
- YU, Z, y X. GUO, 2006 Identification and mapping of disease-resistance QTLs in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture* **254**: 160-170.



- ZHENG, H., G. ZHANG, X. LIU, y X. GUO, 2006 Sustained response to selection in an introduced population of the hermaphroditic bay scallop *Argopecten irradians irradians* Lamarck (1819). *Aquaculture* **255**: 579-585.
- ZHENG, H., G. ZHANG, X. LIU, F. S.ZHANG, y X. GUO, 2004 Different responses to selection in two stocks of the bay scallop, *Argopecten irradians irradians* Lamarck (1819). *J.Exp. Mar. Biol. Ecol.* **313**: 213-223.
- ZOUROS, E., A.O. BALL, C. SAAVEDRA, K.R. FREEMAN, 1994 A new type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7463-7474.

3

ESTRATEGIAS EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES COMERCIALES DE MOLUSCOS BIVALVOS

ESTRATEGIAS EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES COMERCIALES DE MOLUSCOS BIVALVOS

R. Freire, J. Fernández-Tajes,
M. J. López-Piñón y J. Méndez

Resumen

El cultivo de moluscos bivalvos representa aproximadamente el 8% de la producción pesquera mundial y el 26% de la producción mundial en acuicultura. El cultivo de bivalvos comenzó en la costa atlántica de Francia y de España en el primer cuarto del siglo xx, desarrollándose rápidamente. Su producción ha continuado aumentando desde los últimos 50 años, con un incremento significativo de la producción durante la última década. España es el principal país productor de bivalvos en Europa, con una producción anual de 275.000 toneladas, siendo el mejillón *Mytilus galloprovincialis* la principal especie explotada. Las zonas productoras de bivalvos más importantes en términos extractivos se concentran en Galicia (noroeste de España) y en Andalucía (sur de España).

Siguiendo la normativa de la legislación europea (Regulación N.º 104/2000 del 17 Diciembre de 1999), sobre la organización común de los mercados en la industria pesquera y en la acuicultura, los productos derivados de la pesca y de la acuicultura (incluyendo a los molus-



cos bivalvos) deben estar correctamente etiquetados con el nombre comercial, el nombre científico, el método de producción y la zona de captura antes de ser puestos en venta. Por lo tanto, para asegurar a los consumidores que la identidad y la calidad de los productos procedentes de la acuicultura que compran son las óptimas, es necesario un etiquetado apropiado. Para comprobar estos parámetros, los productos deben pasar por una serie de análisis muy diversos que requieren diferentes clases de técnicas y equipamiento. Hoy en día, gracias al desarrollo de las técnicas de Biología Molecular y, particularmente, de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se pueden aplicar los mismos principios técnicos y el mismo equipamiento para responder a las cuestiones relacionadas con los ingredientes y la seguridad en los alimentos procedentes de la acuicultura. Los marcadores moleculares de ADN constituyen la herramienta más eficaz para la autenticación y trazabilidad de productos de acuicultura. Estos marcadores se pueden desarrollar tanto a partir de secuencias específicas como de regiones anónimas de ADN. En este capítulo se describirán algunas de las aplicaciones de estas técnicas para la identificación de productos derivados de la acuicultura.

Abstract

*The culture of bivalve mollusks represents approximately the 8% of the world fish production and the 26% of the world aquaculture production. Bivalve mollusk culture began of the Atlantic Coast of France and Spain in the first quarter of the 20th century, it developed rapidly and its production has been increasing in the last 50 years worldwide, with a considerable increase of its production in the last decade. Spain is the main bivalve mollusks aquaculture producer in Europe, with an annual production of 275,000 tons, and with production dominated by of blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. The main bivalve culture regions are concentrated in Galicia (Northwest of Spain) and Andalucía (South of Spain).*

Following the normative of the European legislation (Regulation Nr 104/2000 of Dec. 17, 1999), on the common organization of the markets in fishery and aquaculture, the fishery and aquaculture products (including bivalve mollusks) before retail must be correctly labeled with the commer-



cial name of the species, the production method, and the capture zone. Thus, an appropriate labeling of bivalve species offered for sale is important in order to assure consumers of the identity and quality of the seafood products they purchase. To ensure these issues, seafood products should have had to go through a series of very different analyses requiring quite different expertise and equipment. Nowadays, thanks to the development of molecular biological techniques and in particular the polymerase chain reaction, the same technical principles and equipment can be applied to answer questions about the ingredients used and the safety of foodstuffs. DNA molecular markers constitute the most powerful tools for authentication and traceability in commercial aquaculture products. These markers can be developed from specific sequences or anonymous regions of DNA. This work will describe some of the applications of these modern techniques to ensure seafood safety and identity mainly in bivalve seafood products.

1. INTRODUCCIÓN

En Europa, es sin duda un tema de gran actualidad y preocupación la puesta en valor de los productos alimentarios relacionados con la Pesca y en particular aquellos directamente implicados con el sector extractivo, industrial transformador y conservero de productos del mar.

Considerando que la industria de transformación de productos de la pesca y la acuicultura constituyen un pilar esencial en la política común de Pesca de la Unión Europea, se ha legislado, como se recoge en el Libro blanco sobre seguridad alimentaria (reglamento 178/2002 de la CE) por el que se establecen los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria y se crea la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria. Con ello se pretende favorecer la seguridad de los consumidores y establece obligaciones conducentes a garantizar las calidades y trazabilidad de los productos promoviendo la calidad y creando una imagen de marca que facilite la identificación de los productos que posean estas características específicas. El consumidor europeo es cada vez más exigente y reclama mayores garantías de los productos disponibles en el mercado. La industria comunitaria no tiene otro



camino que apostar por la calidad y convertirla en ventaja competitiva frente a sus competidores foráneos. Es precisa para ello una política de diferenciación, promoción y control.

Los análisis realizados en distintos países han revelado hasta un 30% de rotulaciones falsas, fundamentalmente de atún, dadas las múltiples especies, con su incidencia en calidad y precio y correspondiente fraude para el consumidor. Se impone por tanto, la cooperación europea en materia de análisis y laboratorios y la necesidad de crear laboratorios de referencia para la cooperación y homologación y certificación analítica y como garantía última de calidad y defensa del consumidor europeo.

España se ha caracterizado históricamente por ser cuna de un muy amplio repertorio de productos alimentarios de indudable calidad, en especial los moluscos bivalvos. Por ello, un objetivo básico ha consistido en la necesidad de potenciar las denominaciones geográficas de calidad, las denominaciones de origen o indicaciones geográficas protegidas, ya que esto repercute positivamente en el desarrollo económico de las zonas costeras y además se trata de responder a las demandas cada vez mayores de los consumidores que exigen del mercado que ofrezca productos de calidad contrastada. En marzo de 2006, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (BOE N.º 69 11211-11253), establece las denominaciones comerciales de especies pesqueras y de acuicultura admitidas en España, los nombres científicos de determinadas especies han sido actualizados de acuerdo con el Código Internacional de Clasificación Científica manteniéndose el nombre del género todavía en uso.

El control de los productos debe ser riguroso y debido a la gran afluencia de otros productos extracomunitarios es preciso incrementar los «controles de origen» a fin de que ningún producto de Terceros Estados entre en la Unión Europea sin cumplir las normas que se exigen a los productos comunitarios. Por ello, desde hace varios años, el sector extractivo e industrial transformador de moluscos bivalvos considera de gran interés el desarrollo de técnicas analíticas que posibiliten la elucidación del origen geográfico de los moluscos comercializados y sobre todo los ya transformados.

Ante el declive en muchos países de las capturas de especies de bivalvos autóctonos y el incremento del comercio internacional de pro-



ductos alimenticios, existe el riesgo de que pueda producirse fraude en el etiquetado de las especies, esto es, comercializar especies foráneas como especies autóctonas. Por ello, ahora más que nunca, existe un gran interés tanto por parte de la industria alimentaria como por el consumidor de disponer de métodos de identificación de las especies de moluscos bivalvos, independientemente de la manipulación a la que hayan sido sometidas.

Tradicionalmente, la identificación de moluscos bivalvos se ha realizado empleando criterios morfológicos. Ello requiere la presencia de las valvas y un examen minucioso y preciso que en ocasiones dependen del observador, y a menudo estos caracteres muestran una gran plasticidad debido a que están sujetos a influencias ambientales. Además, en el caso de especies que se comercializan, es frecuente la pérdida de estas características especie-específicas debido a los procesos de manufacturación (ej. cocido y envasado), haciendo que la identificación de especies resulte muy difícil o imposible.

Ya que los criterios morfológicos resultan problemáticos, la atención se ha dirigido hacia la identificación de marcadores moleculares. Éstos corresponden a macromoléculas (proteínas y ADN) que muestran variación entre los individuos (presencia/ausencia o variantes alternativas). Obviamente, cuando los marcadores moleculares se utilizan para la identificación de especies, los individuos de una especie concreta, deben mostrar la misma variante molecular y diferente a la de otras especies relacionadas. Las proteínas empleadas suelen ser antígenos o alozimas y el ADN puede tratarse de genes, fragmentos génicos o cualquier secuencia-región de función conocida o desconocida.

2. GENERALIDADES Y CARACTERÍSTICAS DE LOS MARCADORES MOLECULARES ORIENTADOS A LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

Para la identificación de especies comerciales, los primeros marcadores moleculares desarrollados fueron los marcadores proteicos. El análisis de alozimas y antígenos especie-específicos resulta una herramienta fácil, rápida y fiable para el estudio de muchos polimorfismos.



Sin embargo, presentan una serie de inconvenientes como la expresión diferencial según los tejidos y los diferentes estadios de desarrollo. Además, en el caso de productos manufacturados, el estudio de las proteínas es prácticamente imposible debido a la desnaturalización de la mayoría de ellas.

Los marcadores moleculares basados en el ADN son mucho más efectivos que los proteicos. En primer lugar, el análisis directo del genoma no se ve afectado por el tejido empleado o por el estadio de desarrollo. En segundo lugar, el ADN es más resistente a la degradación que las proteínas. No obstante, la integridad del ADN de partida es de crucial importancia y determinará la técnica que se puede emplear. El método de conservación de los individuos influirá en la calidad del ADN: a bajas temperaturas el ADN se degrada poco y es muy estable (Cerdeña y Koppen 1998), pero durante el procesamiento por calor se degrada rápidamente, generalmente en fragmentos de 500 pares de bases (pb) o menos (Chikuni *et al.* 1990; Unseld *et al.* 1995).

Tanto el genoma mitocondrial como el nuclear pueden ser empleados en la obtención de marcadores moleculares para la identificación de especies comerciales (Tabla 1). El genoma mitocondrial presenta una abundancia importante con respecto al nuclear. Además, al ser circular ofrece una mayor resistencia a la degradación (Borgo *et al.* 1996), con lo que en muestras manufacturadas la amplificación por PCR de ADN mitocondrial es probablemente más fácil de conseguir que la de ADN nuclear. También los genes mitocondriales que codifican para proteínas presentan una tasa de evolución tal que permite su uso en la identificación de especies (Wan *et al.* 2004). Por su parte, el ADN nuclear, aunque puede degradarse más fácilmente, presenta más regiones a analizar y el número de *loci* que se pueden obtener en un solo análisis es mayor que en el caso del ADN mitocondrial.

A la hora de elegir un marcador que resulte útil en la identificación de especies se debe tener en cuenta, en primer lugar, que sea fiable, es decir, que la identificación de las especies sea inequívoca. Para ello, el marcador debe presentar variación suficiente para diferenciar especies, pero ser lo suficientemente conservado para que la variación intraespecífica no solape a la interespecífica (Vences *et al.* 2005). Además, el marcador ha de ser reproducible, rápido y realizable en



TABLA 1

Principales regiones y técnicas empleadas en la identificación de especies

Región	v	Referencias
ADN Mitocondrial		
Citocromo b	PCR-RFLP	Céspedes <i>et al.</i> 1998 ; Russell <i>et al.</i> 2000 ;Chapela <i>et al.</i> 2003
	FINS	Bartlett y Davidson 1992; Sotelo <i>et al.</i> 2001; Chapela <i>et al.</i> 2003
	PCR-SSCP	Rehbein <i>et al.</i> 1997; Martínez y Danielsdóttir 2000
rDNA 16S	PCR-RFLP	Banks <i>et al.</i> 1993 ; Borgo <i>et al.</i> 1996 ; Carrera <i>et al.</i> 1999
	FINS	Guha <i>et al.</i> 2006
	PCR-SSCP	García-Vázquez <i>et al.</i> 2006
	Cebadores específicos	Banks <i>et al.</i> 1993 ; Trotta <i>et al.</i> 2005
rDNA 12S	PCR-RFLP	Borgo <i>et al.</i> 1996 ; Fajardo <i>et al.</i> 2006
	FINS	Lo <i>et al.</i> 2006
	PCR-SSCP	Asensio <i>et al.</i> 2001
	Cebadores específicos	Rodríguez <i>et al.</i> 2003; Martín <i>et al.</i> 2007
ADN Nuclear		
rDNA 18S	PCR-RFLP	Kenchington <i>et al.</i> 1993
	FINS	Ijima <i>et al.</i> 2006 ; Santaclara <i>et al.</i> 2006
	PCR-SSCP	Livi <i>et al.</i> 2006
Región ITS (parcial o completa)	PCR-RFLP	Heath <i>et al.</i> 1995 ; Toro 1998a,b; López-Piñón <i>et al.</i> 2002
	FINS	Pérez <i>et al.</i> 2005
	Cebadores específicos	Connell 2002
rDNA 5S	Amplificación por PCR	Carrera <i>et al.</i> 2000; Pérez y García-Vázquez 2004
	PCR-RFLP	Freire <i>et al.</i> 2005
	Cebadores específicos	Rodríguez <i>et al.</i> 2001
Genes de copia única	Amplificación por PCR	Inoue <i>et al.</i> 1995
	PCR-RFLP	Fernández <i>et al.</i> 2000
	PCR-SSCP	Fernández <i>et al.</i> 2002b
ADN anónimo	RAPD	Martínez e Yman 1998 ; Martínez y Danielsdóttir 2000
	ISSR	Balaravanan <i>et al.</i> 2006; Maltagliati <i>et al.</i> 2006 ; Dusinsky <i>et al.</i> 2006
	AFLP	Chen <i>et al.</i> 2005 ; Kim <i>et al.</i> 2006; Maldini <i>et al.</i> 2006
	SCAR	Rego <i>et al.</i> 2002 ; Das <i>et al.</i> 2005 ; Zhang y Cai 2006



un laboratorio con equipamiento rutinario. La mayoría de las técnicas empleadas para la identificación de especies se basan en un principio en la amplificación por PCR (Bossier 1999). Se pueden amplificar fragmentos específicos o bien fragmentos al azar. La amplificación de fragmentos específicos requiere de un cierto conocimiento de la secuencia a amplificar. No obstante, se han desarrollado cebadores universales que permiten la amplificación de regiones de ADN tanto nuclear como mitocondrial en un amplio rango de especies. Es el caso del ADN ribosómico nuclear y mitocondrial (White *et al.* 1990), o de la Citocromo C Oxidasa en mitocondrias (Folmer *et al.* 1994).

Cuando se emplean estos cebadores universales se pueden obtener tamaños diferentes para cada una de las especies analizadas, con lo que la diferenciación resulta en este caso muy sencilla (ej. Pérez y García-Vázquez 2004). En otras ocasiones sin embargo se obtienen fragmentos del mismo tamaño en especies incluso alejadas. Existen diferentes técnicas que permiten identificar las diferencias existentes entre los fragmentos amplificados. Una de ellas consiste en realizar una digestión con enzimas de restricción: se trata de los marcadores **PCR-RFLPs**, una variación de los RFLPs (Botsein *et al.* 1980) en donde se sustituye la hibridación por Southern Blot por la amplificación de segmentos de ADN por PCR. El resultado de la digestión se puede observar en una electroforesis en gel de agarosa. Tiene la ventaja de ser un método sencillo y relativamente rápido y económico. Además, no es necesario partir de un ADN de alto peso molecular, lo que sí ocurre en los RFLPs tradicionales. Sin embargo, tienen la desventaja de depender de enzimas de restricción, y sin conocimiento previo no es posible saber si alguna nos permitirá diferenciar las especies, con lo que generalmente se debe probar una batería amplia de enzimas de restricción para poder analizar mucho más a fondo el fragmento amplificado. Existen numerosos trabajos que utilizan la técnica de PCR-RFLP para la identificación de las especies (ej. Céspedes *et al.* 1998; Quintero *et al.* 1998 2001; Carrera *et al.* 1999; Russell *et al.* 2000; Santaclara *et al.* 2006)

En otras ocasiones, tras la amplificación lo que se hace es secuenciar el fragmento amplificado para poder identificar las diferencias en la secuencia. La obtención de la secuencia permitirá reconocer sitios



de restricción que pueden ser empleados en una digestión dirigida. También, a partir de las diferencias encontradas, se pueden diseñar **oligonucleótidos específicos** con los que se amplificará de manera selectiva el fragmento de una u otra especie. Generalmente se diseñan los cebadores de manera que el tamaño del fragmento amplificado en cada una de las especies sea diferente, evitando así posibles errores. Según esta técnica, cualquier locus puede ser amplificado, tanto región codificante como no codificante. Si bien el desarrollo de los cebadores específicos requiere un trabajo importante, una vez desarrollados es una técnica sencilla y rápida. Normalmente los ensayos de identificación se realizan empleando PCR multiplex para conseguir así en un único paso la identificación de los individuos analizados. Esta técnica se ha empleado en la identificación de muchos patógenos (ej. Kengluécha *et al.* 2006; Neubauer y Hess 2006; Chen *et al.* 2006), algas (Connell 2002), peces (ej. Trotta *et al.* 2005), rumiantes (Martín *et al.* 2007) y productos manufacturados como el foie gras (Rodríguez *et al.* 2001, 2003).

La secuencia obtenida se puede comparar con un grupo de secuencias de referencia para obtener las relaciones filogenéticas y estimar valores de distancia genética. Esta es la técnica denominada **FINS** (Forensically Informative Nucleotide Sequencing), desarrollada por Barlett y Davidson (1992). La identificación de las especies se realiza en este caso comparando los valores de distancias y la morfología de los árboles filogenéticos. Las secuencias analizadas presentarán una menor distancia genética con aquellas de la especie a la que pertenecen. El fragmento amplificado suele ser de tamaño pequeño, entre las 250 pb, de manera que puede ser secuenciado rápida y fácilmente sin necesidad de clonación previa. Regiones de genes ribosomales y mitocondriales son las más empleadas para esta técnica. Algunos ejemplos se encuentran en peces (Quintero *et al.* 1998; Sotelo *et al.* 2001; Pérez *et al.* 2005) y moluscos (Chapela *et al.* 2003; Santaclara *et al.* 2006).

Las diferencias entre los fragmentos amplificados también pueden ser observadas por **PCR-SSCP** (Single Strand Conformation Polymorphism). Esta técnica permite diferenciar fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con secuencia distinta (Ortí *et al.* 1997;



Sunnucks *et al.* 2000). La principal ventaja es que es un método muy rápido y emplea el equipamiento habitual de un laboratorio de Biología Molecular. Además esta técnica permite discriminar entre dos secuencias que solamente se diferencian en un nucleótido (ej. Wattier *et al.* 2006). El producto de amplificación se desnaturaliza para generar cadenas simples, y se hace migrar en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Las cadenas simples formarán conformaciones diferentes según su secuencia. La detección de los PCR-SSCP se realiza por tinción con plata, fluorescencia o radioactividad. Los PCR-SSCP se han utilizado, entre otros, para la identificación de diferentes especies de bivalvos y peces (Asensio *et al.* 2001; Livi *et al.* 2006; García-Vázquez *et al.* 2006).

Existen técnicas en las que no es necesario partir de conocimiento alguno del genoma de los organismos objeto de estudio. Los marcadores **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) fueron los primeros en ser desarrollados (Welsh y McClelland 1990; Williams *et al.* 1990). Se basan en la amplificación con un único cebador en condiciones de astringencia baja. Al emplear un cebador de tamaño muy pequeño (10 nucleótidos), es muy probable que un genoma contenga varios sitios de unión al cebador, y que además estén uno cerca de otro y en orientación opuesta. La técnica RAPD analiza el genoma completo en busca de ese tipo de repeticiones invertidas, y amplifica fragmentos de tamaño variado. El polimorfismo en los patrones RAPD puede ser debido a: (1) existen diferencias en la secuencia que hay entre dos repeticiones invertidas, con lo que se amplifican tamaños distintos o (2) alguna de las repeticiones invertidas no se encuentra en todos los individuos. Dado que no se tiene conocimiento alguno de la secuencia amplificada, no se podrá distinguir entre uno y otro tipo de variación. La principal ventaja de la técnica RAPD es su rapidez y su mínimo desarrollo: tan sólo se realiza una amplificación por PCR y los productos amplificados se corren en un gel de electroforesis de agarosa. Uno de sus principales problemas es, sin embargo, su reproducibilidad (Olive y Bean 1999). Al tratarse de amplificaciones aleatorias generalmente con temperaturas de *annealing* muy bajas, hay que asegurarse que las bandas producidas son reproducibles. La integridad del ADN es uno de los factores más influyentes en la reproducibilidad de los resultados.



Los marcadores RAPD fallan en su utilización en individuos sometidos a procesos de enlatado, si bien hay algunos casos en los que se han obtenido resultados adecuados con ADN de muestras procesadas (Martínez e Yman 1998; Martínez y Daniélsdóttir 2000).

Otros marcadores para los que tampoco es necesario el conocimiento previo de la secuencia y que permiten analizar una fracción importante del genoma son los ISSR y los AFLPs. Los marcadores **ISSR** (Inter Simple Sequence Repeats) fueron descritos por primera vez en 1994 (Zietkiewicz *et al.* 1994). El principio de este tipo de marcadores es el mismo que el de los RAPD, aunque en este caso los cebadores empleados están constituidos por una secuencia microsatélite con los extremos degenerados. Los cebadores buscan en el genoma repeticiones microsatélite invertidas y amplifican la secuencia que hay entre ellas. Los marcadores ISSR han sido empleados para la identificación de especies en plantas (Balasaravanan *et al.* 2006), peces (Maltagliati *et al.* 2006) y dípteros (Dusinsky *et al.* 2006) entre otros.

Los marcadores **AFLPs** (Amplified Fragment Length Polymorphisms) fueron desarrollados por Vos *et al.* en 1995. En este caso, el ADN genómico se digiere con dos enzimas de restricción y posteriormente se colocan dos adaptadores que permiten la amplificación de los fragmentos. Para la amplificación se emplean cebadores que presentan una parte común con los adaptadores y otra parte de bases selectivas. La visualización de las amplificaciones debe realizarse en geles de poliacrilamida ya que se trata de patrones complejos. Pese a estos patrones complejos, los AFLPs han resultado ser útiles para la identificación de plagas (Kim *et al.* 2006), y se ha desarrollado una base de datos de marcadores AFLPs para la identificación de 32 especies de peces, moluscos y crustáceos (Maldini *et al.* 2006).

Cuando al analizar los marcadores RAPD, ISSR o AFLP aparece alguna banda característica de una determinada especie se puede intentar amplificar de manera selectiva esta banda. Esto es lo que se conoce como marcador **SCAR** (Sequence Characterized Amplified Region) (Paran y Michelmore 1993). Para la obtención de un marcador SCAR se debe clonar y secuenciar la banda de interés para poder diseñar cebadores para amplificarla. Aunque el desarrollo de esta técnica es más laborioso que el de las descritas anteriormente, presenta una



serie de ventajas que la hacen muy atractiva: (1) se detecta un único locus; (2) la amplificación es mucho más reproducible y (3) pueden ser convertidos en marcadores codominantes, con lo que ya se podrán diferenciar heterocigotos. Algunos ejemplos de la técnica SCAR se encuentran en especies de plantas (ej. Das *et al.* 2005), y de peces y moluscos de interés comercial (Rego *et al.* 2002; Zhang y Cai 2006)

Otro tipo de marcadores son los **microsatélites**. También conocidos como repeticiones de secuencias simples (Simple Sequence Repeats, SSRs), son pequeños motivos de 1-8 pb repetidos en tándem un número variable de veces. Están presentes en todos los genomas estudiados, tanto procariotas como eucariotas, y localizados en cualquier región, tanto codificante como no codificante, si bien son más abundantes en estas últimas. El análisis de los microsatélites consiste en la amplificación de la región microsatélite empleando cebadores que se anclan en las regiones flanqueantes. El producto de la amplificación se visualiza en un gel de poliacrilamida o en un secuenciador automático, y se analiza la variación en el tamaño de los alelos amplificados. Los microsatélites presentan tasas de mutación superiores a las de las mutaciones puntuales, y esta inestabilidad es la que los hace muy útiles como marcadores moleculares, pero, si bien han sido empleados en algunos estudios para la identificación de especies (ej. Morgan y Rogers 2001; Huvet *et al.* 2004), el hecho de que las amplificaciones interespecíficas presenten probabilidades de éxito relativamente bajas (Glenn y Schable 2005) reduce la utilización de los microsatélites para la identificación de especies.

3. ESTUDIOS DE IDENTIFICACIÓN DE BIVALVOS COMERCIALES

3.1. Los mejillones

Los mejillones constituyen el grupo de moluscos bivalvos comercialmente más importante a nivel mundial, con una amplia distribución geográfica estando presentes en la mayoría de los hábitats acuáticos. Engloba a un elevado número de géneros y especies siendo el más significativo, en términos económicos, el género *Mytilus*, quizás por



ello existen en la literatura un gran número de estudios encaminados a su caracterización genética. La taxonomía de este grupo de invertebrados marinos permanece todavía en controversia, existiendo aún en la actualidad un arduo debate sobre ella. Las tres especies de mejillones más ampliamente distribuidas son *Mytilus galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus* siendo las dos primeras las que poseen una mayor importancia económica. Se encuentran estrechamente relacionadas entre si e incluso pueden formar híbridos interespecíficos perfectamente viables, lo que complica aún mas su estatus taxonómico. Hablando en términos evolutivos no representan especies separadas sino que pueden ser incluidas dentro de un mismo complejo, que algunos autores como Gosling *et al.* (1992) y Hilbish *et al.* (2000) denominan el complejo *M. edulis*. Los primeros estudios genéticos encaminados a la caracterización e identificación de estas especies fueron diseñados para dilucidar las relaciones taxonómicas existentes entre ellas y el conocimiento de su estructura genético-poblacional. Los alozimas fueron los marcadores moleculares elegidos inicialmente para ser utilizados con este propósito (Skibinski y Beardmore 1979; Skibinski *et al.* 1983; McDonald y Koehn 1988), sin embargo, no se encontró ningún *loci* alozímico que fuera diagnóstico para las tres especies y por lo tanto útil en la identificación a nivel individual. El primer estudio diseñado para la búsqueda de marcadores moleculares especie-específicos para las tres especies de mejillones fue el desarrollado por Inoue *et al.* (1995). Mediante el estudio de la variabilidad de la proteína polifenólica del pie (ppp) diseñaron los cebadores Me 15 y Me 16 que producen fragmentos especie-específicos de 180, 168 y 126 pb característicos de *M. edulis*, *M. trossulus* y *M. galloprovincialis* respectivamente. Estos marcadores se mostraron útiles tanto para la diferenciación de las especies como para la de sus híbridos. Posteriormente, Wood *et al.* (2003) comprobaron el modo de herencia de los cebadores Me15 y Me16 mediante cruces controlados en laboratorio, concluyendo que poseen un modelo de herencia mendeliana y por lo tanto pueden ser utilizados para la identificación de una manera inequívoca de las larvas pertenecientes a las especies del complejo *M. edulis*.

Con la incorporación del mercado sudamericano al comercio mundial del mejillón el interés de los investigadores se dirigió al estudio



de las especies procedentes de ese continente y un elevado número de estudios se enfocaron hacia la caracterización del mejillón chileno *M. chilensis* y de otras especies de mejillones susceptibles de ser utilizadas en la industria conservera. Una de las primeras aproximaciones para distinguir entre *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* fue la llevada a cabo por Rawson *et al.* (1996). Estos autores mediante las regiones nucleares correspondientes a los extremos 5' (Glu-5') y 3' (Glu-3') de un exón de la proteína polifenólica del pie trataban de conseguir la diferenciación entre las cuatro especies; sin embargo con la región Glu-5' sólo pudieron identificar los ejemplares de *M. edulis*, *M. trossulus* y *M. galloprovincialis*, y con la región Glu-3' discriminaron entre *M. edulis* y *M. trossulus*. Toro (1998a) inició un estudio taxonómico de *M. chilensis* comparándolo a *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus* mediante el empleo de caracteres morfológicos y marcadores moleculares nucleares y mitocondriales. Las regiones nucleares elegidas fueron el ITS (correspondiente a los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 y al gen del ARNr 5,8S) y Glu-5' y la región mitocondrial escogida fue la subunidad III de la citocromo c oxidasa (COIII). Los resultados obtenidos para la región ITS y el ADN mitocondrial mostraron una elevada similitud entre *M. chilensis*, *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, diferenciando los individuos de *M. trossulus*, mientras que los obtenidos para Glu-5' revelaron diferencias entre *M. edulis*, *M. trossulus* y *M. chilensis*/*M. galloprovincialis* por lo que este marcador se consideró como potencialmente útil para identificar los dos tipos de mejillón. En base a estos resultados se propuso un cambio del estatus taxonómico de *M. chilensis* para incluirse dentro del complejo *M. edulis* como *M. edulis chilensis*. El mismo autor en 1998b desarrolló un método basado en la amplificación de las regiones nucleares ITS y Glu-5' y en un análisis posterior de fragmentos de restricción que permite la distinción de cuatro especies de mejillones chilenos: *M. edulis chilensis*, *Choromytilus chorus*, *Aulacomya ater* y *Perumytilus purpuratus*. Tanto la región ITS como la Glu-5' produjeron un patrón de restricción característico de cada especie.

Rego *et al.* (2002) utilizaron los marcadores moleculares RAPDs para la identificación de las especies *M. edulis*, *M. chilensis*, *M. galloprovincialis* y *Perna canaliculus*. Basándose en las distintas frecuencias de



las bandas RAPD diseñaron un SCAR que consistió en la amplificación de una banda de 555 pb en los individuos de *M. galloprovincialis*. Además, cuando no se presenta la banda SCAR, si mediante la amplificación con el ABA-07 se produce un patrón de bandas entre 700 y 800 pb, los individuos se identifican como *P. canaliculus*.

Posteriormente, Santaclara *et al.* (2006) ponen de manifiesto la problemática existente en la actualidad en el sector conservero causada principalmente por la incorporación de nuevas especies de mejillón a la producción acuícola, lo que genera graves problemas de trazabilidad y la necesidad de prevenir el posible fraude comercial. Por este motivo, y principalmente debido a la escasez de métodos adecuados para la identificación de mejillones procesados, Santaclara *et al.* han desarrollado un método que aplicado de manera secuencial permite la diferenciación de especies pertenecientes a los géneros *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, *Semimytilus*, *Brachidontes*, *Choromytilus* y *Perumytilus*. Los métodos utilizados fueron el análisis de RFLPs y los FINS. En un primer paso mediante RFLPs y FINS de la región ribosomal 18S ADN se consigue una diferenciación a nivel de género y en ciertos casos a nivel de especie. El segundo paso consiste en la aplicación de varios marcadores para la discriminación de las distintas especies. La caracterización de las pertenecientes a los géneros *Perna* y *Chormomytilus* se consigue mediante el polimorfismo en la amplificación mediante PCR multiplex de un fragmento del ITS1 y la posterior digestión con enzimas de restricción. Las especies del género *Mytilus* fueron identificadas por el polimorfismo de longitud y mediante RFLPs del gen de la proteína polifenólica adhesiva. Estos autores comprobaron la validez de este método mediante su aplicación en productos manufacturados tanto en una planta piloto como en los procedentes del mercado.

3.2. Las ostras

Las ostras pertenecen a la familia Ostreidae que engloba un total de 11 géneros con una amplia distribución geográfica colonizando hábitats acuáticos en las costas indopacíficas, americanas y europeas. Los géneros comercialmente más importantes son *Crassostrea*, *Ostrea*, *Saccostrea* y en menor medida *Ostreola*. La producción de este bivalvo tiene un carácter mundial con los países asiáticos como los principales



productores. En Europa, y, concretamente, en España, las principales especies desde un punto de vista económico son *C. angulata*, *C. gigas* y *O. edulis*. Su principal zona de distribución se encuentra en los estuarios situados en el suroeste de la Península Ibérica.

A pesar del desarrollo que el mercado de estos bivalvos ha experimentado durante las últimas décadas los estudios genéticos encaminados a la diferenciación de las distintas especies de ostras son relativamente escasos. Quizás uno de los principales motivos de esta escasez es debida a la elevada plasticidad en los patrones de crecimiento que, unido a las condiciones ambientales, resulta en un amplio rango de variantes ecofenotípicas, lo cual dificulta enormemente su correcta identificación. Al igual que los mejillones la mayoría de los trabajos realizados desde un punto de vista genético tratan sobre la filogenia de este grupo de invertebrados. Sin embargo, y a pesar del amplio número de estudios realizados sobre este tema, el conocimiento de las relaciones filogenéticas entre los distintos grupos de ostras continua en la actualidad fragmentado. Derivados de esta investigación y del análisis de la diversidad genética poblacional surgen estudios paralelos encaminados a la búsqueda de marcadores especie-específicos principalmente en aquellas especies con un elevado potencial en el mercado.

En Europa, como se ha mencionado anteriormente, las principales especies desde un punto de vista económico son *C. angulata*, *C. gigas* y *O. edulis*. En el caso de las dos primeras existe una gran controversia en relación a su estatus taxonómico porque a pesar de presentar distinta distribución geográfica las diferencias morfológicas son casi imperceptibles y citogenéticamente son muy similares (Leitao *et al.* 1999), siendo consideradas por algunos autores como la misma especie (Gaffney y Allen 1993; Huvet *et al.* 2002; López-Flores *et al.* 2004).

Los alozimas han sido los primeros marcadores utilizados para la diferenciación de especies de ostras, Buroker, en 1982 analizaron la variación genética en tres especies del género *Ostrea*. En la actualidad continúan siendo aplicados como una herramienta para la identificación de este grupo de bivalvos. Así, Day *et al.* (2000) usando alozimas y análisis morfométricos analizaron distintas especies del género



Saccostrea. De un total de ocho sistemas enzimáticos, cuatro se mostraron polimórficos (Leucinoamino peptidasa, *Lap*; Manosa fosfatoisomerasa, *Mpi*; Fosfoglucomutasa, *Pgm*; Fosfoglucoisomerasa, *Pgi*). El análisis de estos *loci* a través del método de componentes principales discriminó a los individuos pertenecientes a *S. glomerata* de los pertenecientes a *S. manilai*.

Los primeros estudios que emplearon marcadores de ADN para la identificación de ostras fueron los desarrollados por Banks *et al.* (1993) y O' Foighil *et al.* (1995). Los primeros, por medio del análisis del polimorfismo de la región mitocondrial 16S, discriminaron de una manera eficiente entre las especies *C. gigas* y *C. sikamea*, las cuales están estrechamente relacionadas entre sí. O' Foighil *et al.*, mediante la secuenciación del ADN mitocondrial 16S para el estudio poblacional de *C. virginica*, *C. gigas* y *C. ariakensis*, observaron que existe una divergencia interespecífica a nivel de secuencia: *C. virginica* exhibió un 85% y un 84% de similitud con *C. gigas* y *C. ariakensis* respectivamente, mientras que la similitud observada entre las dos especies asiáticas fue del 91.5%. Debido a las diferencias interespecíficas existentes a nivel de secuencia el mapa de restricción que los autores generaron reveló un elevado número de endonucleasas que podrían diferenciar estas especies.

La problemática del estatus taxonómico de *C. angulata* y *C. gigas*, dos de las principales especies de ostras comercializadas en España, fue inicialmente abordada por Boudry *et al.* en 1998. Estos autores emplearon el análisis RFLPs de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI) para el estudio de la diferenciación genética entre poblaciones de *C. angulata* y *C. gigas*. Los análisis de restricción del COI reflejaron la presencia de seis mitotipos, dos de los cuales fueron encontrados en el 76% y el 88% de las poblaciones de *C. gigas* y *C. angulata* respectivamente. En un principio estos marcadores ofrecieron una diferenciación parcial entre las dos especies. Sin embargo, el poder discriminatorio desarrollado en este estudio fue puesto en evidencia debido a que alguna de las poblaciones utilizadas no fueron identificadas previamente. Posteriormente, Huvet *et al.* (2000) analizaron la diferenciación genética entre estas dos especies usando ocho *loci* microsatélites, de los cuales cinco mostraron diferencias significativas



en relación al tamaño de los alelos entre ambas. La secuenciación de uno de estos alelos mostró la presencia de una inserción/delección en la región 5', la cual ha permitido diferenciar los dos tipos de ostras utilizando un nuevo marcador PCR-RFLP de esa región. A pesar de estos estudios, y, de la diferencia en la distribución geográfica, el estatus taxonómico de *C. angulata* y *C. gigas* aún permanece en entredicho.

Las ostras de origen asiático, debido a su elevada importancia comercial para estos países, han centrado una gran cantidad de estudios genéticos tanto para el análisis poblacional como para la caracterización de las distintas especies comerciales, principalmente pertenecientes a los géneros *Saccostrea* y *Crassostrea*. Así, Klinbunga *et al.*, en 2001, mediante la aplicación de la técnica RAPD encontraron un elevado número de fragmentos RAPD especie-específicos que posibilitan la discriminación entre *C. belcheri*, *C. iredalei* y *Saccostrea cucullata*. Posteriormente, en 2003 desarrollaron otros tipos de marcadores moleculares para la identificación de las mismas tres especies de ostras comerciales en Tailandia. Las regiones elegidas para la búsqueda de estos marcadores especie-específicos fueron la región ribosomal nuclear 18S y la región mitocondrial del COI. La digestión de la región ADNr 18S con la enzima de restricción *HinfI* permitió la diferenciación de las ostras del género *Crassostrea* de las de los géneros *Saccostrea*. Además, encontraron patrones de RFLPs especie-específicos de *C. belcheri*, *C. iredalei* y de *S. cucullata* cuando el COI fue digerido con dos enzimas de restricción (*Mbol* y *Ddel*). Los haplotipos más comunes generados en las tres especies fueron secuenciados y se diseñaron cebadores específicos para su amplificación. La posterior digestión de los fragmentos amplificados con *Mbol* permitió la diferenciación de manera inequívoca entre *C. belcheri* y *C. iredalei*. En 2005, Klinbunga *et al.* ampliaron el estudio iniciado en 2003 a las especies *S. forskali* y *Striostrea* (*Parastristrea*) *mytiloides* analizando a mayores la región mitocondrial ADNr 16S. En total, observaron 54 haplotipos, encontrando marcadores diagnóstico de especie, al igual que en el estudio anterior, para *C. belcheri*, *C. iredalei* y *S. cucullata*. Sin embargo, no se hallaron marcadores especie-específicos para las especies *S. forskali* y *Striostrea mytiloides*. El estudio de los mapas de restricción generados revelaron



marcadores RFLPs fijados en las especies de *Crassostrea* y *Sacostrea* permitiendo la discriminación entre los dos géneros.

Recientemente, se han llevado a cabo trabajos de investigación que tienen como principal objetivo, o al menos como uno de ellos, la identificación de distintas especies de ostras cultivadas. En 2006, Lapegue *et al.* elaboraron un método basado en la digestión con *RsaI* de la región mitocondrial ADNr 16S para distinguir entre las especies *Ostreola stentina* y *Ostrea edulis*. Cross *et al.* (2006) desarrollaron una estrategia basada en la utilización de la PCR multiplex para la identificación de las especies *C. angulata*, *C. gigas*, *O. edulis* y *O. stentina*, las de mayor importancia para el mercado español. Mediante la secuenciación de la región no transcrita del ADNr 5S diseñaron cebadores específicos para su amplificación, lo que permitió la diferenciación entre *C. angulata/C. gigas*, *O. edulis* y *O. stentina*. En 2006, Pie *et al.*, debido a la introducción de especies de ostras para el cultivo comercial en el Suroeste de Brasil, pusieron a punto un protocolo para la diferenciación entre las especies de ostras nativas (*C. brasiliiana*, *C. rizophorae*) y las introducidas (*C. gigas*) basado en el análisis de RFLPs de la región mitocondrial 16S.

Como se ha podido apreciar, la mayor parte de los estudios encaminados a la diferenciación de ostras están relacionados con especies destinadas al consumo alimenticio. Sin embargo existe otro grupo de ostras, comercialmente importantes, las ostras perlíferas, pertenecientes a la familia Pteriidae con el género *Pinctada* como el principal. Los estudios genéticos encaminados a la diferenciación de este tipo de especies son prácticamente inexistentes restringiéndose casi exclusivamente al desarrollado por Masaoka y Kobayashi (2005), los cuales diseñaron un protocolo para la identificación entre las especies de ostras perlíferas *P. imbricata*, *P. martensii* y *P. fucata*. La amplificación de una región parcial del espaciador intergénico IGS del ADNr mostró que existe polimorfismo de longitud entre *P. imbricata* (590 pb) y las otras dos especies (427 pb). El posterior análisis mediante RFLPs de esta región demostró que existen diferentes patrones que diferencian entre *P. imbricata* y las otras dos especies. Esta diferencia especie-específica en los patrones de restricción del IGS también fue observada en la digestión de la región mitocondrial ADNr 16S.



3.3. Los pectínidos

La familia Pectinidae presenta alrededor de 400 especies, de las cuales no más de 30 son de importancia económica, ya sea porque sustentan alguna pesquería o porque están sometidas a actividades de cultivo dispersas en casi todos los continentes. Tienen gran aceptación en los principales mercados mundiales, alcanzando precios elevados. El mayor volumen de capturas se concentra en China y Japón, aunque también es importante la producción en países como Canadá, Argentina, Estados Unidos, Reino Unido, Perú, Chile, Francia, Australia y México. En España la pesquería de pectínidos se concentra fundamentalmente en las rías gallegas y costas de Málaga, comercializándose tres especies, la zamburiña *Mimachlamys varia*, la volandeira *Aequipecten opercularis* y la vieira *Pecten maximus*. La importancia económica de estas especies no es la misma, no sólo por el volumen de capturas sino también por el precio que cada una de estas especies alcanza en el mercado.

La importancia comercial de los pectínidos ha hecho que sean objeto de numerosos estudios genéticos. Sin embargo, la gran mayoría están encaminados al análisis de la estructura de población con miras al cultivo de las especies, y son muy escasos los estudios en los que se trata de buscar marcadores para la identificación de las especies. La identificación de los pectínidos se realiza principalmente empleando criterios morfológicos (Wagner 1991), generalmente la valva o características microscópicas en el caso de ejemplares de pequeño tamaño (Peña *et al.* 1998). Sin embargo, cuando éstas no aparecen o lo hacen ligeramente distorsionadas, como es el caso de los ejemplares manufacturados, hay que recurrir a marcadores moleculares.

Beaumont (1991) analizó diferentes sistemas enzimáticos en cuatro especies de pectínidos europeas, *P. maximus*, *M. varia*, *A. opercularis* e *Hinnites (Chlamys) distortus*. De ellas, sólo las tres primeras son especies de importancia comercial en Europa. En el estudio se encontraron para cada una de estas especies formas diagnóstico para al menos uno de los *loci*. Kenchington *et al.* (1993) encontraron dos sistemas enzimáticos, la *Mpi* y la glutámico oxalacetato transaminasa, *Got* que resultaron diagnóstico para la diferenciación entre *Placopecten magellanicus* y *C. islandica*. Paugam *et al.* (2000, 2003) emplearon técnicas inmunológicas para la identificación de *P. maximus*.



Si bien se han desarrollado algunos marcadores de ADN específicos para algunas especies comerciales de pectínidos, la mayoría de ellas no han sido testadas en otros pectínidos ya que su desarrollo está dirigido hacia estudios larvarios y se busca más que identifiquen a la especie en su entorno natural, donde no tiene por qué coexistir con otros pectínidos. Es el caso la sonda de ADN mitocondrial desarrollada para *Argopecten irradians* (Seyoum *et al.* 2003). En otros casos los marcadores desarrollados son específicos de género, como ocurre con la sonda de ADNr 18S diseñada para *Argopecten* sp. por Frischer *et al.* (2000), que no permite la diferenciación entre *A. irradians* y *A. gibbus*. Otros marcadores se han desarrollado para identificar especies de pectínidos y diferenciarlas de otras especies que no pertenecen a la familia. Es el caso de *P. maximus* y *Mytilus* spp. Las larvas de estos dos bivalvos fueron identificadas empleando como marcadores PCR específicas de ADNr 18S y ADNr 16S (Bendezu *et al.* 2005). Sin embargo estas ampliificaciones específicas deben tomarse con cuidado, ya que al emplear los cebadores sintetizados en *M. varia* y *A. opercularis*, pectínidos que coexisten con *P. maximus*, se obtienen fragmentos de similar tamaño y difícilmente diferenciables de los obtenidos para la vieira.

Los estudios que desarrollan marcadores de ADN para diferenciar especies comerciales de pectínidos se reducen a tres. El primero de ellos es el realizado por Kenchington *et al.* (1993), en el que, además de los marcadores alozímicos, realizan un análisis de la secuencia del gen del ARNr 18S y aplican RFLPs para la identificación de *P. magellanicus* y *C. islandica*. Al analizar las 1815 pb secuenciadas del gen del ARNr 18S encontraron 15 sustituciones entre las dos especies. Estas diferencias les permitieron encontrar algunas enzimas de restricción que podrían ser empleadas para la diferenciación de las especies. De las candidatas, los autores eligieron a *XhoI*, que presenta un único sitio de corte en *P. magellanicus*, dando lugar a dos fragmentos de 1717 y 98 pb respectivamente, y dos en *C. islandica*, apareciendo tres fragmentos de 1436, 281 y 98 pb.

El segundo de los estudios publicados corresponde al realizado por López-Piñón *et al.* (2002), en el que se consigue diferenciar *A. opercularis*, *M. varia*, *H. distortus* y *P. maximus*. En este caso, se empleó la región ITS. La amplificación se realizó empleando cebadores que anclaban en los genes 18S y 28S. Los fragmentos amplificados presentaron tamaños



entre las 700 y las 800 pb. La digestión de los fragmentos amplificados con las enzimas *AluI* y *SmaI* produjo patrones de bandas específicos para cada una de las cuatro especies: para la enzima *AluI*, en *A. opercularis* se observaron tres fragmentos de 541, 116 y 91 pb respectivamente, en *M. varia* dos de 584 y 158 pb, en *H. distortus* dos de 549 y 141 pb y en *P. maximus* se observaron dos fragmentos de 650 y 118 pb (Figura 1). Para la enzima *SmaI*, en *A. opercularis* se produjeron dos fragmentos de 412 y 336 pb, en *M. varia* dos de 608 y 134 pb, y en *H. distortus* y *P. maximus* no existe diana de restricción pero el tamaño del fragmento amplificado es distinto en cada caso (Figura 2).

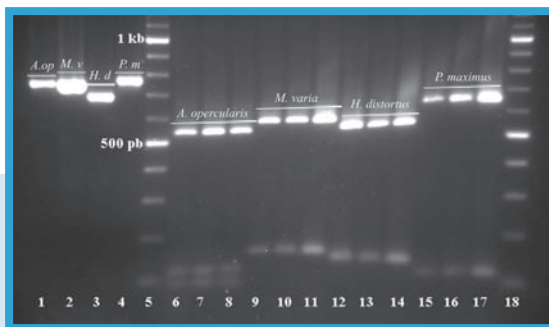


FIGURA 1.

Análisis electroforético (agarosa al 2%) mostrando los patrones de restricción de la región ITS obtenidos con la enzima *AluI* en las especies *A. opercularis* (*A. op.*), *M. varia* (*M. v.*), *H. distortus* (*H. d.*) y *P. maximus* (*P. m.*). Carriles 1-4: producto de PCR sin digerir; carriles 5 y 18: marcador de peso molecular de 100 pb.

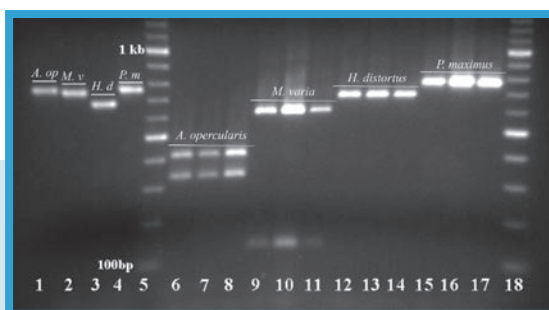


FIGURA 2.

Análisis electroforético (agarosa al 2%) mostrando los patrones de restricción de la región ITS obtenidos con la enzima *SmaI* en las especies *A. opercularis*, *M. varia*, *H. distortus* y *P. maximus*. Carriles 1-4: producto de PCR sin digerir; carriles 5 y 18: marcador de peso molecular de 100 pb.



Dado que el tamaño del fragmento amplificado por estos autores resultó superior a las 500 pb, la aplicación de este marcador a muestras en conserva puede ser complicada. Por ello, las secuencias se sometieron a un análisis BLAST (Altschul *et al.* 1997) para la delimitación de la región correspondiente a cada uno de los espaciadores y al gen 5,8S, y, con estos datos, se diseñaron nuevos cebadores para amplificar solamente el ITS2. El tamaño de la región amplificada ahora se redujo a 370 pb, tamaño que se amplificó sin problemas en individuos enlatados. En este caso, y tras el análisis de la secuencia, se escogió la enzima *Hsp92II*. Esta enzima corta al menos una vez en las tres especies de importancia comercial analizadas: en este caso, para *A. opercularis* se esperaba encontrar dos fragmentos de 279 y 87 pb, en *M. varia* tres fragmentos de 149, 146 y 88 pb, y en *P. maximus* dos fragmentos de 227 y 142 pb. Tras la comprobación de estos patrones en individuos no procesados, se llevó a cabo la amplificación y digestión de 41 individuos en conserva procedentes de 9 casas comerciales diferentes, lo que permitió identificar a *A. opercularis* y *P. maximus* como las especies enlatadas (Figura 3).

El tercero de los estudios emplea AFLPs para la identificación de *Patinopecten yessoensis*, *A. irradians*, *C. nobilis* y *C. farreri* (Chen *et al.* 2005). Si bien en un principio los AFLPs fueron empleados para el análisis de la diversidad genética de estos cuatro pectínidos, de los más de 510 marcadores AFLP encontrados, 21 permiten distinguir las cuatro especies analizadas.

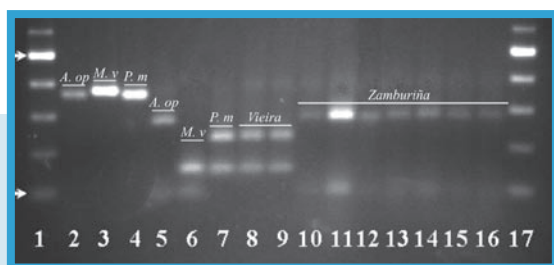


FIGURA 3.

Análisis electroforético (agarosa al 2%) mostrando los patrones de restricción de la región ITS2

obtenidos con la enzima *Hsp92II* en las especies *A. opercularis*, *M. varia* y *P. maximus* (carriles 5-7), así como en muestras enlatadas (carriles 8-16). Carriles 2-4: producto de PCR sin digerir; carriles 1 y 17: marcador de peso molecular de 100 pb. Las flechas indican 100 y 500 pb.



3.4. Las almejas

Las almejas se encuadran dentro de la familia Veneridae, que engloba a un total de 50 géneros de los cuales apenas cinco tienen importancia comercial. Poseen una amplia distribución geográfica encontrándose ejemplares de esta familia en las costas del Pacífico este y en las costas del Atlántico. Las principales especies sometidas a explotación comercial son: *Venerupis pullastra*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* y *V. rhomboideus*. La producción acuícola de estas especies se ha incrementado en los últimos años. Este hecho tiene particular importancia en el mercado español ya que junto con el portugués forman los principales productores de este grupo de moluscos bivalvos.

Los estudios genéticos que tienen como protagonistas a las almejas son prácticamente inexistentes y los relacionados con la identificación de las distintas especies se restringen exclusivamente a los desarrollados por el grupo de Fernández *et al.* Los motivos de esta exclusividad pueden estar relacionados con la menor plasticidad morfológica de este grupo de bivalvos, con la existencia de caracteres morfológicos que permiten la distinción de una manera inequívoca de las distintas especies de almejas y con que comercialmente son menos importantes que otros grupos de bivalvos como los mejillones.

El primer trabajo desarrollado para la diferenciación de las tres principales especies de almejas comerciales, *R. decussatus*, *V. pullastra* y *R. philippinarum*, fue el desarrollado por Fernández *et al.* (2000). Mediante el análisis de la secuencia de la α -actina y la construcción de un mapa de restricción los autores observaron la presencia de sitios polimórficos especie-específicos. El análisis electroforético de los productos de amplificación digeridos con *MaeIII* y *RsaI* produjo patrones especie-específicos que permitieron la identificación genética de las tres especies de almejas. En 2001, los mismos autores mediante el análisis de los sitios de restricción del espaciador transcrito interno ITS consiguieron la diferenciación de las tres especies de almejas. La amplificación mediante PCR de cebadores basados en las secuencias de ITS de *Mytilus* produjo un fragmento de 1195 bp en *R. decussatus*, 1074 bp en *V. pullastra* y 1188 bp en *R. philippinarum*. La digestión de los productos de PCR con



las endonucleasas *Hinf*I y *Rsa*I seguido por electroforesis de los productos digeridos mostró un perfil de restricción específico que permitió la discriminación de las especies analizadas. En 2002a, mediante el análisis RFLPs de una región del ADN mitocondrial 16S consiguieron diferenciar entre cuatro especies comerciales, *R. decussatus*, *V. pullastra*, *R. philippinarum* y *V. rhomboideus*. Mediante la amplificación de una región del ADNr 16S y su posterior digestión con las enzimas *Bsm*AI y *Bsr*I se identificaron patrones de restricción característicos de cada especie permitiendo su discriminación de manera inequívoca. Posteriormente, (2002b) el mismo grupo de trabajo diseñó un protocolo para la diferenciación de las especies *R. decussatus* y *V. pullastra* mediante la técnica de PCR-SSCP de α -actina.

3.5. Los berberechos

Los berberechos pertenecen a la familia Cardiidae. De los 19 géneros que componen esta familia, solamente uno de ellos, el género *Cerastoderma* presenta una importancia comercial relevante. Dentro de este género existen dos especies: *C. edule* es la especie más abundante y la explotada principalmente. Su distribución va desde el mar de Barents hasta las costas de Senegal. Su presencia es prácticamente nula en el Mediterráneo y mares adyacentes, donde aparece la otra especie, *C. glaucum*. Esta especie también aparece en el mar Báltico donde desplaza a *C. edule* (Brock 1991). En España el berberecho se explota fundamentalmente en las costas gallegas, donde existen numerosos bancos naturales.

Los primeros estudios encaminados a la diferenciación de estas dos especies emplearon alozimas (Jelnes *et al.* 1971; Brock 1978; Hummel *et al.* 1994; Machado y Costa 1994). Estos estudios contribuyeron a encontrar algunos sistemas enzimáticos que permitían la diferenciación de las dos especies. Estos son: la malato deshidrogenasa, *Mdh*, la *Lap*, las esterasas y las isocitrato deshidrogenasa 1 y 2, *Idh*1 e *Idh*2. De todos ellos, la *Mdh* y las *Idh*1 e *Idh*2 pueden considerarse como *loci* diagnóstico para la diferenciación. Además de los ensayos enzimáticos, se han llevado a cabo estudios de inmunoelectroforesis (Brock 1987) que también han permitido encontrar reacciones antígeno-anticuerpo especie-específicas.



Existen también marcadores de ADN para la diferenciación de ambas especies. Así, Brock y Christiansen (1989) desarrollaron un marcador basándose en la digestión con la enzima *Bgl*II de la molécula de ADN mitocondrial. No obstante, este marcador requiere del aislamiento del ADN mitocondrial y por tanto partir de una cantidad considerable de tejido. André *et al.* (1999) emplearon con éxito la técnica RAPD para diferenciar larvas de ambos berberechos.

Los métodos hasta ahora descritos presentan algunas limitaciones a la hora de ser aplicados en muestras procesadas como los ejemplares en conserva. Por esta razón, Freire *et al.* (2005) desarrollaron un marcador PCR-RFLP basado en la digestión del ADNr 5S con las enzimas de restricción *Eco*RV y *Hae*III. Para ello se emplearon cebadores para amplificar la unidad de repetición del ADNr 5S, compuesta por el gen para el ARNr 5S y un espaciador no transcrito (NTS). La amplificación produjo en las dos especies un fragmento de unas 550 pb, un tamaño que puede ser amplificado en individuos en los que el ADN ha sufrido degradación como es el caso de los ejemplares enlatados, tal y como se ha podido comprobar en el laboratorio. La digestión de este fragmento con las enzimas de restricción antes citadas produjo en los 175 individuos analizados (75 de *C. edule* y 100 de *C. glaucum*) patrones especie-específicos (Figura 4): la digestión con *Eco*RV mostró en *C. edule* un patrón de dos bandas de 370 y 165 pb, mientras que en *C. glaucum* esta enzima no presentó diana de reconocimiento con lo que no se produjo digestión; por su parte, la digestión con *Hae*III dio lugar a dos bandas de aproximadamente 200 y 150 pb en *C. edule*, y de 280 y 170 pb en *C. glaucum*. Así, la amplificación del ADNr 5S y posterior digestión con las dos enzimas de restricción permitió la inequívoca identificación de *C. edule* y *C. glaucum*.

3.6. Las navajas

Las navajas representan un grupo de moluscos bivalvos que abarcan principalmente dos géneros, el género *Ensis* y el género *Solen*. Las especies pertenecientes al género *Ensis* poseen una distribución antitropical con la mayoría de sus especies colonizando aguas del Pacífico y del Atlántico, mientras que las incluidas en el género *Solen* tienen su principal área de distribución en la región IndoPacífica con

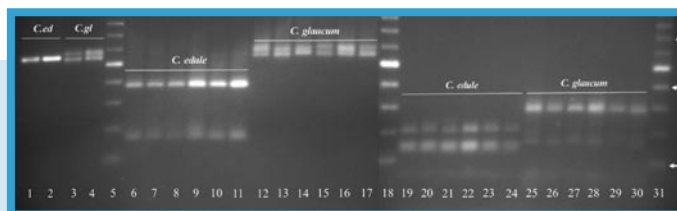


FIGURA 4.
Análisis electroforético
(agarosa al 2%)
mostrando los patrones

de restricción del ADNr 5S obtenidos con las enzimas *EcoRV* (carriles 6-17) y *HaeIII* (carriles 19-30). Carriles 1-4: producto de PCR sin digerir; carriles 5, 18 y 31: marcador de peso molecular de 100 pb. Las flechas indican 100, 400 y 700 pb.

muy pocas especies en las costas europeas y americanas. Las navajas han visto incrementado enormemente su volumen de explotación en los últimos años, alcanzado sus importaciones y exportaciones valores importantes dentro del mercado europeo. Las principales especies comercializadas son *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *Solen marginatus*, todas ellas nativas del continente europeo, y *E. directus*, una especie introducida desde el continente norteamericano. La morfología de sus valvas y su anatomía interna es muy similar siendo muy difícil diferenciar las distintas especies en base, únicamente, a caracteres morfológicos como las inserciones musculares o la curvatura de las valvas. Esta diferenciación se complica aún más en ejemplares en conserva donde únicamente se encuentran los tejidos blandos. Recientemente, en el mercado de importaciones internacional empieza a ser relevante otra especie procedente de las costas sudamericanas, la navaja chilena *E. macha*. Al igual que el resto de miembros del género *Ensis* la morfología de su valva es muy similar al resto de navajas lo que complica aún más su distinción. Por este motivo y para evitar el fraude comercial tanto en las exportaciones e importaciones como en el etiquetado, se han planteado dos estrategias basadas en la búsqueda de marcadores moleculares especie-específicos para garantizar la trazabilidad de las distintas especies de navajas.

El primer método se ha desarrollado a partir de los datos obtenidos por Fernández-Tajes (2006) en su tesis doctoral tras la amplificación de la región ribosomal ADNr 5S y su posterior secuenciación, tanto de la región codificante como de la región no transcrita. El análisis de esta región mostró polimorfismo de longitud entre las especies



del género *Ensis* (420 pb) y *S. marginatus* (530 pb) permitiendo su diferenciación en un gel de agarosa. El estudio de la secuencia de la región no transcrita mostró una elevada similitud entre *E. arcuatus* y *E. siliqua* y una alta divergencia entre éstas y el resto de especies del género *Ensis*. Esta diferencia a nivel de secuencia hizo posible la búsqueda de sitios de restricción especie-específicos para la discriminación de las cuatro especies (Tabla 2). La digestión con la enzima *HaeIII* produjo patrones específicos para las especies *E. arcuatus* y *E. directus* (Tabla 2) permaneciendo *E. siliqua* y *E. macha* sin identificar correctamente (Figura 5).

TABLA 2.
Fragmentos de restricción (en pb) obtenidos después de la digestión de los productos de la amplificación del ADNr 5S de *E. arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, y *E. macha* con las enzimas *HaeIII*, and *AcsI*

Especies de navajas	Longitud del ADNr 5S	<i>HaeIII</i>		<i>AcsI</i>		Patrón
		Tamaño de fragmento	Tipo	Tamaño de fragmento	Tipo	
<i>E. arcuatus</i>	422	26, 125, 271	A	x	A	AA
<i>E. siliqua</i>	423	24, 398	B	x	A	BA
<i>E. directus</i>	443	24, 205, 214	C	x	A	CA
<i>E. macha</i>	434	24, 410	B	24, 140, 270	B	BB

El tamaño de los fragmentos son determinados por secuenciación; x: no produce fragmentos de restricción.

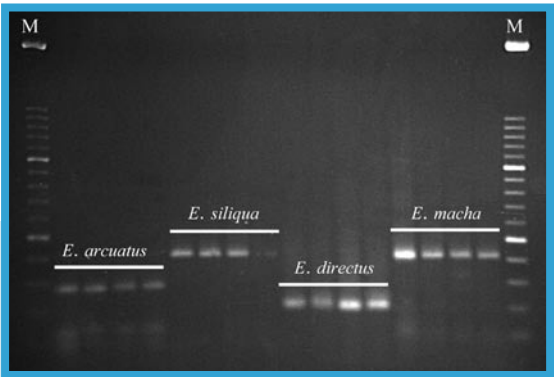


FIGURA 5.
Análisis electroforético (agarosa al 1.5%) mostrando los patrones de restricción del ADNr 5S obtenidos con la enzima *HaeIII* en las especies de navajas *E. arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus* y *E. macha*. M: marcador de peso molecular de 100 pb.



La posterior digestión con la endonucleasa *AcsI* hizo posible distinguir *E. macha* de *E. siliqua* (Figura 6). De esta manera la aplicación de manera secuencial de estas dos enzimas discrimina claramente las cuatro especies de navajas del género *Ensis*.

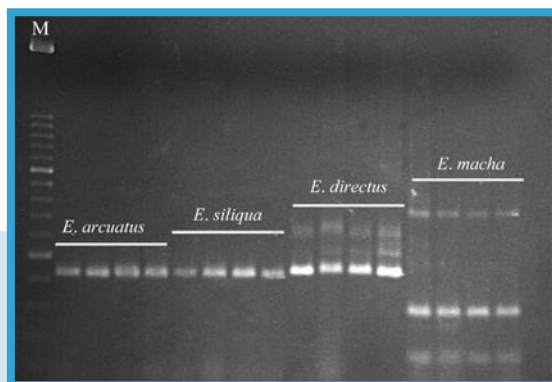


FIGURA 6.

Análisis electroforético (agarosa al 1.5%) mostrando los patrones de restricción del ADNr 5S obtenidos

con la enzima *AcsI* en las especies de navajas *E. arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus* y *E. macha*. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

El segundo método consiste en la diferenciación de las especies *E. arcuatus* y *E. siliqua* a partir del análisis de RFLPs generados de la región ribosomal ITS1. Fernández-Tajes *et al.* (2006, en revisión) publicaron la secuencia completa del ITS1 e ITS2. El mapa de restricción generado utilizando estas secuencias produjo varias dianas especie-específicas.

Ambos métodos fueron comprobados en individuos frescos y conservados en lata y constituyen un método rápido, eficaz y efectivo para la identificación de las distintas especies comerciales de navajas. Además pueden ser estandarizados para su aplicación en laboratorios de control de fraude alimentario.

Como resumen, en la Tabla 3, se muestra la información recopilada de los principales estudios encaminados a la diferenciación de especies de moluscos bivalvos comerciales.



TABLA 3.

Resumen de los principales marcadores moleculares para la identificación de bivalvos comerciales

Especie	Región ADN	Técnica	Referencias
Mejillones			
<i>M. galloprovincialis</i> vs <i>M. edulis</i> vs <i>M. trossulus</i>	Alozymas		Skibinski y Beardmore 1979; Skibinski <i>et al.</i> 1983; McDonald y Koehn 1988
	ppp	PCR	Inoue <i>et al.</i> 1995 Santaclara <i>et al.</i> 2006
<i>M. galloprovincialis</i> / <i>M. chilensis</i> vs <i>M. edulis</i> vs <i>M. trossulus</i>	Glu-5'	PCR	Rawson <i>et al.</i> 1996 ; Toro 1998a
<i>M. edulis</i> vs <i>M. trossulus</i>	Glu-3'	PCR	Rawson <i>et al.</i> 1996
<i>M. trossulus</i> vs <i>M. galloprovincialis</i> / <i>M. chilensis</i> / <i>M. edulis</i>	COIII ITS	PCR	Toro 1998a
<i>M. chilensis</i> vs <i>Chromytilus chorus</i> vs <i>Aulacomya ater</i> vs <i>Perumytilus purpuratus</i>	Glu-5' ITS	PCR-RFLP	Toro 1998b
<i>M. galloprovincialis</i> y <i>Perna canaliculus</i>	ADN anónimo	SCAR	Rego <i>et al.</i> 2002
<i>Mytilus</i> vs <i>Perna</i> vs <i>Chromytilus</i> vs <i>Aulacomya</i> vs <i>Brachidontes</i> vs <i>Perumytilus</i> vs <i>Semimytilus</i>	ADNr 18S	FINS PCR-RFLP	Santaclara <i>et al.</i> 2006
<i>Perna</i> vs <i>Chromytilus</i>	ITS1	PCR-Multiplex PCR-RFLP	Santaclara <i>et al.</i> 2006
<i>M. galloprovincialis</i> vs <i>M. chilensis</i>	ppp	PCR-RFLP	Santaclara <i>et al.</i> 2006
Ostras			
<i>Crassostrea gigas</i> vs <i>C. sikamea</i>	ADNr 16S	PCR y Secuenciación	Banks <i>et al.</i> 1993
<i>C. gigas</i> vs <i>C. virginica</i> vs <i>C. ariakensis</i>	ADNr 16S	PCR-RFLP	Ó Foighil <i>et al.</i> 1995
<i>C. gigas</i> vs <i>C. angulata</i>	COI	PCR-RFLP	Boudry <i>et al.</i> 1998
	Microsatélites	PCR-RFLP	Huvet <i>et al.</i> 2004
<i>Saccostrea glomerata</i> vs <i>S. manilai</i>	Alozymas		Day <i>et al.</i> 2000
<i>C. belcheri</i> vs <i>C. iredalei</i> vs <i>S. cucullata</i>	ADN anónimo	RAPD	Klinbunga <i>et al.</i> 2001
	ADNr 18S COI	PCR-RFLP	Klinbunga <i>et al.</i> 2003
	ADNr 16S	PCR-RFLP	Klinbunga <i>et al.</i> 2005
<i>Ostreola stentina</i> vs <i>Ostrea edulis</i>	ADNr 16S	PCR-RFLP	Lapegue <i>et al.</i> 2006
<i>C. angulata</i> / <i>C. gigas</i> vs <i>O. edulis</i> vs <i>O. stentina</i>	ADNr 5S	PCR-Multiplex	Cross <i>et al.</i> 2006
<i>C. gigas</i> vs <i>C. brasiliana</i> / <i>C. rizophorae</i>	ADNr 16S	PCR-RFLP	Pie <i>et al.</i> 2006
<i>Pinctada imbricata</i> vs <i>P. martensii</i> vs <i>P. fucata</i>	IGS ADNr 16S	PCR PCR-RFLP	Masoaka y Kobayashi 2005
Pectínidos			
<i>Pecten maximus</i> vs <i>Mimachlamys varia</i> vs <i>Aequipecten opercularis</i> vs <i>Hinnites distortus</i>	Alozymas		Beaumont 1991

(Continúa)



(Continuación)

Especie	Región ADN	Técnica	Referencias
	ITS	PCR-RFLP	López-Piñón <i>et al.</i> 2002
<i>Placopecten magellanicus</i> vs <i>Chlamys islandica</i>	Alozimas ADNr 18S	PCR-RFLP	Kenchington <i>et al.</i> 1993
<i>Patinopecten yessoensis</i> vs <i>Argopecten irradians</i> vs <i>C. nobilis</i> vs <i>C. farreri</i>	ADN anónimo	AFLP	Chen <i>et al.</i> 2005
Almejas			
<i>Ruditapes decussatus</i> vs <i>Venerupis pullastra</i> vs <i>R. philippinarum</i>	α -actina	PCR-RFLP	Fernández <i>et al.</i> 2000
	ITS	PCR-RFLP	Fernández <i>et al.</i> 2001
<i>R. decussatus</i> vs <i>V. pullastra</i> vs <i>R. philippinarum</i> vs <i>V. rhomboideus</i>	ADNr 16S	PCR-RFLP	Fernández <i>et al.</i> 2002a
<i>R. decussatus</i> vs <i>V. pullastra</i>	α -actina	PCR-SSCP	Fernández <i>et al.</i> 2002b
<i>Berberchos</i>			
<i>Cerastodema edule</i> vs <i>C. glaucum</i>	Alozimas		Jelnes <i>et al.</i> 1971; Brock 1978; Hummel <i>et al.</i> 1994; Machado y Costa 1994
	ADN mitocondrial	RFLP	Brock y Christiansen 1989
	ADN anónimo	RAPD	André <i>et al.</i> 1999
	ADNr 5S	PCR-RFLP	Freire <i>et al.</i> 2005
Navajas			
<i>Ensis arcuatus</i> vs <i>E. siliqua</i> vs <i>E. directus</i> vs <i>E. macha</i> vs <i>Solem marginatus</i>	ADN 5S	PCR-RFLP	Fernández-Tajes 2006
<i>E. arcuatus</i> vs <i>E. siliqua</i> vs <i>E. directus</i> vs <i>E. macha</i>	ITS	PCR-RFLP	Fernández-Tajes <i>et al.</i> 2006

BIBLIOGRAFÍA

- ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, *et al.*, 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* **25**: 3389-3402.
- ANDRÉ, C., M. LINDEGARTH, P. R. JONSSON y P. SUNDBERG, 1999 Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **79**: 563-565.
- ANSIOSO, L., I. GONZÁLEZ, A. FERNÁNDEZ, M. A. RODRÍGUEZ, P. E. HERNÁNDEZ, *et al.*, 2001 PCR-SSCP: a simple method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 1720-1723.



- BALASARAVANAN, T., P. CHEZHIAN, R. KAMALAKANNAN, R. YASODHA, M. VARGHESE, *et al.*, 2006 Identification of species-diagnostic ISSR markers for six *Eucalyptus* species. *Silvae Genetica* **55**: 119-122.
- BANKS, M. A., D. HEDGECOCK y C. WATERS, 1993 Discrimination between closely related pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**: 129-136.
- BARTLETT, S. E., y W. S. DAVIDSON, 1992 FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques* **13**: 408-411.
- BEAUMONT, A. R., 1991 Genetic distances between some scallop species, pp. 151-155 en *An International Compendium of Scallop Biology and Culture*, editado por S.E. Shumway y P.A. Sandifer. Baton Rouge, La, The World Aquaculture Society.
- BENDEZU, I. F., J. W. SLATER y B. F. CARNEY, 2005 Identification of *Mytilus* spp. and *Pecten maximus* in Irish waters by standard PCR of the 18S rDNA gene and multiplex PCR of the 16S rDNA gene. *Mar. Biotechnol.* **7**: 687-696.
- BORGO, R., C. SOUTY-GROSSET, D. BOUCHON y L. GOMOT, 1996 PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *J. Food. Sci.* **61**: 1-4.
- BOSSIER, P., 1999 Authentication of Seafood products by DNA patterns. *J. Food Sci.* **64**: 189-193.
- BOTSTEIN, D., R. L. WHITE, M. SKOLNICK y R. W. DAVIS, 1980 Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**: 314-331.
- BOUDRY P., S. HEURTEBISE, B. COLLET, F. CORNETTE y A. GERARD, 1998 Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **226**: 279-291.
- BROCK, V., 1978 Morphological and biochemical criteria for the separation of *Cardium glaucum* (Bruguière) from *C. edule* (L.). *Ophelia* **17**: 207-214.
- BROCK, V., 1987 Genetic relations between the bivalves *Cardium* (*Cerastoderma*) *edule*, *C. lamarcki* and *C. glaucum* studied by means of crossed immunoelectrophoresis. *Mar. Biol.* **93**: 493-498.
- BROCK, V., 1991 *An interdisciplinary study of evolution in the cockles Cardium (Cerastoderma) edule, C. glaucum, and C. lamarcki*. Vestjydsck Forlag, Vinderup.
- BROCK, V., y G. Christiansen, 1989 Evolution of *Cardium* (*Cerastoderma*) *edule*, *C. lamarcki* and *C. glaucum*: studies of DNA-variation. *Mar. Biol.* **102**: 505-511.



- BUROKER, N. E., 1982 Allozyme variation in three nonsibling *Ostrea* species. J. Shellfish Res. **2**: 157-163.
- CARRERA, E., T. GARCÍA, A. CÉSPEDES, I. GONZÁLEZ, A. FERNÁNDEZ, *et al.*, 1999 Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identify authentication. J. Food Sci. **64**: 410-413.
- CARRERA, E., T. GARCÍA, A. CÉSPEDES, I. GONZÁLEZ, A. FERNÁNDEZ, *et al.*, 2000 Differentiation of smoked *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* and *Brama raii* using the nuclear marker 5S rDNA. Int. J. Food Sci. Technol. **35**: 401-406.
- CERDA, H., y G. KOPPEN, 1998 DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung **207**: 22-25.
- CÉSPEDES, A., T. GARCÍA, E. CARRERA, I. GONZÁLEZ, B. SANZ, *et al.*, 1998 Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the cytochrome b gene. J. Food Sci. **63**: 206-209.
- CHAPELA, M. J., C. G. SOTELO y R. I. PÉREZ-MARTÍN, 2003 Molecular identification of cephalopod species by FINS and PCR-RFLP of a cytochrome b gene fragment. Eur. Food Res. Technol. **217**: 524-529.
- CHEN, L. S., C. CHU, C. D. LIU, R. S. CHEN y J. G. TSAY, 2006 PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C-truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. J. Phytopathol. **154**: 654-662.
- CHEN, S. P., Z. M. BAO, J. PAN y J. J. HU, 2005 Genetic diversity and specific markers in four scallop species, *Patinopecten yessoensis*, *Argopecten irradians*, *Chlamys nobilis* and *C. farreri*. Acta Oceanol. Sin. **24**: 107-113.
- CHIKUNI, K., K. OZUTSUMI, T. KOISHIKAWA y S. KATO, 1990 Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. Meat Sci. **27**: 119-128.
- CONNELL, L., 2002 Rapid identification of marine algae (Raphidophyceae) using three-primer PCR amplification of nuclear internal transcribed spacer (ITS) regions from fresh and archived material. Phycologia **41**: 15-21.
- CROSS, I., L. REBORDINOS y E. DIAZ, 2006 Species identification of Crassostrea and Ostrea oysters by polymerase chain reaction amplification of the 5S rRNA gene. Journal of AOAC International **89**: 144-148.
- DAS, M., S. BHATTACHARYA y A. PAL, 2005 Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: a strategy of species-specific marker development in Bamboo. Ann. Bot-London **95**: 835-841.
- Day, A. J., A. J. S. Hawkins, y P. Visootviseth, 2000 The use of allozymes and shell morphology to distinguish among sympatric species of the rock oyster Saccostrea in Thailand. Aquaculture **187**: 51-72.



- DUSINSKY, R., M. KÚDELA, V. STLOUKALOVÁ y L. JEDLIKA, 2006 Use of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for discrimination between and within species of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Biologia* **61**: 299-304.
- FAJARDO, V., I. GONZÁLEZ, I. LÓPEZ-CALLEJA, I. MARTÍN, P. E. HERNÁNDEZ, *et al.*, 2006 PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), Roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *J. Agric. Food Chem.* **54**: 1144-1150.
- FERNÁNDEZ, A., T. GARCÍA, L. ASENSIO, M. A. RODRÍGUEZ, I. GONZÁLEZ, *et al.*, 2000 Identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell), *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell), and *Ruditapes philippinarum* (Japanese carpet shell) by PCR-RFLP. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3336-3341.
- FERNÁNDEZ, A., T. GARCÍA, L. ASENSIO, M. A. RODRÍGUEZ, I. GONZÁLEZ, *et al.*, 2001 PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species. *J. Food Sci.* **66**: 657-661.
- FERNÁNDEZ, A., T. GARCÍA, L. ASENSIO, M. A. RODRÍGUEZ, I. GONZÁLEZ, *et al.*, 2002a Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment for authentication of four clam species. *J. Food Protect.* **65**: 692-695.
- FERNÁNDEZ, A., T. GARCÍA, L. ASENSIO, M. A. RODRÍGUEZ, I. GONZÁLEZ, *et al.*, 2002b Genetic differentiation between the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell) and *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell) by PCR-SSCP analysis. *J. Sci. Food Agr.* **82**: 881-885.
- FERNÁNDEZ-TAJES, J., A. MARTÍNEZ-LAGE, R. FREIRE, J. MÉNDEZ, A. GUERRA, *et al.*, 2006 Karyology of the razor clams *Ensis arcuatus* and *E. Siliqua*, and molecular characterization and mapping of major ribosomal rRNA genes. *Biol. J. Linn. Soc.* (en revisión).
- FERNÁNDEZ-TAJES, J., 2006 *Cytogenetics and molecular analysis of nuclear genes and anonymous regions: assessment of different razor clam populations*. Tesis Doctoral. Universidade da Coruña.
- FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ y R. VRIJENHOEK, 1994 DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**: 294-299.
- FREIRE, R., A. INSUA y J. MÉNDEZ, 2005 *Cerastoderma glaucum* 5S rDNA: characterization of the repeat unit, divergence with respect to *Cerastoderma edule*, and PCR-RFLPs for the identification of both cockles. *Genome* **48**: 427-442.
- FRISCHER, M. E., J. M. DANFORTH, L. C. TYNER, J. R. LEVERONE, D. C. MARELLI, *et al.*, 2000 Development of an *Argopecten*-specific 18S rRNA targeted genetic probe. *Mar. Biotechnol.* **2**: 11-20.



- GAFFNEY, P. M., y S. K. ALLEN, 1993 Hybridization among *Crassostrea* species. A Review. *Aquaculture* **116**: 1-3.
- GARCÍA-VÁZQUEZ, E., P. ÁLVAREZ, P. LOPES, N. KARAIKOU, J. PÉREZ, *et al.*, 2006 PCR-SSCP of the 16S rRNA gene, a simple methodology for species identification of fish eggs and larvae. *Sci. Mar.* **70****52**: 13-21.
- GLENN, T. C., y N. A. SCHABLE, 2005 Isolating microsatellite DNA *loci*, pp. 202-222 en *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B* editado por E.A. Zimmer y E. Roalson. Academic Press, San Diego, USA.
- GOSLING, E. M., 1992 Systematics and geographic distribution of *Mytilus*, pp. 1-20 en *The mussel Mytilus*, editado por Gosling, E.M. Elsevier Press, Amsterdam.
- GUHA, S., S. P. GOYAL y V. K. KASHYAP, 2006 Genomic variation in the mitochondrially encoded cytochrome b (MT-CYB) and 16S rRNA (MT-RNR2) genes: characterization of eight endangered Pecoran species. *Anim. Genet.* **37**: 262-265.
- HILBISH, T. J., A. MULLINAX, S. I. DOLVEN, A. MEYER, R. K. KOEHN, *et al.*, 2000 Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. *Mar. Biol.* **136**: 69-77.
- HUMMEL, H., M. WOLOWICZ, y R. H. BOGAARDS, 1994 Genetic variability and relationships for populations of *Cerastoderma edule* and of the *C. glaucum* complex. *Netherlands J. Sea Res.* **33**: 81-89.
- HUVET, A., A. GERARD, C. LEDU, P. PHELIPOU, S. HEURTEBISE, *et al.*, 2002 Is fertility of hybrids enough to conclude that the two oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species?. *Aquat. Living Resour.* **15**: 45-52.
- HUVET, A., C. FABIoux, H. McCOMBIE, S. LAPEGUE, y P. BOUDRY, 2004 Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **272**: 141-152.
- IJIMA, K., K. SUZUKI, K. OZAKI, H. KURIYAMA, Y. KITAGAWA, *et al.*, 2006 DNA analysis for identification of food-associated foreign substances. *J. Food Quality* **29**: 531-542.
- INOUE, K., J. H. WAITE, M. MATSUOKA, S. ODO y S. HARAYAMA, 1995 Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus*. *Biol. Bull.* **189**: 370-375.
- JELNES, J. E., G. HOPNER PETERSEN y P. J. C. RUSSEL, 1971 Isoenzyme taxonomy applied on four species of *Cardium* from Danish and British waters with a short description of the distribution of the species (Bivalvia). *Ophelia* **9**: 15-19.



- KENCHINGTON, E., K. S. NAIDU, D. L. RODDICK, D. I. COOK, y E. ZOUROS, 1993 Use of biochemical genetic markers to discriminate between adductor muscles of the Sea Scallop (*Placopecten magellanicus*) and the Iceland Scallop (*Chlamys islandica*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. **50**: 1222-1228.
- KENGLUECHA, A., P. RONGNOPARUT, S. BOONSUEPSAKUL, R. SITHIPRASASNA, P. RODPRADIT y V. BAIMAI, 2006 Geographical distribution of *Anopheles minimus* species A and C in western Thailand. J. Vector Ecol. **30**: 225-230.
- KIM, M. S., N. B. KLOPFENSTEIN, J. W. HANNA y G. I. McDONALD, 2006 Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. Forest Pathol. **36**: 145-164.
- KLINBUNGA, S., P. AMPAYUP, A. TASSANAKAJON, P. JARAYABHAND, y W. YOOSUKH, 2001 Genetic diversity and molecular markers of cupped oysters (genera *Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand revealed by randomly amplified polymorphic DNA analysis. Mar. Biotechnol. **3**: 133-144.
- KLINBUNGA, S., N. KHAMNAMTONG, A. TASSANAKAJON, N. PUANGLARP, P. JARAYABHAND, et al., 2003 Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. Mar. Biotechnol. **5**: 27-36.
- KLINBUNGA, S., B. KHAMNAMTONG, N. PUANGLARP, P. JARAYABHAND, W. YOOSUKH, et al., 2005 Molecular taxonomy of cupped oysters (*Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand based on COI, 16S, and 18S rDNA polymorphism. Mar. Biotechnol. **7**: 306-317.
- LAPEGUE, S., I. BEN SALAH, F. M. BATISTA, S. HEURTEBISE, L. NEIFAR y P. BOUDRY, 2006. Phylogeographic study of the dwarf oyster, *Ostreola stentina*, from Morocco, Portugal and Tunisia: evidence of a geographic disjunction with the closely related taxa, *Ostrea aoupouria* and *Ostreola equestris*. Mar. Biol. **150**: 103-110.
- LEITAO, A., P. BOUDRY, J. P. LABAT y C. THIRIOT-QUIEVREUX, 1999 Comparative karyological study of cupped oyster species: Malacologia **41**: 175-186.
- LIVI, S., C. CORDISCO, C. DAMIANI, M. ROMANELLI y D. CROSETTI, 2006 Identification of bivalve species at an early developmental stage through PCR-SSCP and sequence analysis of partial 18S rDNA. Mar. Biol. **149**: 1149-1161.
- LO, C. F., Y. R. LIN, H. C. CHANG y J. H. LIN, 2006 Identification of turtle shell and its preparations by PCR-DNA sequencing. J. Food Drug Anal. **14**: 153-158.
- LÓPEZ-FLORES, I., R. DE LA HERRÁN, M. A. GARRIDO-RAMOS, P. BOUDRY, C. RUIZ-REJÓN, et al., 2004 The molecular phylogeny of oysters based on a satellite DNA related to transposons. Gene **339**: 181-188.
- LÓPEZ-PINÓN, M. J., A. INSUA y J. MÉNDEZ, 2002 Identification of four scallop species using PCR and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region. Mar. Biotechnol. **4**: 495-502.



- MACHADO, M. M., y A. M. COSTA, 1994 Enzymatic and morphological criteria for distinguishing between *Cardium edule* and *C. glaucum* of the Portuguese coast. *Mar. Biol.* **120**: 535-544.
- MALDINI, M., F. N. MARZANO, G. GONZÁLEZ FORTES, R. PAPA y G. GANDOLFI, 2006 Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture* **261**: 487-494.
- MALTAGLIATI, F., T. LAI, M. CASU, S. VALDESALICI y A. CASTELLI, 2006 Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochem. System Ecol.* **34**: 626-634.
- MARTÍN, I., T. GARCÍA, V. FAJARDO, I. LÓPEZ-CALLEJA, P. E. HERNÁNDEZ, *et al.*, 2007 Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Sci.* **75**: 120-127.
- MARTÍNEZ, I., e I. M. YMAN, 1998 Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Res. Int.* **31**: 459-466.
- MARTÍNEZ, I., y A. K. DANIELSDÓTTIR, 2000 Identification of marine mammal species in food products. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 527-533.
- MASAOKA, T., y T. KOBAYASHI, 2005 Species identification of *Pinctada imbricata* using intergenic spacer of nuclear ribosomal RNA genes and mitochondrial 16S ribosomal RNA gene regions. *Fish. Sci.* **71**: 837-846.
- MCDONALD, J. H., y R. K. KOEHN, 1988 The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Mar. Biol.* **99**: 111-118.
- MORGAN, T. S., y A. D. ROGERS, 2001 Specificity and sensitivity of microsatellite markers for the identification of larvae. *Mar. Biol.* **139**: 967-973.
- NEUBAUER, C., y M. HESS, 2006 Detection and identification of food-borne pathogens of the genera *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter* by multiplex PCR in poultry and poultry products. *J. Vet. Med. B* **53**: 376-381.
- O' FOIGHIL, D., P. N. GAFFNEY y T. J. HILBISH, 1995 Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American (*Crassostrea virginica* (Gmelin)) and Asian (*C. gigas* (Thunberg) *C. ariakensis* (Wakiya)) oyster species. *Journal of Experimental Mar. Biol. Ecol.* **192**: 211-220.
- OLIVE, D. M., y P. BEAN, 1999 Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1661-1669.
- ORTÍ, G., M. P. HARE y J. C. AVISE, 1997 Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Mol. Ecol.* **6**: 575-580.
- PARAN, I., y R. W. MICHELMORE, 1993 Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 985-993.



- PAUGAM, A., M. LE PENNEC y A. F. GENEVIEVE, 2000 Immunological recognition of marine bivalve larvae from plankton samples. *J. Shellfish Res.* **19**: 325-331.
- PAUGAM, A., M. LE PENNEC, A. MARHIC y G. ANDRE-FONTAINE, 2003 Immunological in situ determination of *Pecten maximus* larvae and their temporal distribution. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* **83**: 1083-1093.
- PEÑA, J. B., C. RIOS, S. PEÑA y J. CANALES, 1998 Ultrastructural morphogenesis of pectinid spat from the western Mediterranean: a way to differentiate seven genera. *J. Shellfish Res.* **17**: 123-130.
- PÉREZ, J., y E. GARCÍA-VÁZQUEZ, 2004 Genetic identification of nine hake species for detection of commercial fraud. *J. Food Protect.* **67**: 2792-2796.
- PÉREZ, M., J. M. VIEITES y P. PRESA, 2005 ITS1-rDNA based methodology to identify world-wide hake species of the genus *Merluccius*. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 5239-5247.
- PIE, M. R., R. O. RIBEIRO, W. A. BOEGER, A. OSTRENSKY, R. M. FALLEIROS, *et al.*, 2006. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliensis*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. *Aquac. Res.* **37**: 1598-1600.
- QUINTERO, J., C. G. SOTELO, H. REHBEIN, S. E. PRYDE, I. MEDINA, R. I. PÉREZ-MARTÍN, *et al.*, 1998 Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 1662-1669.
- QUINTERO, J., R. VIDAL, M. IZQUIERDO, C. G. SOTELO, M. J. CHAPELA, *et al.*, 2001 Identification of hake species (*Merluccius* Genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5108-5114.
- RAWSON, P. D., K. L. JOYNER, K. MEETZE, y T. J. HILBISH, 1996 Evidence for intragenic recombination within a novel genetic marker that distinguishes mussels in the *Mytilus edulis* species complex. *Heredity* **77**: 599-607.
- REGO, I., A. MARTÍNEZ, A., GONZÁLEZ-TIZÓN y J. MÉNDEZ, 2002 PCR technique for identification of mussel species. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1780-1784.
- REHBEIN, H., G. KRESS y T. SCHMIDT, 1997 Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *J. Sci. Food Agric.* **74**: 35-41.
- RODRÍGUEZ, M. A., T. GARCÍA, I. GONZÁLEZ, L. ASENSIO, A. FERNÁNDEZ, *et al.*, 2001 Identification of goose (*Anser anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*) foie gras by multiplex polymerase chain reaction amplification of the 5S rDNA gene. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 2717-2721.
- RODRÍGUEZ, M. A., T. GARCÍA, I. GONZÁLEZ, L. ASENSIO, B. MAYORAL, *et al.*, 2003 Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie gras



- by species-specific polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 1524-1529.
- RUSSELL, V. J., G. L. HOLD, S. E. PRYDE, H. REHBEIN, J. QUINTERO, *et al.*, 2000 Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between Salmon species. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 2184-2188.
- SANTACLARA, F. J., M. ESPÍNEIRA, G. CABADO, A. ALDASORO, N. GONZÁLEZ-LAVIN, *et al.*, 2006 Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 8461-8470.
- SEYOUM, S., T. M. BERT, A. WILBUR, W. S. ARNOLD, y C. CRAWFORD, 2003 Development, evaluation, and application of a mitochondrial DNA genetic tag for the bay scallop, *Argopecten irradians*. *J. Shellfish Res.* **22**: 111-117.
- SKIBINSKI, D. O. F., J. A. BEARDMORE y T. F. CROSS, 1983 Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae, Mollusca) in the British Isles. *Biol. J. Linn. Soc.* **19**: 137-183.
- SKIBINSKI, D. O. F., y J. A. BEARDMORE, 1979 Genetic study of intergradations between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Experientia* **35**: 1442-1444.
- SOTELO, C. G., P. CALO-MATA, M. J. CHAPELA, R. I. PÉREZ-MARTÍN, H. REHBEIN, *et al.*, 2001 Identification of flatfish (Pleuronectiforme) species using DNA-based techniques. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4562-4569.
- SUNNUCKS, P., A. C. C. WILSON, L. B. BEHEREGARAY, K. ZENGER, J. FRENCH, *et al.*, 2000 SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol. Ecol.* **9**: 1699-1710.
- TORO, J. E., 1998a PCR-based nuclear and mtDNA markers and shell morphology as an approach to study the taxonomic status of the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Bivalvia). *Aquat. Living Resour.* **11**: 347-353.
- TORO, J. E., 1998b Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: The potential use in studies involving planktonic surveys. *J. Shellfish Res.* **17**: 1203-1205.
- TROTTA, M., S. SCHÖNHUTH, T. PEPE, M. L. CORTESI, A. PUYET, *et al.*, 2005 Multiplex PCR method for use in real-time PCR for identification of fish fillets from grouper (*Epinephelus* and *Mycterperca* species) and common substitute species. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 2039-2045.
- UNSELD, M., B. BEYERMANN, P. BRANDT y R. HIESEL, 1995 Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Meth. Applic.* **4**: 241-243.



- VENCES, M., M. THOMAS, A. MEIJDEN, Y. CHIAR, y D. R. VIEITES, 2005 Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA bar-coding of amphibians. *Front. Zool.* **2**: 5.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, *et al.*, 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414.
- WAGNER, H. P., 1991 Review of the European pectinidae. *Vita Marina* **41**: 1-48.
- WAN, Q-H., H. WU, T. FUJIHARA y S-G. FANG, 2004 Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* **25**: 2165-2176.
- WATTIER, R. A., J. BEGUET, M. GAILLARD, J. C. MÜLLER, L. BOLLACHE, *et al.*, 2006 Molecular markers for systematic identification and population genetics of the invasive Ponto-Caspian freshwater gammarid *Dikerogammarus villosus* (Custacea, Amphipoda). *Mol. Ecol. Notes* **6**: 487-489.
- WELSH, J., y M. MCCLELLAND, 1990 Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.* **18**: 7213-7218.
- WHITE T. J, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J, INNIS *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Ed Academic Press. Inc. San Diego, California, 315-322.
- WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI y S. V. TINGEY, 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid. Res.* **18**: 6531-6535.
- WOOD, A. R., A. R. BEAUMONT, D. O. F. SKIBINSKI y G. TURNER, 2003 Analysis of a nuclear-DNA marker for species identification of adults and larvae in the *Mytilus edulis* complex. *J. Mollus. Stud.* **69**: 61-66.
- ZHANG, J., y Z. CAI, 2006 Differentiation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Atlantic salmon (*Salmo salar*) by the AFLP-derived SCAR. *Eur. Food Res. Technol.* **223**: 413-417.
- ZIETKIEWICZ, E., A. FAFALSKI y D. LABUDA, 1994 Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176-183.

4

FUNDAMENTOS DE LA MEJORA GENÉTICA EN ACUICULTURA

4

FUNDAMENTOS DE LA MEJORA GENÉTICA EN ACUICULTURA

C. López-Fanjul

Facultad de Biología. Universidad
Complutense de Madrid

M. A. Toro

Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

Resumen

En este capítulo se presenta, en primer lugar, la descripción genético-poblacional de los caracteres cuantitativos y de los procedimientos básicos de estimación de los parámetros que la definen (heredabilidad y correlación genética), con especial referencia a los atributos de interés económico que suelen tenerse en cuenta en los programas de mejora en acuicultura. En segundo lugar se estudian los principales efectos de la deriva genética sobre los caracteres cuantitativos (depresión consanguínea y erosión de la variación genética), en función de la magnitud del censo efectivo de la población considerada. En tercer lugar se analizan separadamente los factores que influyen sobre la respuesta a la selección artificial para un rasgo cuantitativo (intensidad, intervalo generacional y precisión del procedimiento seguido), para finalizar con una descripción de la acción conjunta de la selección y la deriva.



Abstract

This chapter includes descriptions of: 1) the «infinitesimal» model of quantitative genetics, as well as that of the basic estimation procedures of the parameters required (heritability and genetic correlation), with special reference to the economic traits usually considered in breeding programs in aquaculture; 2) the main consequences of the action of genetic drift on metric traits (inbreeding depression and erosion of the genetic variance) in relation to the magnitude of the effective size of the population considered; and 3) the prediction of the response to artificial selection in terms of the main factors involved (intensity, generation interval and precision of the selection procedure), followed by an analysis of the joint action of selection and drift on quantitative traits.

1. DESCRIPCIÓN GENÉTICA DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS

1.1. El modelo de la genética cuantitativa

La mayoría de los rasgos de interés económico de las plantas cultivadas y los animales domésticos, entre los que desde luego se incluyen peces y moluscos, son caracteres cuantitativos que muestran una variación hereditaria poblacional debida a la segregación de varios loci, no necesariamente muchos, cuya expresión puede ser modificada por acción del medio. Esta mediatización ambiental implica que la correspondencia entre fenotipo y genotipo no sea perfecta, de manera que dos individuos con genotipos idénticos pueden tener fenotipos distintos y, por otra parte, que la igualdad fenotípica no lleva forzosa-mente consigo la genética.

En general, el número de clases que se pueden establecer con respecto a la variación de un determinado carácter es arbitrario, puesto que depende de la unidad de medida utilizada. Por ejemplo, si las longitudes a los 150 días de los individuos de una población de trucha arco iris estuvieran comprendidas entre 5 y 14 cm, podríamos considerar diez clases (de cm en cm), cien clases (de mm en mm), etc. Por consiguiente, el intervalo de clase se fijará de manera que el



número de éstas sea suficiente para que podamos tratar la distribución mediante las técnicas estadísticas aplicables a variables continuas. En algunas ocasiones las clases vienen dadas naturalmente y, en el caso más extremo, su número se reduce a dos como ocurre, por ejemplo, con la resistencia a enfermedades (enfermo o sano).

La descripción de los caracteres cuantitativos suele hacerse siguiendo el llamado «modelo infinitesimal» propuesto por Fisher en 1918, que está basado en las técnicas de análisis de la varianza debidas igualmente a este autor. El modelo supone que la desviación del valor fenotípico (P) de un carácter en un individuo con respecto a la media de la población panmíctica de la que éste forma parte, es suma de dos componentes residuales, uno genético (G) y otro ambiental (E). Si cada uno de estos efectos se considera como la consecuencia final de la acción de un considerable número de factores independientes cuya influencia individual es suficientemente pequeña, ambos pueden tenerse por variables aleatorias normales $N(0, V_G)$ y $N(0, V_E)$, respectivamente. En el supuesto de que estas dos variables sean independientes ($COV_{GE} = 0$), la distribución de los valores fenotípicos presentará una varianza (V_P) igual a la suma de las de sus componentes ($V_P = V_G + V_E$) y obedecerá también a una ley normal $N(0, V_P)$. El efecto genético o valor genotípico desviado (G) puede a su vez fraccionarse como suma de tres variables aleatorias, normales e independientes que, en términos del análisis de la varianza factorial, corresponden a los efectos principales (valor aditivo o mejorante A), las interacciones de primer orden (interacciones intralocus o desviación dominante D) y las de orden superior (interacciones interloci o epistáticas I), de manera que $G = A + D + I$ y $V_G = V_A + V_D + V_I$.

Es importante recordar que las distintas variables que intervienen en el modelo fisheriano se definen como desviaciones con respecto al correspondiente valor medio de la población considerada. Esto hace que la descripción genética de un carácter en una población no sea extensible a otras, incluso a igualdad de ambiente. Por su parte la variación ambiental puede partirse de distintas formas, aunque aquí sólo aludiremos a una de ellas relativa a aquellas poblaciones formadas por un conjunto de familias del mismo tipo. En estas condiciones podemos tener en cuenta un componente interfamiliar V_{EC} que



representa las semejanzas no genéticas entre los miembros de una misma familia adquiridas por compartir un medio común, y un residuo V_{EN} que corresponde a las diferencias ambientales interfamiliares, de forma que $V_E = V_{EC} + V_{EN}$.

Además de los parámetros aludidos que definen cada carácter por separado, la descripción conjunta de dos atributos requiere la especificación de las covarianzas pertinentes, en particular aquellas que surgen entre los valores fenotípicos (COV_P) y entre los mejorantes (COV_A). La magnitud de la última es una medida de la pleyotropía, es decir, expresa el grado en que unos mismos genes influyen sobre dos caracteres diferentes.

Aunque el fenómeno analizado por Fisher puede ser muy complejo, el modelo tiene un campo de aplicación restringido. En primer lugar las variables G y E pueden no comportarse aditivamente, esto es, un efecto ambiental concreto no tiene por qué influir de la misma manera en los distintos genotipos. Este hecho se traduce, desde el punto de vista estadístico, en la aparición de una interacción genotipo x medio (I_{GE}), con lo cual el valor fenotípico desviado se descompondría ahora como $P = G + E + I_{GE}$ y su variación como $V_P = V_G + V_E + V_{I(GE)}$. Esta interacción tiene importancia cuando la ordenación de genotipos por sus correspondientes valores cambia al pasar de un medio a otro, lo cual trae consigo que la descripción genética del carácter en una población y circunstancias ambientales determinadas no sea extensible a otras condiciones diferentes. En segundo lugar las variables G y E pueden no ser independientes, y si no lo son aparecerá automáticamente una covarianza entre ellas (COV_{GE}) que expresa la cuantía en que ambas varían conjuntamente. En este caso el valor fenotípico desviado sigue descomponiéndose como $P = G + E$, pero su variación se expresa ahora como $V_P = V_G + V_E + 2COV_{GE}$, lo cual implica que ésta ya no puede dividirse en dos factores, cada uno de ellos atribuible separadamente a herencia o medio. Por estas razones el mejorador sólo puede actuar cuando la heterogeneidad del medio es reducida y ese residuo variable está aleatorizado, de manera que la variación ambiental pueda tomarse como el ruido de fondo con que inevitablemente se estudia la genética de un carácter dado. En rigor el análisis sólo es viable en estas condiciones simplificadas ($I_{GE} = 0$, $COV_{GE} = 0$ y, por tanto,



$P = G + E$, $V_P = V_G + V_E$) que suelen obedecer a una bien meditada manipulación ambiental.

1.2. Estima de heredabilidades y correlaciones genéticas

Puesto que la clasificación genotípica de la población con referencia a los caracteres cuantitativos es, por definición, imposible, sólo las variables P y A pueden evaluarse individualmente, la primera de forma directa en el propio individuo, y la segunda mediante una valoración de su descendencia, como el doble del valor fenotípico medio de sus hijos desviado de la media poblacional cuando el otro progenitor (o progenitores) son individuos del sexo opuesto tomados al azar de la población. Esto quiere decir que las respectivas varianzas (V_P y V_A) pueden estimarse y, por tanto, el cociente de ambas o heredabilidad del carácter en la población considerada ($h^2 = V_A/V_P$). La heredabilidad coincide con el coeficiente de regresión lineal que predice A dado P y expresa, en consecuencia, el grado de correspondencia entre el valor fenotípico desviado y la fracción aditiva del valor genotípico. Por esta razón su conocimiento es esencial a la hora de predecir la respuesta a la selección artificial. Por idénticas razones sólo las covarianzas fenotípica (COV_P) y aditiva (COV_A) entre dos caracteres pueden calcularse y, a partir de ellas, las correspondientes correlaciones (r_P y r_A).

El grado de parecido genético de parientes con respecto a un carácter determinado es función de los componentes de su varianza genética y esta propiedad se utiliza para estimar heredabilidades. Sin embargo la semejanza fenotípica, única que es calculable directamente, puede deberse tanto a causas hereditarias como ambientales y se evalúa como una covarianza (COV_R) cuya forma general es $COV_R = rV_A + uV_D + V_{EC}$. Para estimar el grado de parecido genético es, pues, indispensable eliminar la similitud debida a causas ambientales mediante un diseño experimental apropiado. Esto suele ser factible cuando se trata de evaluar la correspondencia entre datos de padres e hijos ($r = 1/2$, $u = 0$, $V_{EC} = 0$) o de medios hermanos ($r = 1/4$, $u = 0$, $V_{EC} = 0$), siendo muy difícil conseguirlo en el caso de hermanos ($r = 1/2$, $u = 1/4$, $V_{EC} \neq 0$).

En la práctica la semejanza fenotípica expresada por COV_R se estima como proporción de la variación fenotípica del carácter en la



población, mediante un coeficiente de regresión lineal ($b = COV_R/V_P$) en el caso padre(s)-hijos, o un coeficiente de correlación intraclase ($t = COV_R/V_P$) en el de hermanos o medios hermanos. Como se ha dicho, el parecido fenotípico de hermanos ($t_H = h^2/2 + V_D/4V_P + V_{EC}/V_P$) no debe utilizarse para estimar heredabilidades puesto que incluye la variación ambiental común y una fracción de la varianza dominante. En otras palabras, las llamadas heredabilidades obtenidas a partir de datos de hermanos, calculadas como el doble de la correlación intraclase correspondiente, están generalmente sesgadas y exceden al verdadero valor de la heredabilidad en una magnitud $(V_D + 4V_{EC})/2V_P$ en principio desconocida.

La estructura de errores de las estimas de heredabilidad computadas por uno u otro método está lo suficientemente documentada para permitir la optimización de los diseños experimentales pertinentes. El error típico del coeficiente de regresión, cuando se trata de s familias y n individuos por familia, viene dado aproximadamente por $E.T. (b) = \sqrt{m[1 + (n-1)t_H]/ns}$, siendo m el número de padres evaluados por familia ($m = 1$ o 2) y, por tanto, el error típico de la heredabilidad vendrá dado por $E.T. (h^2) = 2 E.T. (b)/m$. De la fórmula anterior se desprende que el error será mínimo para $n = 1$ y, en este caso, $E.T. (b) = \sqrt{m/s}$. Es obvio que si el carácter puede valorarse en ambos sexos ($m = 2$, $h^2 = b$) el error típico de la heredabilidad correspondiente, a igualdad del número total de individuos medidos, será aproximadamente la mitad del que se obtendría si la información se refiriese exclusivamente a un sexo ($m = 1$, $h^2 = 2b$). En todo caso, para obtener una precisión aceptable el número de individuos valorados necesarios $T = s(m + n)$ suele ser grande y, por ejemplo, si tratáramos de estimar una heredabilidad del orden del 30% ($h^2 = 0,3$) mediante el coeficiente de regresión del valor fenotípico medio de los hijos sobre el valor medio de los padres ($m = 2$), y nos propusiéramos hacerlo con un error máximo del 0,05, si el número de hijos por padre fuera cuatro ($n = 4$) sería necesario valorar un total de $T = 1.740$ individuos agrupados en $s = 290$ familias.

Paralelamente el error típico de la correlación intraclase referente a medios hermanos es aproximadamente $E.T.(t_{MH}) = \sqrt{2(1 + nt_{MH})^2 (1 - t_{MH})^2/n^2s}$ y,



para un número fijo de individuos medidos $T = ns$ el error es mínimo para $n = 1/t_{MH}$. En este caso $E.T.(t_{MH}) = \sqrt{8t_{MH}/T}$ y $E.T.(h^2) = 4E.T.(t_{MH})$.

Utilizando los valores del ejemplo anterior para estimar una heredabilidad entorno a 0,3 con un error típico 0,05, obtenemos $n = 14$, $s = 274$ y $T = 3.840$. Es más, si n fuera muy grande resulta que $E.T.(h^2) \approx h^2\sqrt{2/s}$ y, por tanto, para estimar una heredabilidad con un error típico del orden de la cuarta parte de su valor ($E.T.(h^2) \approx h^2/4$), el número de familias evaluadas debe ser mayor que 32. Cabe notar que, en los comienzos de la mejora genética en acuicultura, este requisito mínimo raramente fue observado, lo cual condujo a que la mayoría de las heredabilidades publicadas en ese periodo carezcan de una precisión estadística aceptable (véase revisión por LÓPEZ-FANJUL y TORO 1990).

Los ejemplos anteriores nos sirven para ilustrar un principio general. La correlación intraclase debe utilizarse para estimar heredabilidades cuya magnitud se presume reducida ($h^2 < 0.25$), a priori la de aquellos caracteres relacionados con fecundidad y viabilidad, mientras que el método de regresión es el más adecuado en los restantes casos, ya que a igualdad de esfuerzo (igual T) lleva consigo mayor precisión (menor error típico). Utilizando las fórmulas anteriores, si la heredabilidad se estimara mediante el coeficiente de regresión de la media de los hijos sobre un padre ($h_R^2 = 2b$, $m = 1$) utilizando un diseño que minimizara su varianza ($n = 1$, $s = T/2$), ésta es igual a $V(h_R^2) = 8/T$. En el caso de que la estima se obtuviera a partir de la correlación intraclase de medios hermanos y también se minimizara su varianza por diseño ($n = 1/t_{MH}$), esta sería igual a $V(h_{MH}^2) = 32 h^2/T$. Por tanto, el cociente $V(h_{MH}^2)/V(h_R^2) = 4h^2$ será menor que la unidad siempre que $h^2 < 0.25$.

Para terminar diremos que las correlaciones genéticas (r_A) pueden también estimarse mediante métodos de regresión o de análisis de varianza-covarianza. En principio los diseños óptimos para calcular heredabilidades también lo son para computar correlaciones, puesto que, aproximadamente (cuando r_A es baja) $E.T.(r_A) = (1 - r_A^2) \sqrt{E.T.(h_1^2) E.T.(h_2^2)/2h_1^2h_2^2}$. No obstante, si se estiman las heredabilidades y la correlación genética a partir de un mismo diseño, el error típico de las primeras será apreciablemente menor que el de la última puesto que, en el caso de la heredabilidad, sólo se infiere el valor de una de las variables implica-



das (valor mejorante) conociéndose el de la otra (valor fenotípico), mientras que en el de la correlación genética se infieren los valores de ambas variables (valores mejorantes de los caracteres 1 y 2).

1.3. Caracteres de interés económico en acuicultura

En términos muy amplios dos caracteres tienen especial importancia en peces: el tiempo necesario para llegar al peso comercial y la cantidad (o el precio) del alimento consumido para alcanzarlo, sin embargo ninguno de ellos suele ser objeto de valoración directa. El primero se substituye por el peso a una edad fija, aquella a la que normalmente se comercializa el producto, y el segundo por la ganancia en peso por unidad de tiempo hasta esa edad, rasgos ambos de mucha más fácil valoración y cuyas correlaciones con los primeros se supone que deben ser altas, porque así ocurre en las especies domésticas tradicionales, aunque nunca se hayan evaluado con precisión suficiente en las especies utilizadas en acuicultura.

El incremento del índice de crecimiento lleva consigo la aceleración del ritmo de producción y la obtención de individuos de mayor tamaño, cuyo precio por unidad de peso puede ser más elevado. La única medida de la eficiencia de conversión de alimento en peso vivo (unidades de alimento consumidas por unidad de aumento de peso) ha sido obtenida por KINGHORN (1983) en trucha arco iris y su coeficiente fenotípico de variación ha resultado ser muy bajo (6%). El coste del pienso es la fracción más importante del total de producción y, por esta razón, es importante conocer la magnitud de las correlaciones entre las evaluaciones de los caracteres de interés a edades tempranas y a la edad comercial, con objeto de adelantar esta última valoración, si ello fuera posible, y así reducir costes.

Además de los atributos citados puede tener interés considerar los siguientes:

- a) Mortalidad en la edad comercial, puesto que en fases previas su entidad es escasa dado el reducido valor económico individual de los alevines. La mortalidad es un rasgo difícil de tratar desde el punto de vista genético puesto que, en realidad, es un conjunto de caracteres cada uno de ellos atribuible en principio a distin-



tas causas. La calidad del huevo (representada por su tamaño o volumen) está correlacionada positivamente con la supervivencia en los primeros estados del desarrollo, sin embargo la mejora de este último atributo a través del manejo es, en principio, más eficiente de la que pudiera esperarse como resultado de la selección.

- b) Resistencia a enfermedades que, otra vez, es un rasgo complejo por la diversidad de agentes patógenos, y debe definirse con más exactitud precisando cuál es el agente concreto implicado. En particular interesa la resistencia a virosis específicas de las explotaciones intensivas, que raramente tienen trascendencia en condiciones naturales.
- c) Calidad de la canal, de importancia en las especies en las que el valor de cada pieza es alto. Aunque debe tenerse en cuenta que la calidad del producto final se define de manera diferente en distintas especies, algunos componentes del valor económico de la canal, como su rendimiento, composición química o color, pueden medirse objetivamente
- d) Edad al alcanzar la madurez sexual, en especial en aquellas especies que se comercializan con pesos elevados, puesto que a efectos prácticos la madurez coincide con el límite superior del peso y, una vez alcanzada, la calidad de la canal y la eficiencia de conversión de alimento disminuyen y la mortalidad aumenta. Por todas estas razones la comercialización debe anticiparse a la madurez sexual y, a este respecto, serán útiles las técnicas de manejo que permitan retrasar la aparición de ésta.
- e) Tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno en el agua y de metabolitos limitadores del crecimiento, si se trata de especies cultivadas en aguas estancadas.
- f) La fecundidad tiene escasa importancia económica por la gran cantidad de huevos que una hembra puede producir, del orden de 10^3 por kilo de peso en salmónidos y tilapias y de 10^4 en carpa y pez gato. Esta aparente ventaja ha tenido y tiene en muchas ocasiones consecuencias desfavorables, puesto que al ser posible obtener un gran número de individuos a partir de muy pocos padres no ha sido práctica común utilizar más progenitores que



los estrictamente precisos, lo cual induce depresión consanguínea por una parte, y por otra erosiona la variabilidad genética sobre la que actúa la selección artificial (véase el apartado 3.7).

Aunque los parámetros que definen la distribución de los caracteres de interés económico son propios de las condiciones ambientales en que estos se han medido, los coeficientes fenotípicos de variación del peso y de los descriptores de la calidad de la canal (color y porcentaje de grasa) suelen ser mucho mayores que los del rendimiento de ésta (30% vs. 10%), como puede apreciarse en los datos incluidos en la tabla 1, que son un sumario de los publicados por GJEDREM y OLESEN (2005).

TABLA 1.
Coeficientes de variación fenotípicos (%) de distintos caracteres
y especies, redondeados al 5% más próximo

ESPECIE/ CARÁCTER	Trucha arco-iris	Salmón	Coho	Trucha Alpina	Pez Gato	Tilapia	Promedio
Peso	20	30	40	40	25	30	30
% Grasa	20	20	60	10	5		25
Color	20	20	30	50			30
% Rendimiento	5	5			20		10

Fuente: datos recopilados por GJEDREM y OLESEN (2005)

1.4. Heredabilidades y correlaciones genéticas de los caracteres de interés económico en acuicultura

La tabla 2 proporciona un resumen del amplio conjunto de valores recogidos por GJEDREM y OLESEN (2005), referentes a un buen número de especies de peces y moluscos. Aunque, como se ha dicho anteriormente, la heredabilidad es una propiedad tanto del carácter como de la población en que éste se evalúa y su valor no es en principio extensible ni a otras poblaciones de la misma especie ni, mucho menos, a otras especies distintas, las estimas recogidas en la tabla 2 para un mismo carácter son, en la práctica, bastante uniformes en el conjunto de las especies consideradas. En general, se aprecian las siguientes tendencias:



- a) La heredabilidad del peso se centra en valores comprendidos entre 0,2 y 0,4.
- b) Las características de la canal presentan en general heredabilidades algo más bajas que las anteriores, en especial la del rendimiento.
- c) La mortalidad a la edad comercial y la resistencia a enfermedades han resultado tener heredabilidades muy bajas (del orden de 0,1), como cabría esperar de caracteres complejos que obedecen a múltiples y diferentes causas.

En la mayoría de los casos, el valor de las estimas de heredabilidades obtenidas a partir de datos de hermanos (h_H^2) ha resultado ser superior al de las correspondientes a medios hermanos (h_{MH}^2). Con respecto a un determinado carácter, esta diferencia puede atribuirse a la existencia de varianza dominante y/o varianza ambiental común, sin que sea posible deslindar la contribución individual de cada uno de estos dos factores, como se ha mencionado previamente. Sin embargo, una diferencia $h_H^2 - h_{MH}^2$ del orden de 0,10 puede explicarse en ausencia de dominancia ($V_D = 0$) mediante una semejanza ambiental relativamente pequeña ($V_{EC}/V_P = 0,05$); mientras que si esta última no se diera ($V_{EC} = 0$) la importancia relativa de la varianza dominante debería ser

TABLA 2.1.

Heredabilidades de distintos caracteres y especies estimadas a partir de datos de medios hermanos (o hermanos), redondeadas al 5% más próximo

ESPECIE/CA- RÁCTER	Trucha arco-iris	Salmón atlántico	Coho	Char Ártico	Pez Gato	Promedio
Peso	0,20 (0,50)	0,35 (0,30)	0,30	0,50 (0,40)	0,40 (0,50)	0.30 (0.40)
% Grasa	0,40 (0,20)	0,40(0,40)		0,10	0,20 (0,65)	0.30 (0.30)
Color	0,20 (0,30)	0,20(0,20)	0,10 (0,40)	0,30		0.20 (0.30)
% Rendimiento	0,20 (0,30)	0,10(0,10)	(0,20)		0 (0,60)	0.15 (0.20)

TABLA 2.2.

Estimas de heredabilidades del peso en otras especies

Carpa	Tilapia	Rodaballo	Langostino	Ostra	Vieira
0,25	0,30 (0,60)	0,70 (0,45)	0,40 (0,55)	0,30	0,40

Fuente: datos recopilados por GJEDREM Y OLESEN (2005) modificados.



considerable ($V_D/V_P = 0,20$), lo cual no es fácil que ocurra cuando se trata de caracteres morfológicos.

La tabla 3 presenta un resumen de las estimas recopiladas por GJEDREM y OLESEN (2005) correspondientes a correlaciones fenotípicas y genéticas entre peso y distintas características de la canal en salmónidos. Ambas correlaciones son comúnmente bajas y positivas. De magnitud semejante (en torno a 0,35) es la correlación genética entre tasa de crecimiento y supervivencia.

TABLA 3.
Correlaciones genéticas (sobre la diagonal) y fenotípicas (bajo la diagonal) en salmónidos, redondeadas al 5% más próximo

	Peso	%Grasa	Color	%Rendimiento
Peso	X	0,25	0,25	0,25
%Grasa	0,45	X	-0,10	0,40
Color	0,25	0,05	X	-0,30
%Rendimiento	0,10	0,10	0	X

Fuente: datos recopilados por Gjedrem y Olesen (2005) modificados.

2. DERIVA GENÉTICA

2.1. Consanguinidad

Se denomina consanguínea a la descendencia de los apareamientos entre aquellos individuos que están más emparentados entre sí que el promedio de las posibles parejas tomadas al azar de la población de la que proceden. La consanguinidad en una población de censo grande surge como consecuencia de apareamientos deliberados entre parientes, pero también ocurre como producto inevitable de apareamientos al azar si la población pertinente es de censo pequeño. Por ejemplo, en una población formada por dos machos y dos hembras todos los apareamientos serán necesariamente entre hermanos o primos.

La medida clásica de la consanguinidad de un individuo es el coeficiente de consanguinidad (F) que se define como la probabilidad de que los dos genes que ese individuo porta en un mismo locus sean idénticos por descendencia, esto es, que ambos sean copias de otro gen de un antepasado común.



2.2. Medida del coeficiente de consanguinidad

Si se conocen las genealogías de los individuos, su coeficiente de consanguinidad puede deducirse directamente mediante los métodos de Wright y Malécot (descritos, por ejemplo, en FALCONER y MACKAY, 2001) o el método tabular (descrito en VAN VLECK *y col.*, 1987). Cuando se trata de poblaciones, el coeficiente de consanguinidad de éstas es igual a la media del de los individuos que la componen. Puesto que las genealogías disponibles no son temporalmente ilimitadas, se toma como referencia una población ancestral (la población base) a la que se asigna por convenio el coeficiente cero.

Si se utiliza un sistema regular de apareamientos entre parientes para producir líneas consanguíneas, la evaluación del coeficiente de consanguinidad puede llevarse a cabo mediante ecuaciones recurrentes que relacionan el coeficiente en la generación t con los correspondientes a las generaciones previas. Por ejemplo, en el caso de apareamientos entre hermanos $F_t = (1 + 2F_{t-1} + F_{t-2})/4$.

Una situación distinta es la de poblaciones endógamas de censo limitado propagadas por apareamientos al azar, lo que al cabo de t generaciones resulta en un coeficiente de consanguinidad que, referido a la población base, es $F_t = 1 - (1 - \Delta F)^t$, siendo ΔF el incremento de consanguinidad en una generación, supuesto igual para todas ellas, relativo al máximo posible, es decir $\Delta F = (F_t - F_{t-1})/(1 - F_{t-1})$.

Este incremento es también igual a $1/2N_e$, siendo N_e el censo efectivo de progenitores de la población objeto de estudio que, dados F_t y F_{t-1} , se deduce a partir de la fórmula anterior. Por ejemplo, si $F_t = 0,505$ y $F_{t-1} = 0,5$, $\Delta F = 0,01$ y $N_e = 50$. En las condiciones impuestas en el desarrollo del clásico modelo de Wright, el censo efectivo coincide con el censo real de reproductores N de una población ideal panmíctica (capaz de autofecundación y fecundación cruzada) que se mantiene constante a lo largo de las generaciones, de manera que la contribución de descendientes por progenitor se distribuye aproximadamente a la Poisson.

Hay tres factores muy importantes de los que depende la magnitud del censo efectivo. El primero es la proporción relativa de padres y madres. Si en una población el número de padres (N_p) y madres



(N_M) es diferente, el censo efectivo será $N_e = 4N_p N_M / (N_p + N_M)$ y, por tanto, el máximo censo efectivo de una población se obtendrá cuando $N_p = N_M = N/2$ ($N_e = N$). Así, si $N_p = 2$, el máximo censo efectivo de la población es $N_e = 8$, aunque los machos en cuestión se apareen con un número infinito de hembras ($N_p = 2$, $N_M = \infty$); y el incremento de consanguinidad por generación será de 0,0625, el mismo que tendría una población ideal que se perpetuara con cuatro padres y cuatro madres por generación ($N_p = N_M = 4$).

El segundo factor es el número de progenitores por generación. Si durante t generaciones este número de individuos no es constante, el censo efectivo que rige el proceso de deriva durante este periodo es igual a la media armónica de los censos de las distintas generaciones (N_i), es decir $1/N_e = \sum (1/N_i)/t$. Esta fórmula indica que aquellas generaciones en las que el número de progenitores sea menor son las que tienen un efecto más pronunciado sobre la magnitud del censo efectivo que caracteriza a las t generaciones consideradas. Así, si iniciamos una población con dos padres y dos madres ($N_1 = 4$) y en las sucesivas tres generaciones la población se expandiera hasta alcanzar censos muy grandes ($N_2 = N_3 = N_4 = \infty$), el censo efectivo a lo largo del periodo considerado será de 16, que es el mismo que tendría una población mantenida únicamente con ocho parejas de progenitores por generación durante el mismo intervalo. Evidentemente, si $N_i = N$, $N_e = N$. Desde luego, las dos situaciones mencionadas pueden tratarse conjuntamente y cuando los números de padres (N_{pi}) y madres (N_{mi}) difieran entre generaciones, el correspondiente censo efectivo vendrá dado por $1/N_e = \sum (1/4N_{pi})/t + \sum (1/4N_{mi})/t$.

El tercer factor se refiere a las diferencias en fertilidad y fecundidad entre los progenitores, que se traducen en una variabilidad V_k del número de hijos por familia que, a su vez, van a llegar a ser progenitores. En estas circunstancias el censo efectivo es, aproximadamente, $N_e = 4N/(2 + V_k)$. Esta expresión indica que $N_e > N$ si $V_k < 2$ y viceversa. Además es obvio que $N_e = N$ si la distribución del número de hijos por familia es una Poisson de parámetro dos ($V_k = 2$). Por tanto, si queremos minimizar el aumento de consanguinidad en un programa de conservación o de mejora, debemos asegurar que cada pareja



contribuya un hijo y una hija al grupo reproductor de la siguiente generación ($V_k = 0$).

2.3. Consecuencias genéticas de la consanguinidad: depresión consanguínea y erosión de la variabilidad genética

Desde el punto de vista genético, el efecto más señalado de la consanguinidad es el aumento de la frecuencia de homocigotos a expensas de una disminución de la frecuencia de heterocigotos que es proporcional a $1 - F$, de manera que para $F = 1$ toda la población es homocigota.

Aunque existe una relación estrecha entre consanguinidad y homocigosis, puesto que si un individuo es portador de dos genes idénticos por descendencia en un locus debe ser homocigoto en ese locus, el coeficiente F no es una medida absoluta de la homocigosis sino relativa. Si un individuo tiene un valor de $F = 0,30$ con respecto a la población base, esto quiere decir que la probabilidad de ser heterocigoto en un locus determinado es el 30 por ciento menor que la de un individuo de la población base, sin que se pueda conocer esta última. En otras palabras, si la frecuencia de heterocigotos en la población base fuera pequeña, la proporción de loci heterocigóticos de un individuo perteneciente a la generación t cuyo coeficiente de consanguinidad fuera $F = 0$ sería muy baja, pero la de otro individuo con $F = 0,30$ con respecto a la misma base será el 30 por ciento menor.

Ahora podemos hacernos la siguiente pregunta ¿cuál es el efecto de la heterocigosis sobre el valor medio de un carácter de interés productivo en una población? Cabe imaginar básicamente dos situaciones: el valor del carácter en el heterocigoto es intermedio al de los dos homocigotos (acción génica aditiva), o bien está próximo al de uno de los homocigotos (acción génica dominante). La información empírica disponible indica que la mayoría de los loci que generan la variación genética de muchos caracteres productivos presentan acción génica aditiva, mientras que en aquellos otros caracteres relacionados con la eficacia biológica la acción génica es, por lo general, de tipo dominante.

Ya hemos señalado que, desde el punto de vista genético, el efecto más notable de la consanguinidad es el aumento de la frecuencia de



homocigotos a expensas de la de los heterocigotos. Desde el punto de vista fenotípico la consecuencia más llamativa de la consanguinidad en poblaciones de especies domésticas es la aparición de individuos con defectos genéticos que corresponden a la manifestación de los efectos de genes recesivos desfavorables que previamente se encontraban enmascarados en condición heterocigota en la población base. El impacto económico de estos defectos suele ser escaso y su remedio práctico consiste en eliminar de la población a los individuos afectados.

Mucho más preocupante es el fenómeno conocido como depresión consanguínea, que se define como la reducción de los valores promedios de los caracteres ligados a la aptitud reproductora o la eficacia biológica que ocurre en la descendencia de apareamientos consanguíneos, sean estos intencionados o no. La depresión consanguínea es consecuencia del aumento de la proporción de homocigotos para aquellos genes que presentan dominancia direccional con respecto a los atributos mencionados. Este incremento en frecuencia tiene escaso efecto sobre la media del carácter si se trata de los homocigotos dominantes, cuyo valor genotípico difiere poco o nada del de los heterocigotos, pero es importante en el caso de los homocigotos recesivos porque, en este caso, la diferencia en valor genotípico es considerable. En términos más formales, el cambio en media tras t generaciones puede expresarse como $\Delta M_t = F_t \Delta M_\infty$, siendo ΔM_∞ el máximo cambio posible (que se obtiene para $F_t = 1$) y, por tanto, la depresión consanguínea aumentará linealmente en F_t . Dicho de otra forma, $\Delta M_t = -DF_t$, siendo D la depresión consanguínea por unidad porcentual del coeficiente de consanguinidad. En el apartado 3.7 utilizaremos una versión simplificada $\Delta M_t = -D t/2N_e$ de esta última ecuación, para $F_t = 1 - (1 - 1/2N_e)^t \approx t/2N_e$.

Por otra parte, un aumento del coeficiente de consanguinidad promedio de una población hasta un valor F_t lleva consigo que la contribución de los loci con acción génica aditiva con respecto a un carácter disminuya la varianza genética de éste en $1 - F_t$. Por tanto si la acción génica predominante es la aditiva, como suele ocurrir con los rasgos morfológicos, la varianza aditiva de éstos en una población de censo efectivo N_e decrecerá de acuerdo con la expresión $\Delta V_{At} = -F_t V_{A0}$, siendo V_{A0} el valor correspondiente a la población base, o bien $\Delta V_{At} = -tV_{A0}/2N_e$, expresión aproximada de la que también haremos uso en el apartado 3.7.



En general, la contribución de los loci recesivos a la varianza aditiva de un carácter también disminuye al aumentar la consanguinidad, aunque este decremento ya no es proporcional a $1 - F_t$. La excepción más notable corresponde a aquellos recesivos que segregan a frecuencias bajas, cuya contribución a la varianza aditiva aumenta con F_t hasta alcanzar un determinado valor para disminuir a continuación aunque, al mismo tiempo, son los que producen una mayor depresión consanguínea.

3. SELECCIÓN ARTIFICIAL

3.1. Respuesta a la selección artificial

La selección artificial es una técnica cuya aplicación permite modificar la composición del acervo genético de una población con respecto a uno o varios caracteres, de manera que los valores promedio de éstos vayan cambiando en el sentido deseado a medida que transcurren las generaciones. La esencia de la selección reside en utilizar como reproductores exclusivamente a los individuos de la población cuyas características sean más favorables en lo que toca al criterio de selección seguido; otra cosa, bastante más compleja, es determinar cuál debe ser éste.

La respuesta a la selección esperada, esto es, el cambio temporal de la media de un carácter o de una combinación lineal de varios, puede expresarse en términos anuales como $R = i r_{AC} \sqrt{V_A/L}$. Veamos a continuación qué representan los distintos términos incluidos en esta expresión.

3.2. Intensidad de selección (i)

La intensidad de selección es igual a la superioridad en media (tipificada) del conjunto de padres seleccionados sobre su población de procedencia, con respecto al criterio de selección utilizado. Si se seleccionan N individuos de T , es decir una proporción $p = N/T$ del total, la intensidad aumenta a medida que p disminuye, de manera que aproximadamente $i \approx 0,8 + \ln [(1 - p)/p]$.

La magnitud de la intensidad de selección oscila entre límites relativamente próximos y así, seleccionando el mejor individuo de cada



mil ($p = 0,001$) i resulta ser igual a 3,4, mientras que si se reservan como futuros padres la mejor mitad de la población ($p = 0,5$) el valor correspondiente de i es 0,8.

La proporción de individuos que es posible seleccionar depende de las características biológicas de la especie. En machos, el extremo inferior viene determinado por el número mínimo de éstos que es necesario para cubrir a la totalidad de las hembras seleccionadas. En hembras, el factor limitante es su potencial reproductivo neto, definido como el número de ellas que llega a la madurez sexual por hembra apareada. A título indicativo diremos que en las especies animales domésticas tradicionales los valores medios de i oscilan entre 0,9 (vacuno) y 2,3 (porcino y aviar).

Raramente se selecciona la menor proporción posible puesto que el pequeño número de reproductores resultante llevaría consigo un elevado grado de consanguinidad con el paso de las generaciones y la consiguiente depresión de la media y erosión de la varianza aditiva. En la práctica la proporción seleccionada suele fijarse, entre otras consideraciones, por compromiso entre las magnitudes de la respuesta y la depresión consanguínea esperadas. Por otra parte, una vez fijado el número de reproductores N , la consanguinidad puede aun reducirse, apareándolos de manera que el parentesco medio entre los miembros de las parejas sea mínimo y ajustando la proporción de descendientes que cada pareja contribuye a la generación siguiente en relación inversa al coeficiente de parentesco de los progenitores.

3.3. Intervalo entre generaciones (L)

El mejorador sólo dispone de una oportunidad por generación para modificar el acervo genético de las poblaciones. Esta se da en el momento en que se decide quienes van a ser los padres de la generación siguiente y de qué manera se van a aparear éstos. Es evidente que si se logra un aumento de la producción por generación de selección, la magnitud de la mejora por unidad de tiempo crecerá a medida de que el intervalo de tiempo transcurrido entre generaciones sucesivas disminuya, debido a la mayor depreciación que sufrirá el producto final si se obtiene a un plazo más largo. Por esa razón el interés del mejorador es hacer máxima la respuesta anual y, para ello, es neces-



rio definir el intervalo medio de tiempo (en años) transcurrido entre el nacimiento de los padres y el de los hijos.

La consideración del factor tiempo en un programa de selección implica la aparición de un antagonismo entre la duración de la generación y la intensidad de selección posible. Esto es así porque para un número prefijado de individuos seleccionados N , la proporción seleccionada sólo puede disminuir aumentando el número de individuos evaluados de T a $T + K$, y para obtener los K adicionales será necesario un lapso más largo. Por esta razón, en cada caso concreto debe llegarse a una solución de compromiso que haga máximo el cociente i/L pero no únicamente i . La selección puede concebirse como un cribado de genes que ocurre una sola vez por generación. En esta labor de separar el grano de la paja durante un intervalo de tiempo fijo, nos interesa tanto la velocidad de cribado como la finura de la criba. Muchas veces ocurre que el procedimiento óptimo es el que lleva consigo más cribados por unidad de tiempo, a costa de que cada uno de ellos sea más imperfecto de lo que ocurriría operando más lenta y cuidadosamente; esto es equivalente a sacrificar parte de la presión de selección para reducir el intervalo entre generaciones. La razón es bastante obvia pues, como se ha dicho antes, el mejorador actúa una sola vez por generación y mientras menor sea la duración de ésta más veces intervendrá a lo largo del tiempo. En acuicultura, el intervalo entre generaciones no suele ser corto y, por ejemplo, en salmón y trucha arco iris es del orden de tres o cuatro años, respectivamente.

3.4. Variación genética aditiva (V_A)

Es evidente que la selección no tendrá efecto si el rasgo seleccionado no presenta variación genética en la población considerada y, en contra de lo que suele suponerse, no todos los caracteres de interés económico poseen esta condición en grado apreciable. En otros casos la varianza aditiva puede ser de pequeña magnitud, aun cuando la heredabilidad del carácter sea alta. Las estimas de heredabilidades de atributos productivos en peces y moluscos citadas en el apartado 1.4 parecen ser del mismo orden de las que normalmente se han encontrado en las especies domésticas tradicionales con respecto a atributos semejantes. Por otra parte, tal como sucede en otros muchos orga-



nismos, las heredabilidades de los caracteres relacionados con eficacia biológica (viabilidad y fecundidad) suelen ser de pequeña magnitud.

3.5. Precisión (r_{AC})

La selección artificial es, en esencia, un proceso de rastreo de los mejores genotipos presentes en la población objeto de mejora, utilizando un determinado criterio como guía. Para que un programa de selección tenga éxito es imprescindible que exista una correlación (r_{AC}) entre el criterio (C) utilizado para seleccionar y el valor mejorante (A) del individuo que se selecciona con respecto al atributo que se trata de mejorar. En el caso más simple (selección individual o masal) ese criterio no es otra cosa que el valor fenotípico individual del carácter seleccionado ($C = P$) y la correlación r_{AC} es igual a la raíz cuadrada de la heredabilidad del carácter ($r_{AC} = h$). En otras situaciones más complejas se hace uso de la estructura genealógica de la población y el criterio incluye, además del valor fenotípico del individuo, la información sobre su valor mejorante contenida en los valores fenotípicos de sus parientes. Por tanto el valor de r_{AC} será función, además de la heredabilidad, del grado de parentesco r ya mencionado anteriormente ($r = 1/2$ si se trata de familias de hermanos y $r = 1/4$ si lo son de medios hermanos), del número de individuos por familia (n) supuesto igual en todas ellas, y del parecido fenotípico entre los parientes en cuestión representado por la correspondiente correlación intraclase (t_H o t_{MH}).

En general contamos con dos fuentes de información no correlacionadas: la desviación del valor fenotípico individual con respecto a la media familiar (desviación intrafamiliar: P_I) y la desviación de esta última con respecto a la media poblacional (desviación familiar: P_F). Se trata, pues, de combinar estos dos elementos en un índice que constituirá nuestro criterio de selección, esto es $C = b_I P_I + b_F P_F$ de tal manera que la correlación r_{AC} sea máxima (equivalente a $b_{AC} = 1$), lo cual se cumple para los siguientes valores de los coeficientes b_I y b_F :

$$b_I = (1 - r)h^2/(1 - t)$$

$$b_F = [1 + (n - 1)r]h^2/[1 - (n - 1)t].$$

El valor de la correlación es entonces:

$$r_{AC} = h\sqrt{1 + (r - t)^2(n - 1)/(1 - t)[1 + (n - 1)t]}$$



La selección llevada a cabo de acuerdo con el índice descrito se denomina combinada, y puede demostrarse que la respuesta correspondiente es siempre superior a la que se obtendría por selección individual si se cumple que $r > t$, lo cual ocurre siempre que la heredabilidad sea menor que la unidad, a no ser que exista un fuerte componente ambiental de semejanza entre los miembros de las familias utilizadas. Nótese que la selección individual es un caso especial ($b_i = b_f$) de la combinada, que equivale a ignorar la información genealógica. Cabe además analizar otros dos casos particulares: la selección familiar ($b_i = 0$) en la que se seleccionan o rechazan familias enteras basándose en su media, sin tener en cuenta los fenotipos individuales, y la selección intrafamiliar ($b_f = 0$) en la que se selecciona la mejor pareja de cada familia. El primer procedimiento solamente superará al de selección individual cuando $t < r^2$, es decir, cuando la heredabilidad sea baja. El segundo tendrá más éxito que la selección individual si $(1 - t) < (1 - r)^2$, esto es, cuando el parecido fenotípico de los miembros de las familias exceda considerablemente al esperado por puras razones hereditarias (V_{EC}/V_P elevada). En cualquier otro caso la selección individual es el método más eficaz y, por otra parte, el más fácil de llevar a cabo. Desde luego la selección combinada es el procedimiento óptimo, aunque su puesta en marcha sea considerablemente más costosa y compleja.

Resumiendo, la optimización del valor de r_{AC} utilizando como criterio de selección una estima del valor mejorante del carácter de interés, equivale a que la regresión b_{AC} del valor mejorante sobre el criterio sea igual a la unidad y, por tanto, $r_{AC} = \sqrt{V_C/V_A}$. Esto implica que la respuesta a la selección pueda expresarse como $R = i \sqrt{V_C}$, indicando que la respuesta a la selección se hace independiente del valor de la heredabilidad del carácter, con tal de que éste exista, y sólo depende de la presión selectiva i y de la variabilidad poblacional V_C del criterio seguido.

Las consideraciones anteriores están fundamentadas sobre dos suposiciones. En primer lugar se supone que la distribución de las desviaciones ambientales de los miembros de una misma familia con respecto al criterio seguido debe ser aleatoria. En segundo lugar se admite que los efectos genéticos referentes a dicho criterio son



exclusivamente directos, esto es, el genotipo de un individuo influye únicamente en su propio fenotipo pero no en el de otros que comparten con él un mismo medio, como pueden ser los miembros de su familia (efectos genéticos indirectos). Así, la distribución fenotípica intrafamiliar del carácter seleccionado presentará asimetría positiva como resultado de la competición que se establece entre los miembros de una misma familia, por el hecho de haber sido criados juntos en el mismo contenedor hasta que su tamaño sea lo suficientemente grande para que cada individuo pueda ser marcado. En principio la asimetría puede deberse a factores genéticos y/o ambientales pero, en ambos casos, los individuos más agresivos presentarán una tasa de crecimiento mayor y, por ello, serán seleccionados si se practica cualquier procedimiento de selección distinto del familiar. Si éste es el caso, o bien la respuesta obtenida sería nula (factores ambientales) o bien la selección resultaría en un incremento de la agresividad (factores genéticos) que puede incluso dar lugar a la aparición de respuestas negativas. Por el contrario el procedimiento de selección familiar sería el más eficiente en este tipo de situaciones (GRIFFING, 1977), puesto que la utilización de la medias familiares como criterio de selección nos proporciona un medio de identificar efectos genéticos indirectos que, por ser similares en los distintos miembros de una misma familia, estarán incluidos en su media. Paralelamente, cuando la heredabilidad de los caracteres seleccionados es baja, como ocurre con muchos atributos de interés en especies acuáticas, la selección familiar es el procedimiento más eficiente para la identificación de efectos genéticos directos.

3.6. Respuesta correlacionada

Como consecuencia de la pleyotropía, la segregación de unos mismos genes puede ser responsable de la variación genética de varios caracteres, al menos en parte. Por tanto la selección de uno de ellos (1) no sólo hará cambiar su media sino también la de cualquier otro (2) genéticamente correlacionado con él. Los cambios experimentados por la media de caracteres que no han sido seleccionados directamente reciben el nombre de respuesta correlacionada (RC_2) y el valor esperado de ésta viene dado por la expresión siguiente $RC_2 = i r_A h_1 h_2 \sqrt{V_{p2}}$.



Evidentemente, la respuesta correlacionada sólo existirá si la correlación genética (r_A) entre ese carácter y el seleccionado directamente es distinta de cero. Por otra parte, su magnitud dependerá de la correlación y, si ésta es baja, la respuesta correlacionada será despreciable en la práctica, al menos a corto plazo.

3.7. La respuesta a la selección en poblaciones de censo finito

El cambio genético de la media de un carácter cuantitativo cuasi-neutro en una población de censo finito es el resultado de la acción de dos fuerzas antagónicas: selección artificial y deriva genética, de manera que en una población de censo efectivo N_e la respuesta a la selección R_t en la generación t viene dada por $R_t = i r_{AC(t)} \sqrt{V_{At}} - D/2N_e$, siendo $r_{AC(t)}$ la precisión con que se lleva a cabo el proceso selectivo y V_{At} la varianza genética aditiva del carácter de interés, ambas en esa generación, y D la depresión consanguínea por unidad porcentual del coeficiente de consanguinidad.

La deriva genética hace que tanto $r_{AC(t)}$ como V_{At} cambien en el tiempo, y la respuesta acumulada a la selección después de t generaciones de selección RA_t puede expresarse aproximadamente ($t < N_e$) como $RA_t \approx R_o [t - \beta t^2/4N_e] - tD/2N_e$, siendo R_o la respuesta a la selección en la generación inicial y β la reducción de la varianza aditiva intrafamiliar por deriva (Wee y col. 1996). Esta ecuación muestra claramente la influencia de la magnitud del censo efectivo sobre la respuesta a la selección, indicando que la respuesta inicial depende principalmente de la precisión del procedimiento selectivo $r_{AC(t)}$, pero que a medida que las generaciones pasan la importancia de los factores β y D sólo es despreciable si $t < N_e$. En resumidas cuentas, la respuesta a medio o largo plazo siempre será menor que la esperada suponiendo una tasa constante de mejora por generación (tR_o).

Por otra parte incluso la respuesta en la primera generación R_o depende de N_e , puesto que es directamente proporcional al valor de i . Para un total fijo de individuos evaluados, la intensidad de selección disminuye con el número de familias y dicha reducción es mayor a medida que aumenta la correlación entre los valores mejorantes de los individuos seleccionados, en otras palabras, el valor de i disminuirá apre-



ciablemente cuando el criterio de selección incluya información familiar. Además $r_{AC(t)}$ y N_e están correlacionados negativamente, es decir, el uso de información familiar aumenta $r_{AC(t)}$ a costa de disminuir N_e y, por tanto, β también se incrementará. Por ejemplo, $\beta \approx 0,65$ si se selecciona utilizando BLUP y el número de individuos por familia es elevado.

En un programa de selección artificial no sólo interesa la respuesta esperada sino también la precisión con que dicha respuesta se predice, es decir, el coeficiente de variación de la respuesta (NICHOLAS, 1980). Examinemos la situación más sencilla, esto es, la respuesta a la selección individual en una línea estimada como desviación de un control, cuando el número de progenitores y de individuos evaluados por generación en ambas poblaciones son los mismos. Si sólo estamos interesados en los efectos de la selección a corto plazo (4-5 generaciones), podemos suponer que la respuesta se acumulará linealmente pero que su valor esperado por generación disminuirá en una fracción δ como consecuencia de la depresión consanguínea. En esta situación, la respuesta acumulada tras t generaciones es $RA_t = (1 - \delta)t i h \sqrt{V_A}$.

Suponiendo además que la variabilidad de la respuesta a la selección se debe únicamente a la acción de la deriva genética, el coeficiente de variación de la respuesta viene dado por $CV(R_t) = \sqrt{2/(1 - \delta)/ih\sqrt{tN_e}}$ y, por tanto, las predicciones de R_t y $CV(R_t)$ precisan de la misma información. Si, por ejemplo, se deseara que $CV(R_t)$ fuera del orden del 10% y el valor de $i h$ fuera aproximadamente igual a la unidad (digamos $i = 2$ y $h^2 = 0,3$), la magnitud del censo efectivo preciso para alcanzar ese objetivo sería $N_e = 200/t$ si no se produjera depresión ($\delta = 0$) o bien $N_e = 312/t$ con una depresión $\delta = 0,2$ (la que se observaría si la respuesta por generación fuera del orden del 3% y la tasa de depresión consanguínea fuera el 0,6% por unidad porcentual de aumento en F).

Una forma distinta de analizar el problema anterior puede plantearse como sigue. Si quisiéramos encontrar el valor de N_e que garantizara con probabilidad γ que la respuesta observada fuera mayor que una fracción λ de la respuesta esperada, el valor de la desviación normal tipificada de γ (Z_γ) es $Z_\gamma = (\lambda - 1)/CV(R_t)$. Para $\gamma = \lambda = 0,9$ y los mismos valores utilizados en el ejemplo anterior ($ih = 1$), resulta que $N_e = 328/t$ si $\delta = 0$ o bien $N_e = 512/t$ si $\delta = 0,2$. Por tanto, la especi-



cación apriorística de la probabilidad de éxito y es más exigente que la del coeficiente de variación de la respuesta $CV(R_t)$ lo cual implica, en nuestro ejemplo, que el censo efectivo preciso para alcanzar los objetivos expuestos sea el 59% mayor en el primer caso. Además, la depresión consanguínea considerada aumenta ese mismo censo en un 55% en cada caso. Resumiendo, las metas propuestas sólo podrían alcanzarse si la selección se llevara a cabo en poblaciones cuyos censos efectivos estuvieran comprendidos en el intervalo $40 \leq N_e \leq 130$, condición que no suelen cumplir muchos programas de mejora animal en general y de peces y moluscos en particular.

BIBLIOGRAFÍA

- FALCONER, D.S., y T.F.C. MACKAY, 2001 *Introducción a la Genética Cuantitativa*. Acribia, Zaragoza.
- GJEDREM, T., e I. OLESEN, 2005 Basic statistical parameters, pp. 45-72 en GJEDREM, T. (coord.), *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*. Springer, Berlín.
- GRIFFING, B. 1987 Selection in populations of interacting genotypes. En POLLAK, E., KEMPTHORNE, O. y T.B. BAILEY (coord.). *Proceedings of the International Conference on Quantitative Genetics*. Iowa State University Press, Ames.
- KINGHORN, B., 1983 Genetic variation in food conversion efficiency and growth in rainbow trout. *Aquaculture* **32**: 141-155.
- LÓPEZ-FANJUL, C., y TORO, M. A. 1990 *Mejora genética de peces y moluscos*. Mundi-Prensa, Madrid.
- NICHOLAS, F.W., 1980 Size of population required for artificial selection. *Genet. Res.* **35**: 85-105.
- VAN VLECK, L.D., POLLAK, E.J. y E.A.B. OLTENACU, 1987. *Genetics for the Animal Sciences*. Freeman, Nueva York.
- WEI, M., CABALLERO, A. y W.G. HILL, 1994 Increasing long-term response to selection. *Genetics* **144**: 1961-1974.

5

DISEÑO DE PROGRAMAS DE MEJORA GENÉTICA EN ACUICULTURA

DISEÑO DE PROGRAMAS DE MEJORA GENÉTICA EN ACUICULTURA

M. A. Toro

Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

C. López-Fanjul

Facultad de Biología. Universidad
Complutense de Madrid

Resumen

Se presentan los principios generales que deben observarse en el diseño y ejecución de un programa de mejora, incluyendo entre ellos: 1) la definición del objetivo de mejora en el contexto de un determinado sistema de producción, 2) la elección de la población base y, si procede, el sistema de cruzamientos, 3) el desarrollo de un sistema de evaluación y selección, y 4) la transmisión del progreso genético obtenido en el núcleo mejorado a las poblaciones comerciales. También se revisan los experimentos de selección y consanguinidad en organismos acuáticos. Por último se describen las distintas metodologías propuestas para controlar la consanguinidad en programas de selección.

Abstract

The main steps that should be followed in the design and execution of an animal breeding program are: 1) the definition of the breeding objective



in the context of a particular production system, 2) the election of the base population and, in its case, the crossing system, 3) the implementation of an evaluation and selection system, and 4) the dissemination of the genetic progress obtained in the selection nucleus to the commercial populations. Previously obtained results from artificial selection and inbreeding experiments in aquatic organisms are reviewed. Finally, several recently proposed methodologies for controlling inbreeding in selection programs are described.

1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS PROGRAMAS DE MEJORA GENÉTICA EN ACUICULTURA

Los resultados de la aplicación de los programas de mejora a las especies animales domésticas son muy notables, alcanzándose tasas anuales de progreso genético del orden del 1-3% de la media. Por ejemplo, la producción anual por ponedora ha aumentado de 120 huevos a 340 durante los últimos 50 años, y la producción de leche por vaca y lactación ha pasado de 2.000 Kg a más de 9.000 en el mismo periodo. En términos monetarios, el informe de la plataforma europea FABRE (2006) atribuye a la mejora genética animal un beneficio de 2000 millones de euros anuales, ligados a una inversión de 150 millones en investigación y desarrollo que es gestionada en su mayor parte a través de convenios con universidades y otros centros de investigación. Aunque la tasa de progreso genético pueda parecer pequeña en relación con las atribuibles a los avances conseguidos en nutrición o manejo, debe tenerse en cuenta que, a diferencia de estos últimos, la ganancia genética es continua, acumulativa y permanente. Por ejemplo, HARVENSTEIN y col. (1994) compararon en 1991 los pesos medios de gallinas a la edad comercial de una línea control y otra seleccionada, fundadas ambas en 1957, en las condiciones definidas por la utilización de uno u otro de los piensos típicos consumidos en esas dos fechas. El suministro del pienso de 1991 en lugar del correspondiente a 1957 produjo un aumento de peso del 19%, mientras que la estirpe seleccionada resultó ser un 210% más pesada que el control al cabo de los 34 años transcurridos. Evidentemente, este



espectacular incremento del peso vino acompañado por algunas consecuencias indeseables, entre ellas el aumento de la mortalidad debido a la discondroplasia de la tibia, lo cual indica que cambios genéticos extremos para caracteres de interés económico pueden ocurrir enlazados a otros desfavorables referentes a los atributos relacionados con la eficacia biológica.

En acuicultura los programas de mejora genética no son abundantes, hasta el punto de que muchas empresas reponen sus reproductores mediante capturas de individuos silvestres y relegan la puesta a punto de dichos programas a etapas futuras del desarrollo de la industria. Se han ofrecido varias explicaciones no excluyentes de esta actitud injustificada. En primer lugar, se ha dicho que la mejora genética es una actividad que sólo puede llevarse a cabo con posterioridad a la aplicación de un adecuado sistema de producción que permita el control de la reproducción y del sistema de alimentación junto con el adecuado tratamiento de las enfermedades. Por el momento, estos temas absorben la mayor parte de los recursos investigadores del sector y, de hecho, posponen indebidamente la introducción de los métodos de mejora genética. En segundo lugar, muchos opinaban que los organismos acuáticos podrían ser diferentes a los animales domésticos con respecto a propiedades genéticas básicas, como la depresión consanguínea o la respuesta a la selección, creencia que hoy se ha desacreditado por completo. En tercer lugar, la irrupción de la biotecnología en la acuicultura (poliploidía, transgénicos, marcadores moleculares) con anterioridad a la puesta en marcha de los programas de mejora ha creado la falsa expectativa de que esas técnicas permitirían una fácil obtención de progreso genético sin necesidad de aplicar un esquema de mejora de corte clásico. En la actualidad, como se explica en el capítulo 4, se acepta comúnmente que los avances de la genética molecular sólo pueden rentabilizarse en el marco de un programa de mejora convencional. Por último, buena parte de los genéticos profesionales relacionados con la acuicultura han sido más proclives al estudio poblacional o molecular que al de los rasgos cuantitativos, tema que constituye el fundamento de los procedimientos de mejora genética.

Un decisivo cambio de rumbo se produjo con la puesta en funcionamiento del programa noruego de mejora de salmón, dotado de una



estructura jerárquica compuesta por un núcleo, en el que se lleva a cabo la selección, y un estrato multiplicador intermedio que suministra huevos, producidos por hijos de los individuos seleccionados en el núcleo, a las piscifactorías comerciales. Dicho núcleo se inició en 1975 y fue precedido por una comparación de la tasa de crecimiento y la edad a la madurez sexual en 40 poblaciones procedentes de otros tantos ríos, con objeto de utilizar las mejores en la formación de la población base. Cada año se evalúa en agua dulce la tasa de crecimiento y la supervivencia hasta los 10 meses (individuos de 15-20 g) en cada una de 350 familias. Hasta ese momento los peces no han alcanzado el tamaño mínimo necesario para ser marcados individualmente y, por ello, sólo se dispone de información familiar que se utiliza para seleccionar las 120 mejores familias con respecto a los caracteres mencionados. A continuación los miembros de las familias seleccionadas, una vez marcados, se transfieren al agua salada donde se mantienen en condiciones semejantes a las de producción hasta que alcanzan el tamaño comercial. A partir de aquí comienza una segunda fase selectiva siguiendo un criterio que incluye información individual y familiar referente a la tasa de crecimiento, edad a la madurez sexual y mortalidad. Los individuos seleccionados se aparean de acuerdo con un criterio que implica la obtención de descendencia con consanguinidad mínima. El núcleo no es capaz de producir los 40.000 l de huevos/año necesarios para abastecer las piscifactorías comerciales y esta función la cumplen piscifactorías multiplicadoras que parten de individuos de unos dos años, hijos de los seleccionados en el núcleo. Estas últimas obtienen su beneficio comercial de la venta de huevos y alevines mientras que el de las explotaciones comerciales procede de la venta de peces para el sacrificio que se exportan en un 90%. El intervalo entre generaciones es de cuatro años.

En este capítulo trataremos de establecer los principios generales que deben observarse en el diseño y ejecución de un programa de mejora de los rasgos productivos de organismos acuáticos, a la luz de las consideraciones teóricas desarrolladas en el capítulo 4 y teniendo en cuenta la secuencia de etapas impuesta por la lógica del sistema. La primera de estas obliga a definir el objetivo de mejora en el contexto de un determinado esquema de producción. La segunda implica



la evaluación del mérito genético de las poblaciones disponibles para poder elegir las mejores y, en su caso, proponer un sistema de cruza-mientos que permita beneficiarse de la heterosis o la complementariedad entre poblaciones. La tercera consiste en desarrollar un sistema de evaluación y selección para la mejora del objetivo genético-económico propuesto en la población o poblaciones elegidas. La última etapa examina la transmisión del progreso genético obtenido en el núcleo mejorado a las poblaciones comerciales, de forma que se amorticen los costes de la mejora.

2. OBJETIVO DE UN PROGRAMA DE MEJORA

El objetivo de un programa de mejora es el incremento simultáneo de varios caracteres de interés, ponderando cada uno de ellos por su respectivo valor económico. Estos valores representan las ganancias deseadas para dichos caracteres, entre los que se incluyen tanto los que influyen sobre el beneficio comercial como los que determinan el coste de producción, así como aquellos otros que condicionan las preferencias del consumidor e, incluso, el bienestar animal. En acuicultura, suelen tenerse en cuenta el crecimiento y el tamaño corporal, la edad a la madurez sexual, la resistencia a enfermedades, la calidad de la carne y el índice de conversión de alimento en peso.

La experiencia previamente obtenida en la mejora de las especies domésticas tradicionales ha puesto de manifiesto la existencia de un conjunto de problemas que, más pronto o más tarde, aparecerán también en la acuicultura (NEWMAN y PONZONI, 1994). En primer lugar, los intereses de los productores de huevos y alevines, de los productores comerciales y de los consumidores, no siempre coinciden. En segundo lugar, los precios de las estirpes comerciales pueden ser desproporcionados con respecto a su verdadero valor, debido a distorsiones del mercado o bien a una fama injustificada. En tercer lugar, distintos profesionales entienden el objetivo de mejora de forma diferente. En general, los genéticos y economistas lo definen como un agregado de valores mejorantes para varios caracteres ponderados por sus respectivos valores económicos, mientras que los productores prefieren inter-



pretarlo como una combinación de ganancias deseadas para diversos atributos. Por último, a medida de que un programa de mejora va teniendo éxito, algunos rasgos, normalmente ligados a los caracteres de crecimiento, alcanzan un valor óptimo mientras que otros, como los relacionados con la reproducción, resistencia a enfermedades o calidad de la carne, aumentan de valor.

3. ELECCIÓN DE LA POBLACIÓN BASE Y DEL SISTEMA DE CRUZAMIENTO

3.1. Elección de la población base

En general, una especie no se reduce a una población única sino que se compone de varias que difieren genéticamente entre sí como consecuencia de la adaptación a distintos medios ecológicos o diferentes condiciones de cultivo, como resultado del proceso de domesticación, por efecto de la deriva genética, o bien como producto de la selección llevada a cabo con objetivos distintos. La elección de una población base adecuada es un aspecto importante a tener en cuenta cuando se inicia un programa de mejora, y en su formación deben intervenir las mejores estirpes con objeto de aumentar la probabilidad de obtener el máximo progreso genético. Esta operación precisa del conocimiento previo de las características productivas de cada una de las estirpes fundadoras potenciales, información generalmente disponible en las especies domésticas tradicionales con la excepción de las nativas de países en vías de desarrollo. Sin embargo, éste no suele ser el caso de las especies utilizadas en acuicultura, aunque el recurso a dicha información es comúnmente indispensable si uno quiere librarse de una excesiva subjetividad.

El diseño de esquemas de evaluación de diferencias entre poblaciones con respecto a caracteres productivos presenta más problemas de lo que pudiera parecer a primera vista, tratándose de una operación costosa por la inversión que precisa el mantenimiento de un elevado número de animales en unas condiciones prefijadas durante largos periodos de tiempo. El requisito básico consiste en valorar el conjunto de las poblaciones objeto de estudio en un medio común, eliminando



además todos los efectos ambientales sobre los atributos de interés previos a la entrada de los individuos en la prueba. Por ejemplo, si nos referimos al peso a una determinada edad, debe evitarse que pequeñas diferencias iniciales entre estirpes, ampliadas por el efecto de la competición, puedan convertirse en las principales responsables de las diferencias finales en productividad.

El número mínimo de observaciones necesarias con respecto a un determinado atributo depende del objetivo deseado, sea éste el contraste de la hipótesis de inexistencia de diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas, o bien la identificación de la mejor de éstas, especificando de antemano el nivel probabilístico deseado en cada caso. En general, el procedimiento más sencillo consiste en fijar un valor aceptable del error típico de la media previamente al desarrollo de la prueba. Si cada estirpe está representada por s familias compuestas cada una de ellas por n hermanos, el error típico $ET(\bar{x})$ de la media de un carácter con heredabilidad h^2 y varianza fenotípica V_p se calcula mediante la expresión:

$$ET(\bar{x}) = \sqrt{\frac{[h^2(n-1) + 2]V_p}{2sn}}$$

Por ejemplo, si un carácter tiene un coeficiente de variación de 0,30 y una heredabilidad de 0.40, se necesitarán al menos 50 familias de 20 individuos cada una para que el error típico sea igual a 0,02. En este orden de cosas, es mucho más importante incrementar el número de familias que el de individuos por familia puesto que, si el total de individuos evaluados (sn) no es muy pequeño, dicho error típico viene aproximadamente dado por $\sqrt{h^2 V_p / 2s}$. Si esto no fuera así, la prueba quedaría reducida a una valoración de la descendencia de un corto número de padres que sería poco representativa de las propiedades genéticas de las poblaciones consideradas.

En una misma especie suelen encontrarse diferencias considerables entre distintas estirpes domésticas y también entre éstas y las silvestres. Los peces de líneas domésticas crecen normalmente más deprisa, sus tasas de supervivencia son mayores y muestran un comportamiento menos nervioso en el medio de cultivo. LÓPEZ-FANJUL y TORO (1989) han revisado algunos estudios de comparación entre estirpes,



por ejemplo, el catálogo de la «Federal and State Fishery Agency» de los Estados Unidos, donde se describen 143 estirpes de trucha arco iris, 43 de salvelino, 42 de trucha común, 39 de trucha de Clark y 26 de trucha lacustre americana, en lo referente a viabilidad, tasa de crecimiento, índice de conversión, facilidad de manejo y resistencia a distintas enfermedades. Los datos proporcionados por ese catálogo son meramente indicativos y deben utilizarse con precaución, ya que no siempre son extrapolables a sistemas de manejo diferentes, especialmente cuando se consideran cultivos «intensivos» y «extensivos». En los primeros el objetivo es alcanzar la máxima producción en un medio controlado durante toda la vida útil del animal, mientras que en los segundos sólo la primera fase del ciclo vital tiene lugar en condiciones controladas y los individuos se trasladan posteriormente a ambientes naturales o cuasinaturales. Por su parte, MORKRAMER y col. (1985) han llevado a cabo comparaciones del crecimiento, fecundidad y calidad de la canal en 17 poblaciones comerciales de trucha arco iris criadas en una misma estación experimental. La viabilidad osciló entre el 41% y el 91%, la mejor población y la peor diferían en 86 g para un peso medio global de 230 g, y también se encontraron diferencias significativas con respecto a distintas características de la calidad de la canal. Lamentablemente, aunque el número total de peces evaluados fue elevado (unos 20.000) el número medio de familias por población fue del orden de ocho, por lo que los resultados expuestos no pueden considerarse representativos de las estirpes en cuestión.

Un tema a investigar en relación con la comparación de estirpes es la posible presencia de interacción genotipo x medio. Si la comparación se lleva a cabo en tanques separados para cada estirpe, el efecto «tanque» se confunde con el correspondiente a las diferencias genéticas entre estirpes. Por el contrario, si la comparación se hace en tanques comunales en los que todas las estirpes están representadas, debe descartarse previamente la existencia de una interacción genotipo x medio que haga que la mejor estirpe en cultivo mixto no lo sea en cultivo individual.

Además de la elección de las mejores estirpes es importante garantizar que la población base posee una amplia variabilidad genética. La mejor forma de asegurarlo reside en la utilización de una pobla-



ción sintética formada por cruzamientos entre las mejores estirpes disponibles y mantenida a continuación en estirpe cerrada. Los tres programas de mejora más importantes de organismos acuáticos se iniciaron de esta manera. El plan noruego de mejora del salmón atlántico comenzó con la valoración de muestras de peces procedentes de 40 ríos, el filipino GIFT de tilapia partió de un cruzamiento de ocho estirpes distintas y el hindú de carpa rohu también se inició cruzando seis estirpes (GJEDREM 2005).

En ocasiones se ha intentado inferir relaciones genéticas entre caracteres a partir de la correlación estadística entre sus valores medios en distintas poblaciones. Sin embargo, para que estas correlaciones sean válidas debe aceptarse que ninguno de los caracteres considerados ha sido objeto de selección y, además, que la eficacia biológica, sobre la que actúa la selección natural, no está correlacionada con los atributos estudiados. Estos supuestos son poco realistas y, como es bien sabido, en los mamíferos la correlación entre tamaño corporal y tasa reproductora es negativa cuando se consideran conjuntamente varias especies, pero se convierte en positiva en cada una de ellas por separado.

3.2. Elección del sistema de cruzamiento

Para averiguar si un determinado sistema de cruzamiento ha de utilizarse en un programa de mejora deben evaluarse previamente los distintos cruzamientos entre las diferentes estirpes disponibles con respecto a los rasgos económicos de interés. En cada caso, la heterosis o vigor híbrido se define como la diferencia entre las medias del carácter en la progenie cruzada y sus dos líneas parentales. Heterosis y depresión consanguínea son la cara y la cruz de una misma moneda y, para que se manifiesten es necesario que las líneas parentales difieran en frecuencia génica en los loci pertinentes y, además, que estos muestren dominancia direccional, es decir, que los alelos favorables a la expresión del carácter sean preferentemente dominantes con respecto a los desfavorables. Los cruzamientos orientados al aprovechamiento de la heterosis sólo deben llevarse a cabo si la magnitud de la varianza genética no aditiva (en particular la dominante) es importante, ya que su utilización incrementa considerablemente el coste del programa al



requerir de instalaciones adicionales para mantener las dos estirpes parentales por separado así como para producir los animales cruzados en cada generación. En rigor, si partimos de un conjunto de líneas con coeficiente de consanguinidad F derivadas todas ellas del mismo origen, y consideramos un carácter con varianzas aditiva V_A y dominante V_D en la población base, la varianza de las medias de ese carácter en los distintos cruzamientos entre parejas de líneas viene dada por $FV_A + F^2V_D$. Esta expresión indica que el grado de consanguinidad necesario para aprovechar eficientemente la varianza debida a dominancia debe ser alto y, para alcanzarlo, se precisan varias generaciones de consanguinidad, tiempo que podría haberse invertido en practicar selección. Supongamos, por ejemplo, que tras seis generaciones de consanguinidad hermano x hermana ($F=0,734$) y una generación de cruzamientos podemos elegir el mejor híbrido de 40, lo que supone una intensidad de selección $i = 2,34$ y, por tanto, la obtención de un progreso genético igual a $2,34 \sqrt{0,734V_A + 0,359V_D}$ al cabo de ese periodo. Por otra parte, podríamos haber llevado a cabo selección individual durante las mismas generaciones y, para una intensidad $i = 1,4$, se obtendría una ganancia final de $9,8h \sqrt{V_A}$, siendo h^2 la heredabilidad del carácter. En esta situación, el programa de consanguinidad y cruzamientos será más efectivo que el de selección si $V_D > (32,54 h^2 - 1,36) V_A$, lo cual sólo ocurrirá si dicha heredabilidad es muy baja y la varianza dominante muy alta, condiciones que son difíciles de cumplir a la vista de la información empírica pertinente.

Suele pensarse que el único propósito de los cruzamientos industriales es el aprovechamiento del vigor híbrido, pero a veces se pueden obtener ganancias debido a la complementariedad existente entre las dos estirpes parentales utilizadas en el sistema de producción, incluso cuando los caracteres de interés muestran acción génica aditiva. Consideremos, por ejemplo, dos líneas, una de ellas con buena tasa de crecimiento pero poco fecunda (A) y otra de crecimiento más lento aunque más prolífica (B). Un sistema basado en el cruzamiento de machos A con hembras B puede ser beneficioso, en el sentido de que el número de hijos dependerá enteramente de la constitución genética de la estirpe B mientras que el crecimiento de estos será intermedio.



LÓPEZ-FANJUL y TORO (1989) y FJALESTAD (2005) han revisado los experimentos de cruzamientos en salmónidos, carpa, tilapia, pez gato y dorada, concluyendo que en conjunto, aunque los resultados son variables, el comportamiento de los híbridos ha resultado similar al promedio de las líneas parentales o inferior a la mejor de éstas. Los cruzamientos entre líneas derivadas recientemente de una misma población base o bien entre poblaciones silvestres de distinta procedencia geográfica, han manifestado comúnmente una menor heterosis que la detectada al cruzar estirpes de origen más antiguo especialmente las de carpas, especie cuya domesticación comenzó en Europa hace aproximadamente un milenio y bastante antes en China. En este último caso cabe esperar un mayor grado de diferenciación genética, debido a la acción conjunta y acumulativa de la selección artificial y la deriva a lo largo de prolongados periodos de tiempo. Quizás por esta razón, los cruzamientos siguen utilizándose en programas de mejora de carpas en Hungría, Rusia e Israel.

En ciertas ocasiones se han conseguido híbridos interespecíficos pero muy pocos han sido evaluados desde el punto de vista comercial. En salmónidos raramente se ha encontrado que estos híbridos presenten ventajas, debido probablemente a su elevada mortalidad. En tilapia se utilizan comercialmente, pero su objetivo principal es producir poblaciones monosexuales de machos que están libres de las pérdidas económicas ocasionadas por las hembras que llegan a la madurez sexual mucho antes de alcanzar el tamaño comercial adecuado. En algunos países existen limitaciones legales a la utilización de híbridos interespecíficos por su posible impacto ecológico y, por otra parte, el poco común aspecto externo de algunos de ellos, por ejemplo los de platija x lenguado o rodaballo x rémol, provoca un cierto rechazo del mercado.

4. DESARROLLO DEL SISTEMA DE EVALUACIÓN Y SELECCIÓN

4.1. Experimentos de selección en peces y moluscos

La predicciones teóricas de la respuesta a la selección artificial a corto plazo han sido convincentemente verificadas en numerosas ocasiones, mediante técnicas de simulación en ordenador o bien de



experimentación piloto utilizando especies de laboratorio como *Drosophila*, *Tribolium* o ratones. Aquellos otros experimentos de selección en los que el organismo objeto de estudio es un pez o un molusco, no tienen como objetivo básico la comprobación de la teoría pertinente sino la de proporcionar confianza en que el procedimiento seguido en estas especies menos conocidas producirá resultados satisfactorios, semejantes a los que se obtienen en los programas de mejora de los caracteres económicos en los animales domésticos tradicionales.

No obstante, los primeros experimentos de selección en peces y moluscos que se llevaron a cabo durante el periodo 1970-1990 proporcionaron datos que podrían justificar un cierto escepticismo, llegándose incluso a aventurar que la selección artificial no era una técnica adecuada para la mejora de esos grupos biológicos. Esta afirmación es, como veremos a continuación, totalmente gratuita, pero reflejaba la escasa calidad de un conjunto heterogéneo de resultados conseguidos en condiciones precarias en lo que respecta al control del ciclo biológico de los organismos en cuestión, particularmente en las fases en que se valoraban los caracteres seleccionados o en la de reproducción. Por otra parte, el análisis genético de los caracteres cuantitativos de interés económico y la predicción de las consecuencias de la selección artificial sólo pueden llevarse a cabo en medios cuya homogeneidad espacio-temporal sea grande, y el incumplimiento de esta condición es capaz de inducir la aparición de importantes interacciones genotipo x medio que, en muchas ocasiones, obstaculizaron la interpretación de los datos. Fruto de una comprensible pero indeseable improvisación metodológica fue que, en ciertos casos, se recurriera a procedimientos de selección ineficientes o inapropiados, o que la respuesta no se estimara como desviación de un control que permitiera la eliminación de tendencias ambientales. En otras ocasiones se partió de poblaciones base con un alto grado de consanguinidad cuya variabilidad genética para el carácter seleccionado era escasa o nula, o bien se utilizaron otras recientemente recolectadas en el medio natural, de manera que los cambios en media atribuibles a la selección y la domesticación se confundían (véase revisión por LÓPEZ-FANJUL y TORO 1990).

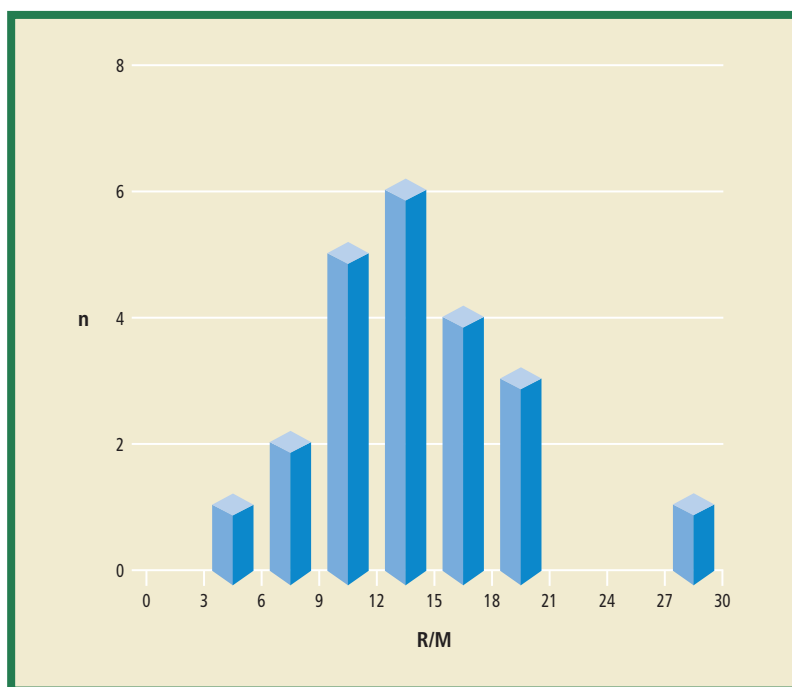
En la actualidad, las dudas que hubieran podido suscitarse con respecto a la validez de la selección artificial como procedimiento principal



para la mejora de caracteres productivos en peces y moluscos se han desvanecido totalmente. Por ejemplo, en una revisión muy completa publicada recientemente por GJEDREM y THODESEN (2005), se dan las respuestas a la selección R para tasa de crecimiento expresadas como porcentaje de aumento de la media M por generación en seis especies de peces (salmónidos, ciprínidos, tilapia y pez gato), otras tantas de moluscos (ostras, almejas y vieiras) y dos de langostinos. Estos resultados se presentan en la Figura 1. El método de selección seguido fue generalmente el individual o masal (en unos dos tercios de los trabajos analizados), o bien otras modalidades que utilizaban, más o menos eficientemente, información familiar en programas de selección familiar, intrafamiliar o combinada. La proporción de individuos seleccionados,

FIGURA 1.

Respuesta a la selección por generación para tasa de crecimiento en peces, moluscos y crustáceos (n = número de experimentos), expresada como porcentaje de la media (R/M).



Datos tomados de Gjedrem y Thodesen (2005).



en aquellos trabajos donde se menciona este dato, osciló entre el 5% y el 17% con un valor medio del 11%, correspondiente a una intensidad de selección $i = 1,71$. Por otra parte, el coeficiente de variación fenotípico CV_p y la heredabilidad h^2 del carácter presentan ambos valores promedio del orden de 0,30 (veáanse Tablas 1 y 2 del capítulo 4). En estas condiciones podría admitirse una aproximación consistente en comparar la respuesta esperada a la selección individual relativa a la media, que viene dada por $R/M = i h^2 CV_p = 1,71 \times 0,3 \times 0,3 = 15\%$, con las respuestas observadas que oscilan entre el 9% y el 20% con un valor medio del 14% que es prácticamente igual al predicho. Aunque el alcance de esta comparación es puramente ilustrativo, parece suficiente para apoyar sin vacilaciones la eficacia de la selección como procedimiento de mejora.

4.2. Experimentos de consanguinidad en organismos acuáticos

Se han publicado varios estudios en los que se ha tratado de cuantificar el efecto de la consanguinidad sobre caracteres productivos y reproductivos en trucha arco iris. KINCAID (1976, 1983) detectó tras una, dos o tres generaciones de apareamientos hermano \times hermana ($F = 0,25$, $0,375$ y $0,5$, respectivamente), depresión consanguínea en los caracteres relacionados con la tasa de crecimiento y la reproducción, tanto en piscifactoría como en condiciones naturales. Un resumen de los resultados obtenidos se presenta en la Tabla 1. Siguiendo un diseño experimental similar, GJERDE y col. (1983) encontraron las depresiones resumidas en la Tabla 2. En líneas generales se observó una depresión moderada tanto para caracteres reproductivos como de crecimiento que, en la mayoría de los casos, aumentó al incrementarse el coeficiente de consanguinidad. Por otra parte, los datos de una reciente revisión publicada por FJALESTAD (2005) indican una coherente depresión del peso en carpas, ostras y tres especies de salmónidos, del orden del 6% de la media por 10% de incremento del coeficiente de consanguinidad (Tabla 3). Puede afirmarse, pues, que la consanguinidad inducida deliberadamente en peces y moluscos produce depresión consanguínea, tanto para los atributos ligados a la eficacia biológica como para los caracteres de crecimiento, aunque existan problemas



TABLA 1.

Efecto de la consanguinidad en trucha arco iris para distintos caracteres y diferentes valores del coeficiente de consanguinidad F (% depresión).

Carácter	$F = 0.25$	$F = 0.375$
% deformidades de la freza	-37,6	-191,5
Supervivencia de la freza a los 147 días	5,6	14,9
Índice de conversión	14,6	29,7
Peso a los 147 días	6,0	13,4
Peso a los 365 días	23,2	33,5
Número de peces de un año	17,4	47,9
Peso total de peces al año	36,6	65,4
	$F = 0.25$	$F = 0.50$
Viabilidad de los huevos	17,2	-0,2
Supervivencia de la freza a los 84 días	5,8	0,4
Índice de conversión	-6,7	-5,0
Peso a los 147 días	0,0	16,0
Peso a los 364 días	25,0	41,7
Peso de los machos a los 2 años	26,2	32,2
Peso de hembras a los 2 años	18,0	38,1
Peso de huevos	18,1	33,9

Fuente: KINCAID (1976) y KINCAID (1983).

TABLA 2.

Efecto de la consanguinidad en trucha arco iris para distintos caracteres y diferentes valores del coeficiente de consanguinidad F (% depresión).

Carácter	$F = 0,25$	$F = 0,375$	$F = 0,50$
Supervivencia de huevos	9,4	16,2	6,0
Supervivencia de alevines	2,8	8,4	5,0
Supervivencia de la freza	11,2	7,7	25,6
Peso de alevines a 160 días	9,8	22,5	-4,0
Peso de adultos tras 18 meses en el mar	11,3	19,9	30,5

Fuente: GJERDE y col. (1983) con modificaciones.

metodológicos para su correcta estimación. En primer lugar, el número de familias evaluado en los experimentos referidos ha sido muy pequeño, lo que ha llevado consigo que las correspondientes medias



estuvieran asociadas a errores típicos considerables y, por tanto, que sólo se detectara una depresión estadísticamente significativa en aquellos caracteres en los que ésta fue grande, pasando inadvertida en el resto. En segundo lugar, en una situación de competición el crecimiento está inversamente relacionado con el número de individuos por tanque, por lo que la posible depresión de la supervivencia podría enmascarar la del crecimiento. Estas consideraciones ponen de manifiesto la necesidad de obtener estimas más precisas de la depresión consanguínea de los caracteres de interés en los programas de mejora de peces o moluscos.

TABLA 3.

Depresión consanguínea del peso (% reducción de la media)
por 10% de aumento del coeficiente de consanguinidad.

Especie	Trucha arco iris	Salvelino	Coho	Carpa	Ostra	Promedio
Depresión	6	10	3	6	4	6

Fuente: datos recopilados por FJALESTAD (2005) con modificaciones.

Es preciso tener muy en cuenta que la alta fecundidad de los organismos acuáticos permite utilizar muy pocos individuos como reproductores, en otras palabras los correspondientes censos afectivos serán muy pequeños y, en consecuencia, tanto el peligro de pérdida de variabilidad genética como la posible depresión consanguínea son grandes. Por ejemplo, SBORDONI y col. (1987) estimaron la heterocigosis en 20 loci enzimáticos a lo largo de las primeras siete generaciones que transcurrieron desde la introducción en Italia del langostino *Penaeus japonica*, encontrando una drástica reducción de un 60% al final del proceso. Aceptando la hipótesis de que este cambio se debió únicamente a una reducción del censo efectivo (supuesto simplista puesto que además se practicó selección inconsciente para puesta temprana), dicho censo es aproximadamente cuatro ($N_e = 4$) a pesar de que el número de reproductores potenciales fuera cercano a 600. Este aumento de consanguinidad se ha visto acompañado por una reducción progresiva de la viabilidad que disminuyó desde el 50% hasta el 10% en el mismo intervalo de tiempo. En un estudio más reciente CAMERON BROWN y col. (2005) estimaron el censo efectivo a



partir del parentesco de la descendencia de grupos de 49-58 reproductores en dorada que resultó ser 14-18, lo que implicaría una tasa de consanguinidad del orden del 2,7-3,5% por generación.

4.3. Sistemas de evaluación y selección en programas de mejora

La puesta en marcha de un programa de selección consiste básicamente en utilizar como reproductores solamente a aquellos animales cuyo valor mejorante es mayor. Con respecto a un determinado carácter, este valor puede estimarse de varias formas. En primer lugar, puede utilizarse únicamente la información fenotípica individual y, en este caso, el procedimiento de selección sería el denominado individual o masal que es fácil de aplicar y ofrece la ventaja de que los individuos pertenecientes a diferentes familias pueden criarse conjuntamente en un mismo tanque desde el estado de huevo. Sin embargo, el método antedicho también presenta limitaciones y, por una parte, sólo puede aplicarse a caracteres que puedan medirse en animales vivos y, por otra, no permite controlar totalmente la tasa de consanguinidad, ya que sólo puede fijarse el número de reproductores pero no la contribución de cada pareja a la descendencia. En segundo lugar, el valor mejorante también puede estimarse a partir de información familiar (selección familiar), o bien combinando la individual y la familiar (selección combinada). En el apartado 3.5 del capítulo 4 se han analizado las consecuencias de estos métodos de selección con objeto de establecer el marco teórico del problema.

En la práctica, la forma óptima de evaluación es la llamada BLUP-Modelo Animal, desarrollada inicialmente por HENDERSON (1948) para el vacuno lechero pero rutinariamente utilizada en la actualidad en vacuno, porcino, caballos, gallinas y, más recientemente, en peces. El procedimiento BLUP («óptima predicción lineal insesgada») es una generalización de los índices de selección que estima los efectos fijos y los valores mejorantes simultáneamente. Esta metodología (y la metodología REML que se le asocia para estimar parámetros genéticos) ofrece grandes ventajas por lo que su utilización ha tenido un gran impacto en los modernos programas de mejora. En primer lugar, permite corregir adecuadamente los efectos sistemáticos (tanque, edad, etc.), de forma



que pueden compararse animales procedentes de distintos tanques, criados bajo diferentes sistemas de manejo, o que difieren en edad. También pueden compararse animales en el caso de que no se disponga de la misma información para cada uno de ellos (cuando cuentan con distinto número de parientes) o que han estado sometidos a distintas presiones selectivas, siempre y cuando estos efectos sistemáticos estén conectados a través de la matriz de parentesco. En segundo lugar, todos los individuos son evaluados genéticamente de forma simultánea, utilizándose en cada caso la información proporcionada por todos los parientes que se hayan registrado en el programa desde su inicio hasta la generación más reciente. En tercer lugar, la separación entre los efectos genéticos y ambientales hace posible la estima del progreso genético obtenido a lo largo del tiempo. Por último, el conocimiento de las genealogías nos capacita para utilizar métodos de control de la consanguinidad siguiendo alguno de los esquemas que describiremos más adelante.

La aplicación de la metodología BLUP precisa de información genealógica y, por tanto, requiere una identificación individual o familiar. Si los peces se mantienen en tanques comunales dicha identificación puede hacerse mediante marcación física, pero este método es costoso y, por ello, suele estar limitado a un reducido número de descendientes. Además, los alevines son de tamaño muy pequeño y no pueden marcarse, lo cual obliga a que cada familia se críe en un tanque distinto hasta que sus miembros alcanzan un tamaño lo suficientemente grande para permitir que sean marcados individualmente. Esta precisión introduce efectos ambientales comunes a todos los miembros de una familia, aunque la confusión entre los efectos «tanque» y «familia» podría evitarse replicando familias sin marcar en distintos tanques, a expensas de un incremento del coste de mantenimiento. Obviamente, si no fuera posible corregir el efecto de ambiente común familiar sólo quedaría abierta la opción de practicar selección intrafamiliar que, como se ha visto, presenta la ventaja de facilitar el control de la consanguinidad pero resulta en una respuesta inferior a la que cabría lograr mediante procedimientos de selección más precisos si se dispusiera de las instalaciones adecuadas.

En este contexto, la identificación de grupos familiares mediante marcadores moleculares es muy prometedora. Esta tecnología permite



que peces de distintas familias puedan criarse conjuntamente en un mismo tanque desde el estado de huevo, lo que permite valorar más familias y, por tanto, aumentar la intensidad de selección. A la hora de incluir este tipo de marcación en un programa de mejora debe considerarse tanto el incremento de la eficiencia del proceso selectivo como el coste adicional correspondiente, aunque actualmente dicho precio está abaratándose. Sin embargo, la carencia de una etiqueta física hace necesaria una nueva marcación molecular cada vez que se evalúan los peces, a no ser que estos se marquen físicamente tras la primera asignación familiar por métodos moleculares. Sin lugar a dudas, los aspectos de reconstrucción genealógica mediante marcadores son importantes y se tratan en detalle en el capítulo 7.

5. CONTROL DE LA CONSANGUINIDAD EN PROGRAMAS DE MEJORA

Uno de los problemas que plantea la evaluación mediante la metodología BLUP es que, por incluir información referente a todos los parientes, induce mayores tasas de consanguinidad que la selección basada únicamente en información fenotípica individual. En los últimos años se han desarrollado métodos que permiten optimizar simultáneamente la ganancia genética y la pérdida de ésta por consanguinidad, cuyo fin es reducir la tasa de consanguinidad conservando la misma ganancia o bien incrementar la respuesta manteniendo una restricción de la consanguinidad a niveles tolerables.

De acuerdo con TORO y PÉREZ-ENCISO (1990) y TORO y LÓPEZ-FANJUL (1998), el control de la tasa de consanguinidad puede lograrse actuando a tres niveles sobre: 1) el número de individuos seleccionados y su contribución de descendencia a la siguiente generación, 2) el criterio de selección utilizado, y 3) el sistema de apareamiento impuesto. En lo que sigue no pretendemos elaborar una revisión completa de todas las posibilidades sino centrarnos en aquellas que pueden aplicarse más fácilmente en acuicultura.

El primer tipo de acción engloba las estrategias que tratan de optimizar el número de machos seleccionados para hacer máxima la ganancia genética restringiendo la tasa de consanguinidad. GJERDE y



col. (1996) expusieron una aplicación de estos procedimientos a un programa de selección masal en peces durante 15 generaciones. Para unos valores fijos del total de individuos evaluados T y del número d de hembras apareadas por macho, así como para una determinada heredabilidad h^2 del carácter de interés, se calculó mediante simulación estocástica el número de machos s que deben seleccionarse para obtener la máxima respuesta genética posible manteniendo la tasa de consanguinidad a un determinado nivel. Por ejemplo, si se pretende que el aumento del coeficiente de consanguinidad por generación no exceda el 2%, para $d = 2$ y $h^2 = 0.2$ se obtuvo $s = 16$ para $T = 1800$ o $s = 21$ para $T = 9600$. Si la restricción de la tasa de consanguinidad fuera más exigente, por ejemplo que no se superara el 0.25%, el número de machos seleccionados sería considerablemente mayor que el propuesto en la situación anterior, $s = 103$ o 155 , respectivamente. Los marcadores moleculares pueden también utilizarse para controlar la consanguinidad en programas de selección masal practicando lo que denomina «walk-back selection» (DOYLE y HERBINGER, 1994), procedimiento que ha adquirido cierta popularidad en esquemas de selección modestos basados en un único tanque, cuyo objetivo es mejorar un sólo carácter que se mide individualmente, por ejemplo el peso corporal. Primeramente se selecciona el individuo con mayor valor fenotípico. A continuación se marca el individuo que le sigue en valor, que es a su vez seleccionado si no es hermano ni medio hermano del anterior, o es rechazado en caso contrario. El proceso continua hasta que se obtenga el número previsto de reproductores.

En el mismo grupo de medidas se incluyen las estrategias que modifican la contribución de los individuos seleccionados en una generación a los seleccionados en la siguiente, procedimiento asimilable a la selección intrafamiliar con respecto al valor fenotípico individual o a la evaluación BLUP. Como se expone en el capítulo 4, la selección intrafamiliar clásica implica que la varianza de las contribuciones familiares de descendencia sea nula y, por tanto, el censo efectivo se duplica, mientras que con selección familiar ocurre lo contrario. No hay que perder de vista, sin embargo, que entre ambos extremos existe un amplio abanico de métodos de selección que difieren unos de otros en la magnitud de la varianza de las contribuciones familiares. En todas



estas posibilidades dicha contribución obedece a una distribución multihipergeométrica, similar a la que se da en el clásico ejercicio probabilístico de repartir k bolas (individuos seleccionados) en k cajas (familias) cada una de ellas con una capacidad máxima de n bolas. Si consideramos que el valor mejorante de un individuo tiene un componente familiar b_i y una desviación intrafamiliar w_{ij} , y si p_i es la proporción seleccionada e $i(w_i)$ la intensidad de selección familiar, la ganancia genética esperada R y el censo efectivo N_e serán, aproximadamente:

$$R = \sum p_i b_i + \sum p_i i(w_i), \quad N_e = 1 / \sum p_i^2.$$

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos para dos esquemas de selección (FERNÁNDEZ y col. 2004). En el primero (H) se seleccionan 25 machos y 25 hembras para producir los 2500 candidatos de la siguiente generación (100 por familia); en el segundo (MH) se seleccionan 10 machos y 50 hembras para conseguir el mismo número de

TABLA 4.

Mérito genético y parentesco de los individuos seleccionados mediante selección combinada o selección intrafamiliar modificada (h^2 y c^2 son, respectivamente, los valores de la heredabilidad y de la fracción de la varianza fenotípica debida a efectos ambientales comunes a los miembros de las familias).

			Selección combinada		Selección intrafamiliar modificada	
	h^2	c^2	Mérito Genético	Parentesco	Mérito Genético	Parentesco
Familias de hermanos (H)	0.10	0.00	4.46	0.18	3.77	0.05
		0.05	3.51	0.17	2.87	0.04
		0.10	3.09	0.15	2.52	0.03
	0.25	0.00	8.07	0.15	7.45	0.06
		0.05	7.21	0.14	6.64	0.05
		0.10	6.65	0.13	6.14	0.04
Diseño jerárquico (MH)	0.10	0.00	4.16	0.14	3.78	0.06
		0.05	3.42	0.13	3.02	0.05
		0.10	3.13	0.13	2.72	0.05
	0.25	0.00	7.57	0.13	7.41	0.08
		0.05	6.92	0.12	6.63	0.07
		0.10	6.55	0.11	6.27	0.06

Fuente: FERNÁNDEZ y col. (2004).



candidatos (50 por familia). A partir de la tabla pueden compararse el valor mejorante y el parentesco promedio de los individuos seleccionados cuando se utiliza selección combinada o bien una de las posibles modalidades de selección intrafamiliar. En ambos casos la evaluación se lleva a cabo utilizando tanto la información individual como la familiar. El hecho de que la relación entre la respuesta y el parentesco no sea lineal indica que, desde un punto de vista práctico, puede ser atractiva la búsqueda de una solución que mantenga una respuesta aceptable sin generar excesiva consanguinidad. En la tabla se dan distintas soluciones, por ejemplo, aquellas en las que una disminución de la respuesta del 2-18% va acompañada de una disminución del parentesco del 38-80%.

También es posible modificar la contribución de los individuos seleccionados en una generación a los evaluados en la siguiente, en vez de a los seleccionados como ocurría en la situación anterior, mediante el procedimiento de selección ponderada (TORO y NIETO 1984). En la clásica selección por truncamiento se escogen los N individuos de cada sexo con mayor valor mejorante y cada pareja contribuye el mismo número de hijos al grupo evaluado (c_i constante), mientras que en la selección ponderada se elige un mayor número de parejas (N') pero cada una de éstas aporta un número distinto de hijos, manteniéndose el mismo diferencial de selección y, por tanto, la misma respuesta. De todos los posibles valores de N' y c_i deben elegirse aquellos que hagan máximo el censo efectivo sin disminuir la respuesta. Este objetivo puede lograrse mediante técnicas de programación matemática o de optimización estocástica. Como veremos posteriormente, este procedimiento suele incluirse en los programas de mejora de muchas especies, incluidas las acuáticas.

El segundo grupo de acciones propone la utilización de un índice de selección modificado por la inclusión de una ponderación subóptima de la información familiar que, como se ha indicado, es la responsable del aumento de la consanguinidad en la selección combinada o BLUP. La forma más sencilla de lograrlo es considerar un valor de la heredabilidad mayor que el verdadero. Aplicando esta idea tan sencilla se puede reducir la tasa de consanguinidad en un 30% a expensas de una pequeña disminución de la ganancia genética. Un



procedimiento más elegante consiste en optimizar simultáneamente el número de individuos seleccionados y la ponderación que debe darse a su información familiar (b), de modo que se mantenga la tasa de consanguinidad deseada. Consideremos, por ejemplo, un índice de la forma $I = P_i + bP_f$ donde P_i es el valor fenotípico del individuo y P_f el promedio de los de sus hermanos. En la Tabla 5 se da la ganancia genética y la tasa de consanguinidad para distintos valores de b y del número de parejas seleccionadas. El número de candidatos a la selección es 100 machos y 100 hembras, y la heredabilidad del carácter 0.3 (VILLANUEVA y WOOLLIAMS 1997). Puede verse que, con una adecuada planificación del esquema de selección, se puede reducir la tasa de consanguinidad en más de un 40% sin apenas disminuir la ganancia genética.

El tercer grupo de acciones se centra en la elección del sistema de apareamiento, habiéndose propuesto varios tipos: factorial, compensatorio y de mínimo parentesco (véase revisión de CABALLERO y col., 1994). A la hora de reducir la tasa de consanguinidad, es probable que los apareamientos factoriales sean más eficaces que los jerárquicos. Así, por ejemplo, en un diseño factorial completo cada macho se aparea con todas las hembras y cada hembra con todos los machos y, si cada apareamiento aporta un sólo hijo, no habrá hermanos entre los descendientes; mientras que en un sistema jerárquico cada macho se aparea con varias hembras y, aun en el caso de que cada pareja aporte

TABLA 5.

Ganancia genética y tasa de consanguinidad correspondientes a estrategias de selección combinada en las que ha modificado el número de parejas seleccionadas y la ponderación de la información familiar.

Ponderación de la información familiar	Número de parejas seleccionadas	Ganancia genética	Tasa de consanguinidad
1.66	15	0.33	3.51
1.47	18	0.33	2.52
1.33	20	0.32	2.04
1.03	30	0.27	1.00
0.76	68	0.13	0.25

Fuente: VILLANUEVA y WOOLLIAMS (1997).



un solo hijo, la descendencia es un grupo de familias de medios hermanos. Los apareamientos factoriales no son comunes en las especies domésticas tradicionales, puesto que implican un alargamiento indeseable del intervalo generacional, aunque en peces, cuya capacidad reproductiva es elevada, podrían constituir una estrategia interesante como se ha confirmado en diversos estudios de simulación. En los apareamientos compensatorios, los individuos seleccionados de cada sexo se ordenan de acuerdo con su coeficiente de parentesco promedio y los machos de mayor coeficiente se aparean correlativamente con las hembras que lo tienen menor. Este sistema induce una correlación negativa entre la deriva causada por selección y la originada por muestreo, que contrarresta parcialmente el efecto acumulativo de la primera. Por último, el sistema de apareamiento más utilizado en las especies domésticas es el que hace mínimo el parentesco promedio de los individuos que se aparean. Se trata de una versión más compleja de la clásica recomendación de evitar el apareamiento entre parientes y puede lograrse mediante técnicas de programación lineal. En esta situación, la tasa asintótica de consanguinidad se reduce con respecto a la correspondiente al apareamiento aleatorio, exceptuando el caso en que las contribuciones familiares son iguales.

Finalmente, existe una estrategia denominada selección de apareamientos que es potencialmente atractiva aunque apenas se ha utilizado. Consiste en realizar la selección y el apareamiento simultáneamente, desapareciendo así la clásica distinción entre ambas actividades. Este procedimiento permite controlar al mismo tiempo la ganancia genética y la consanguinidad pero su puesta en práctica requiere de técnicas de computación costosas.

6. TRANSMISIÓN DEL PROGRESO GENÉTICO

La última etapa del diseño de un plan de mejora es la transmisión del progreso genético obtenido en el núcleo de selección a las poblaciones comerciales. En acuicultura, dicha transmisión se ve favorecida por la gran capacidad reproductiva de las correspondientes especies, por lo que un solo núcleo puede suministrar alevines o huevos a muchas



estaciones multiplicadoras. Sin embargo, la división del núcleo en varias poblaciones conectadas o independientes puede ser recomendable por varias razones, entre ellas las de: 1) proporcionar una mayor protección frente a catástrofes, especialmente las de tipo patológico, 2) cubrir un rango más amplio de sistemas de producción, y 3) permitir la selección con objetivos distintos. En cualquier caso, el éxito final de un programa de mejora dependerá decisivamente del establecimiento de una conexión eficiente entre el núcleo y las explotaciones comerciales.

Es preciso tener en cuenta que la introducción de un estrato multiplicador en la estructura poblacional sólo está justificada cuando el núcleo no es capaz de producir el número de individuos suficiente para abastecer a las explotaciones comerciales, y que esta carencia implica un retraso temporal en la obtención de los beneficios correspondientes a la mejora obtenida en el núcleo. Por ejemplo, si las piscifactorías multiplicadoras utilizaran hijos de padres seleccionados para producir los huevos o alevines suministrados a las instalaciones de cría y engorde, los animales que se comercializan tendrían, aproximadamente, las mismas características que los componentes del núcleo en la generación anterior o, dicho en otras palabras, la obtención de ganancias económicas se difiere en una generación.

BIBLIOGRAFÍA

- CABALLERO, A., E. SANTIAGO y M. A. TORO, 1996 Systems of mating to reduce inbreeding in selected populations. *Animal Science* **62**: 431-442.
- CAMERON BROWN, R., J. A. WOOLLIAMS y B. J. McANDREW, 2005 Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture* **247**: 219-225.
- DOYLE, R. W., y C. HERBINGER, 1994 The use of DNA fingerprinting for high intensity within-family selection in fish breeding. *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* **19**: 23-27.
- FABRE TECHNOLOGY PLATFORM, 2006 *Sustainable Farm Animal Breeding and Reproduction-A vision for 2025*.
- FERNÁNDEZ, J., L. VEGA y M. A. TORO, 2004 Control de la consanguinidad en programas de selección en Acuicultura. *ITEA* **100**: 188-191.
- FJALESTAD, K. T., 2005 Breeding strategies, pp. 145-158 en GJEDREM, T., *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*, Springer, Berlín.



- GJEDREM, T., 2005 Breeding plan, pp. 251-277 en GJEDREM, T., *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*, Springer, Berlín.
- GJEDREM, T., y THODESEN, J., 2005 Selection, pp. 89-111 en GJEDREM, T., *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*, Springer, Berlín.
- GJERDE, B., H. M. GJOEN y B. VILLANUEVA, 1996 Optimum design for fish breeding programmes with constrained inbreeding. Mass selection for a normally distributed trait. *Livestock Production Science* **47**: 59-72.
- GJERDE, B., K. GUNNES y T. GJEDREM, 1983 Effect of inbreeding on survival and growth in rainbow trout. *Aquaculture* **34**: 327-332.
- HARVENSTEIN, G., P. R. FERKET, S. E. SCHEIDELER y D. V. RIVES, 1994 Carcass composition and yield of 1991 vs 1957 broilers when fed «typical» 1957 and 1991 broiler diets. *Poultry Science* **73**: 1795-1804.
- HENDERSON, C. R., 1948 *Estimation of general, specific and maternal abilities in crosses among inbred lines of swine*. Iowa State University Press, Ames.
- KINCAID, H. L., 1976 Inbreeding in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* **33**: 2420-2426.
- KINCAID, H. L., 1983 Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture* **33**: 215-227.
- LÓPEZ-FANJUL, C., y M. A. TORO, 1990 *Mejora genética de peces y moluscos*. Mundi-Prensa, Madrid.
- MORKRAMER, S., G. HORSTGEN-SCHWARK y H. J. LANGHOLZ, 1985 Comparison of different european rainbow trout populations under intensive production conditions. *Aquaculture* **44**: 303-320.
- NEWMAN, S., y R. W. PONZONI, 1994 Experience with economic weights *Proceedings of the 5th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production* **17**: 217-223.
- SBORDONI, V., G. LA ROSA, M. MATTOCCIA, M. COBOLLI SBORDONI y E. DE MATTHESI, 1987 Genetic changes in seven generations of hatchery stock of the Kuruma prawn *Panaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Proceedings of the World Symposium on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture* **1**: 144-155.
- TORO, M. A., y B. NIETO, 1984 A simple method for increasing the response to artificial selection. *Genetical Research* **69**: 145-158.
- TORO, M. A., y M. PÉREZ-ENCISO, 1990 Optimization of response under restricted inbreeding. *Genetics Selection Evolution* **22**: 93-107.



- TORO, M.A., y C. LÓPEZ-FANJUL, 1998 Recent advances in animal breeding theory and its possible application in aquaculture. *Cahiers Options Méditerranéennes* **34**: 31-45.
- VILLANUEVA, B., y J. A. WOOLLIAMS, 1997 Optimization of breeding programmes under index selection and constrained inbreeding. *Genetical Research* **69**: 145-158.

6

ANOMALÍAS MORFOLÓGICAS EN PECES CULTIVADOS: HEREDABILIDAD Y SELECCIÓN

ANOMALÍAS MORFOLÓGICAS EN PECES CULTIVADOS: HEREDABILIDAD Y SELECCIÓN

J. M. Afonso

Facultad de Veterinaria.
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

F. J. Roo

Instituto Canario de Ciencias Marinas.

Resumen

Las anomalías morfológicas son alteraciones de la morfología del pez respecto a un estándar de calidad, cuya incidencia está asociada a la intensificación del cultivo de especies de peces de interés comercial. Estas afectan a la viabilidad de las empresas por su repercusión económica directa en el momento de la venta de los peces e influencia en los rendimientos productivos. Para evitarlas, las empresas llevan a cabo, esencialmente, actuaciones de manejo, alimentación y procesos regulares de criba de los lotes de producción. Sin embargo, la intervención genética es escasa por la falta de esquemas de selección y genealogías conocidas dentro de las empresas, y consecuentemente del grado de determinación genética de las anomalías morfológicas. En este trabajo se presenta una revisión de las principales malformaciones que



afectan a los peces de cultivo (forma corporal, pigmentación, escamas y esqueleto), considerando sus causas, especialmente su grado de determinación genética y utilización en programas de mejora genética.

Abstract

The morphological malformations are modifications of fish morphology respect a standard of quality, whose incidence is associated to the culture intensification of commercialized fish species. The viability of companies is affected due to the economic influence of those on fish sale price and production level. In order to avoid the malformations, the companies carry out management, food and normalized sieve process actions on the production stocks. In these, genetic programmes and pedigrees are normally unknown and preventing the estimations of the degree of genetic determination. In this study, the most important malformations on cultured fish are presented (body shape, pigmentation, scales and skeleton), considering their environmental and genetic causes, with special emphasis on genetic determination and utility in genetic programmes.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de especies de interés comercial en acuicultura es llevado a cabo principalmente mediante la intensificación de sus cultivos (GJEDREM 1997). Sin embargo, uno de los inconvenientes de la intensificación es la aparición de anomalías morfológicas las cuales son alteraciones, normalmente irreversibles, de la morfología del pez en comparación con un estándar de calidad. En este sentido, los sistemas de cultivo intensivo producen mayores incidencias de deformidades esqueléticas severas, como son las de columna vertebral y neurocráneo, que los sistemas semi-intensivos (BOGLIONE *et al.* 2001), y que las que acontecen en poblaciones naturales (BERRA y JEAN AU 1981; HICKEY y YOUNG 1984; VAN DEN AVYLE *et al.* 1989; OFFICER *et al.* 1995; HEUPEL *et al.* 1999; BOGLIONE *et al.* 2001; MANA y KAWAMURA 2002), tanto en cuanto al tipo como a la frecuencia de la malformación (MATSUOKA 2003).

Las anomalías morfológicas constituyen un problema mayor que afecta tanto a los criaderos como a las empresas de engorde, por



comercializar sus productos esencialmente como animales enteros. Así, las empresas de cría se ven obligadas a implantar procesos de criba en sus lotes de producción, lo que añade unos costes asociados a la misma, y que suponen porcentajes variables del precio de venta del alevín, ya que de manera extendida las empresas de engorde no aceptan lotes con más de un 5% de peces deformes. En cuanto a las empresas de engorde, no sólo tienen pérdidas económicas aquellas que comercializan sus productos como animal entero, como son los casos de dorada, lubina y rodaballo, sino también la industria que comercializa sus productos una vez procesados, como es el caso de la industria salmonera, a través de los costes asociados que generan los animales con malformaciones en la cadena de procesamiento (GJERDE *et al.* 2005).

El grado en que las anomalías corporales afectan a la viabilidad de las empresas es muy variable, debido a que existe mucha variación entre y dentro de las empresas en cuanto al tipo de deformidad, la incidencia, la repercusión económica y la especie. En especies como lubina o espáridos como dorada, bocinegro y dorada roja, las malformaciones más relevantes son las que afectan al complejo opércular, neurocráneo y columna vertebral (lordosis y fusión de vértebras) (KOUMOUNDOUROS *et al.* 1997a; BOGLIONE *et al.* 2001; ROO *et al.* 2005), en el caso de peces planos como el rodaballo, halibut o el lenguado, además de las malformaciones de columna, tienen especial relevancia las deformidades de pigmentación, la migración incompleta del ojo y las anomalías mandibulares (GAVAI *et al.* 2002, SÆLE *et al.* 2003; ARITAKI y SEIKAI 2004; LEWIS y LALL 2006).

Las diferentes anomalías que afectan a la calidad integral de los peces, en mayor o menor medida, pueden ser agrupadas principalmente en las de forma corporal, de pigmentación, de escamas y de esqueleto.

2. ANOMALÍAS DE FORMA CORPORAL

La forma del cuerpo es el primer criterio visual de evaluación de calidad de un pez, particularmente en especies cuya forma principal de comercialización es entero. Sin embargo, las empresas de cría comer-



cial no tienen establecidos protocolos de valoración morfológica, como sucede en animales domésticos terrestres, al objeto de optimizar los rendimientos productivos. Lo único que hacen las empresas durante los procesos de criba visual es eliminar aquellos peces que previsiblemente van a ser deformes en las empresas de engorde, entre otras razones porque no pueden vender peces de baja calidad y exponerse a potenciales reclamaciones del sector dedicado al engorde (Figura 1). De ahí que la valoración de la forma corporal se limite a eliminar en realidad otras deformidades que son indicadas más adelante y que tienen inevitablemente influencia en la morfología del pez.

3. ANOMALÍAS DE PIGMENTACIÓN

Las anomalías de pigmentación consisten en una alteración parcial o total de la coloración del cuerpo. En peces planos, donde han sido ampliamente descritas por su importancia económica (BOLKER y HILL 2000), el fenotipo normal presenta coloración en la cara ocular o superior y ausencia de ésta en la cara ciega o inferior. La pigmentación anormal



FIGURA 1.
Criba manual
de individuos
deformes.



consiste en hipomelanosis o pseudoalbinismo en la primera e hipermelanosis o ambicoloración en la segunda (VENIZELOS y BENETTI 1999) (Figura 2). La distinta pigmentación es consecuencia de una distribución diferencial y diferencias fisiológicas celulares de los cromatóforos (KELHS 2004; BURTON 2005) que ha sido asociada a las condiciones intensivas de cultivo tales como la densidad, la iluminación, el sustrato o la dieta (SEIKAI *et al.* 1987; BENETTI 1997; ESTÉVEZ *et al.* 1999, 2001). En poblaciones naturales suceden tanto el pseudoalbinismo (VENIZELOS y BENETTI 1999) como la ambicoloración (ASTARLOA 1995), con diferente capacidad adaptativa y con inferior incidencia que en poblaciones de cultivo (BOLKER y HILL 2000).

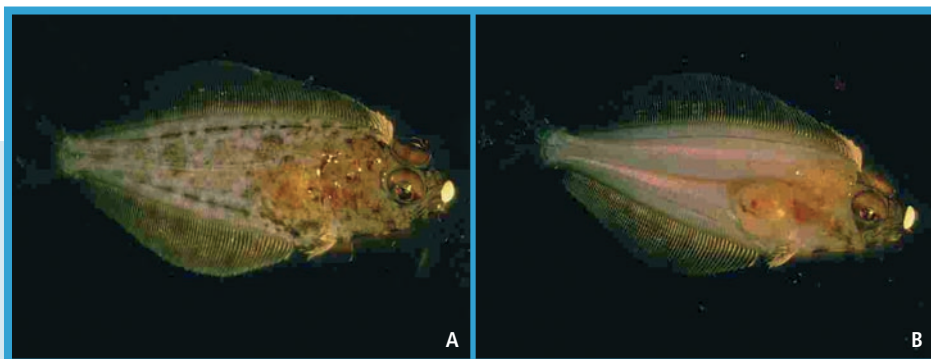


FIGURA 2.

Ejemplares de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*);
a) con pigmentación normal, b) con pseudoalbinismo.

Pocos han sido los esfuerzos llevados a cabo para estimar el grado de contribución genética en la determinación de la variación en pigmentación, debido esencialmente a la falta de programas de selección y genealogías conocidas en los lotes de producción. Recientemente, SHIKANO (2005) ha estimado la heredabilidad de la pigmentación corporal en el pez plano *Paralichthys olivaceus*, para seis componentes del color; rojo, verde, azul, Hue, saturación e intensidad, mediante el método basado en marcadores (RITLAND 1996, 2000). Para ello utilizó una muestra de 126 descendientes (63 pseudoalbinos y 63 normales) genotipados con siete marcadores microsatélites específicos altamente polimórficos y procedentes de una puesta masal. Los altos valores



estimados determinaron una componente genética aditiva que varió desde el 77% para el color azul hasta el 98% para el color rojo y la intensidad, siendo, en todos los casos, estadísticamente significativa (Tabla 1). A pesar de que estas pueden incluir efectos de dominancia y de las propias limitaciones de las estimas basadas en marcadores (LYNCH y WALSH 1998; THOMAS *et al.* 2002), dichas estimas ponen de manifiesto la importancia de la variación genética en la determinación de los cuadros de variación para la pigmentación en *Paralichthys olivaceus*, atribuible a uno o varios genes mayores (SHIKANO 2005).

TABLA 1.

Estimas de heredabilidad para componentes del color del cuerpo en *Paralichthys olivaceus* (SHIKANO 2005).

Componentes del color					
Rojo	Verde	Azul	Hue	Saturación	Intensidad
0,98 ± 0,23	0,94 ± 0,22	0,77 ± 0,20	0,97 ± 0,24	0,80 ± 0,20	0,98 ± 0,23

En peces cilíndricos, este tipo de anomalías no parecen influir en el rendimiento biológico pero pueden afectar la aceptación en los mercados al disminuir el brillo del pez y consecuentemente la valoración de la calidad (HUIDOBRO *et al.* 2000). En este sentido, KAUSE *et al.* (2003) estimaron la heredabilidad para el color y manchas de la piel en *Oncorhynchus mykiss*, los cuales son considerados como caracteres importantes de cara a la aceptación comercial de los peces. Para ello, valoraron ambos caracteres en 4068 peces provenientes de 71 padres y 128 madres, mediante la clasificación de estos según su grado de aceptabilidad comercial (excepcional, normal, inaceptable). Las estimas de la variación genética fueron realizadas tanto en la escala observable como en la escala subyacente. En la primera, las componentes genéticas aditivas y no aditivas o del ambiente común fueron de $0,29 \pm 0,10$ y $0,037 \pm 0,034$, para el color de la piel, y de $0,45 \pm 0,12$ y $0,019 \pm 0,037$, para las manchas de la piel, respectivamente. En la escala subyacente, las estimas de las heredabilidades fueron 0,47 y 0,61 para el color y manchas de la piel, respectivamente, mientras que sus componentes genéticas no aditivas o del ambiente común para esos mismos caracteres fueron de 0,031 y 0,028, respectivamente. Las considerables componentes genética aditiva



de estos caracteres, sus correlaciones genética y fenotípica positivas (0,83 y 0,33 respectivamente), y su falta de correlación con la masa corporal, hacen que sean considerados en los índices de selección del programa de mejora genética de Finlandia para la trucha arco iris (KAUSE *et al.* 2003). La pigmentación externa también es considerada en los índices de selección multicarácter de otras especies como la dorada, *Sparus aurata* (THORLAND *et al.* 2006). Estos autores, iniciaron recientemente, en 2002, un programa de selección con la empresa griega KEGO S.A. para caracteres de crecimiento y morfológicos, incluyendo la pigmentación de la piel, para la cual estimaron una heredabilidad del 21% ($0,21 \pm 0,02$) y una respuesta a la selección positiva del 5,9% en la primera generación.

Segregación de uno o pocos genes ha sido también demostrada en la determinación de la despigmentación y el albinismo en especies de peces cilíndricos (KVASNICKA *et al.* 1998). El albinismo viene determinado por un gen autonómico recesivo en *Oncorhynchus mykiss* (BRIDGES y LIMBACH 1972) y en *Ctenopharyngodon idella* (ROTHBARD y WOHLFARTH 1993) o dos genes autosómicos recesivos en *Carassius auratus* (KAJISHIMA 1977). Para los fenotipos despigmentación y transparente, KAJISHIMA (1977) determinó la presencia de dos genes dominantes y un gen recesivo autosómico, respectivamente. En *Cyprinus carpio*, donde el fenotipo transparente viene determinado por dos genes recesivos, hay diferentes coloraciones corporales que vienen segregados por distintos genes recesivos (*Blue*, *Gold*, *Steel*) o dominantes (*Light-coloured*) (KIRPICHNIKOV 1981). De igual modo sucede en *Oreochromis niloticus* donde genes autosómicos recesivos explican la aparición de los fenotipos con pigmentación *Blond* y *Syrup*, y un gen dominante el fenotipo *Red* (LUTZ 1997). En *Oreochromis mossambica*, los fenotipos *Gold*, *Bronze* y *Black* vienen determinados por un gen autosómico en relación de dominancia incompleta (TAVE *et al.* 1989). KINCAID (1975), sugirió un gen recesivo con penetrancia incompleta para explicar la segregación de la pigmentación corporal IMB (*Iridescent Metallic Blue*) en trucha arco iris.

4. ANOMALÍAS DE ESCAMAS

La escama es una estructura morfológica con múltiples funciones como la protección de los peces a los agentes externos (PRICE y



CLAYTON 1999) y de la línea lateral (CARRILLO *et al.* 2001), la disminución del rozamiento (VIDELER 1994) o la conservación de minerales y nutrientes (VAN OOSTEN 1957). Su desarrollo está relacionado con la edad y el crecimiento (ANNA *et al.* 2006) y ha sido utilizada en la diferenciación de especies (CHERVINSKI 1986) y de poblaciones salvajes frente a poblaciones de cultivo (CARRILLO *et al.* 2001). Las malformaciones de escamas tienen escasa repercusión económica (DIVANACH *et al.* 1996) la cual depende del tipo y su incidencia, de la influencia de éstas sobre caracteres productivos y supervivencia, de su asociación con otras malformaciones esqueléticas y de la especie en la que suceda (KIRPICHNIKOV 1981; PRICE y CLAYTON 1999). Las anomalías de escamas, se caracterizan por la ausencia parcial o total de estas sobre el cuerpo de los peces, la variación de su tamaño y la desorientación en la dirección de crecimiento de las mismas (YAMAMOTO 1977; TOMITA 1992; BROWDER *et al.* 1993; SUN *et al.* 1998; CORRALES *et al.* 2000; JAWAD 2005), estando asociadas tanto a factores ambientales (BRUNO y ELLIS 1988; BROWDER *et al.* 1993; YOSHITOMI *et al.* 1998; CORRALES *et al.* 2000) como a factores genéticos (KIRPICHNIKOV 1981; NICHOLS *et al.* 2004).

Desde el punto de vista genético, en *Cyprinus carpio* ha sido descrita que la densidad y distribución de las escamas depende de la segregación de dos genes autosómicos dialélicos en relación de dominancia, con efectos pleiotrópicos diferenciales sobre el crecimiento y la viabilidad dependiendo de las condiciones de cultivo (KIRPICHNIKOV 1981). Recientemente, en *Oncorhynchus mykiss* ha sido puesto de manifiesto la determinación genética para el número de escamas, mediante la detección de *QTL* (*Quantitative Trait Loci*) (NICHOLS *et al.* 2004). Estos autores encontraron dos *QTL* para el número de escamas por encima de la línea lateral (*above lateral line*), denominados *abovell-1*, con efecto aditivo positivo, y *abovell-2*, con efecto aditivo negativo, que explican el 15,9% y el 27,5% de la variación total para el número de escamas por encima de la línea lateral, respectivamente. Además, encuentran un *QTL*, para el número de escamas de la línea lateral (*lateral line scales*), denominado *lIscales-RESID*, que explica el 16,6% de la variación total del número de escamas de la línea lateral.



5. ANOMALÍAS DEL ESQUELETO

Las anomalías de esqueleto (neurocráneo, espina dorsal, esqueleto apendicular) son las más importantes de las que acontecen en peces ya que alteran de manera severa la morfología de estos, y por la repercusión económica que tienen en las empresas.

Las deformidades asociadas al neurocráneo (complejo opercular y mandíbulas) son encontradas frecuentemente en los criaderos comerciales. Las anomalías de los huesos del complejo opercular pueden estar presentes a uno o ambos costados del cuerpo del pez y consistir en un plegamiento o una formación incompleta del complejo opercular, a menudo asociado con malformaciones de los arcos branquiales (SADLER *et al.* 2001) (Figura 3). Estas deformidades suceden desde edades muy tempranas en el desarrollo, sin asociación con un lado corporal concreto, y pudiendo alcanzar incidencias de hasta el 98,3% de la población (BERALDO *et al.* 2003). Las deformidades de las mandíbulas, consisten en torsiones de la mandíbula inferior y superior o prolongación de éstas en diferente magnitud (COBCROFT *et al.* 2001), que en ocasiones han sido asociadas a efectos letales (BARAHONA-FERNANDES, 1982) (Figura 4).

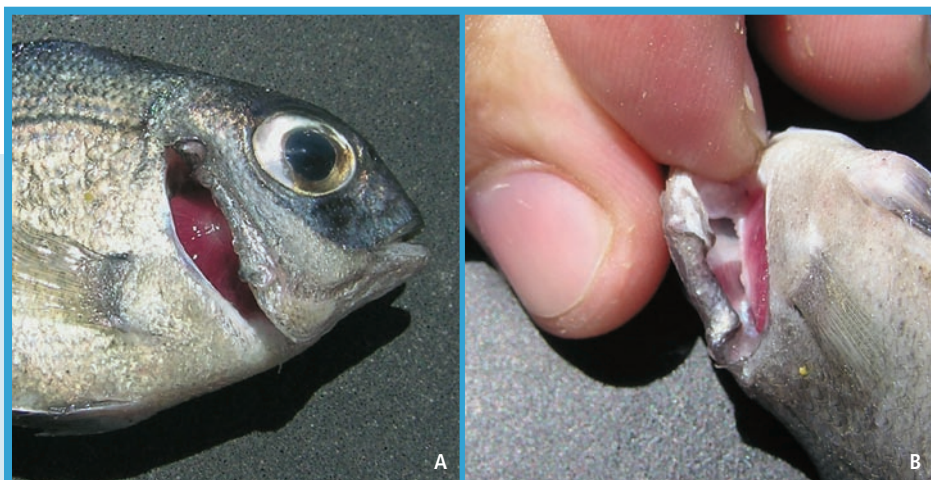


FIGURA 3.

Ejemplares de pargo (*Pagrus pagrus*); a) con anomalía del complejo opercular, b) detalle del plegamiento hacia el interior.

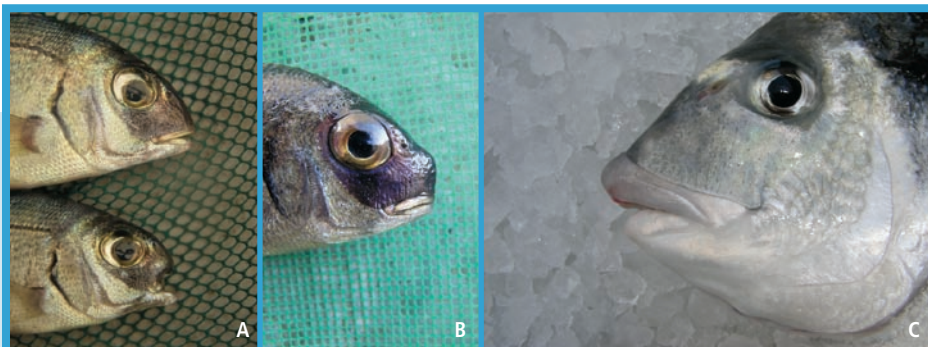


FIGURA 4.

Deformidades mandibulares en; a,b) pargo (*Pagrus pagrus*), c) dorada (*Sparus aurata*).

En general, el desarrollo ontogénico del neurocráneo y de las aletas es previo a la eclosión, siendo completado a etapas más avanzadas del desarrollo. Las deformidades de las aletas se caracterizan por torsión, falta parcial o total de las mismas y puede alcanzar incidencias de hasta un 65% en larvas de dorada (KOUMOUNDOUROS *et al.* 1997b) (Figura 5).

Las anomalías de la columna vertebral son muy relevantes en piscicultura no sólo por su severa determinación sobre la morfología del pez sino también por la influencia que ejercen sobre caracteres productivos como el crecimiento (GJERDE *et al.* 2005; KAUSE *et al.* 2005).

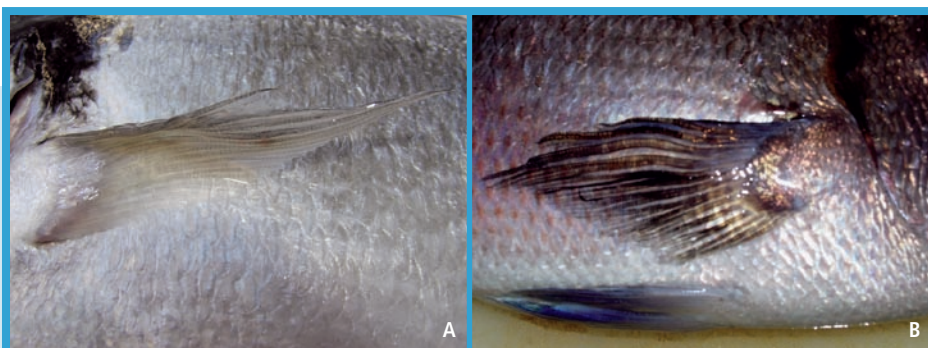


FIGURA 5.

Anomalías en los radios de las aletas pectorales en; a) dorada (*Sparus aurata*), b) pargo (*Pagrus pagrus*).



Las principales deformidades de columna son la escoliosis, lordosis, cifosis y fusiones vertebrales, que en ocasiones es posible encontrar en un mismo pez de forma combinada (AFONSO *et al.* 2000) (Figura 6). Las anomalías de la columna han sido documentadas en especies de aguas dulce (BACKIEL *et al.* 1984; AKIYAMA *et al.* 1985, 1986a,b; McKAY y GJERDE 1986; POYNTON 1987; PILLAI y THAMPY 1990; MAIR 1992; McCONNELL y BARROWS 1993; ANDO *et al.* 1995; VAGSHOLM y DJUPVIK 1998; MADSEN y DALSGAARD 1999) y en especies marinas (PAPERNA 1978; TAKASHIMA 1978; BARAHONA-FERNANDES 1982; TANIGUCHI *et al.* 1984; DAOULAS *et al.* 1991; ANDRADES *et al.* 1996; KOU-MOUNDOUROS *et al.* 1997b, 2001a,b, 2002; FAUSTINO y POWER 1998, 2001; AFONSO *et al.* 2000; BOGLIONE *et al.* 2001; FAUSTINO 2002; GAVAIÁ *et al.* 2002; KIHARA *et al.* 2002; MOTOKI 2002; FAVALORO y MAZZOLA 2003; BOGLIONE *et al.* 2003; MATSUOKA, 2003; SFAKIANAKIS *et al.* 2004).

La aparición de deformidades esqueléticas en peces está relacionada tanto a factores medioambientales, nutricionales y genéticos. Entre los factores ambientales están los abióticos (intensidad de la luz, oxígeno disuelto, temperatura, pH, salinidad, flujo de agua y asociados al cultivo), bióticos (bacterias, virus, hongos y parásitos) y xenobióticos (alguicidas, fungicidas, herbicidas, insecticidas, efluentes industriales y metales pesados). Entre los nutricionales están los fosfolípidos, aminoácidos, proteínas y vitaminas, mientras que entre los factores genéticos están los unigénicos y los poligénicos.

Los factores ambientales como la luz, temperatura o la salinidad han sido descritos como causantes de la aparición de deformidades, en peces marinos (BATTAGLENE y TALBOT 1990; POLO *et al.* 1991; MIHELAKAKIS y YOSHIMATSU 1998; COBCROFT *et al.* 2001; SFAKIANAKIS *et al.* 2004, 2005).

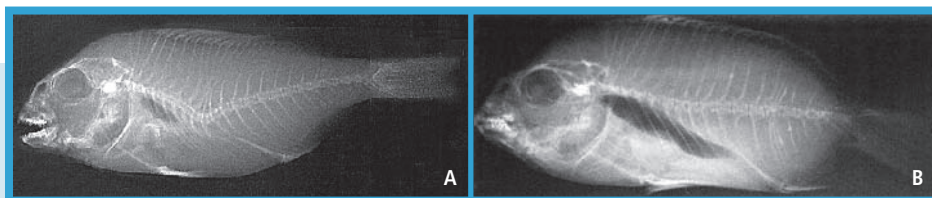


FIGURA 6.

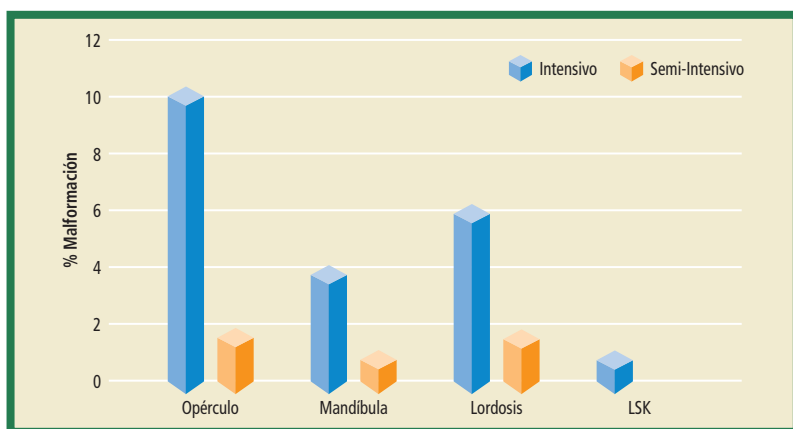
Anomalías de columna en dorada (*Sparus aurata*); a) lordosis, b) fusión de vértebras.



Otros factores que pueden provocar más repercusiones negativas en la integridad del esqueleto-vértebra en larvas son los traumas mecánicos durante el desarrollo embrionario o durante las primeras etapas de cultivo larvario, consecuencia de la manipulación de huevos y larvas. El desarrollo anómalo de la vejiga natatoria, también ha sido señalado como uno de los más importantes para el correcto desarrollo de la columna, siendo la más importante la no inflación de la misma durante la fase larvaria (BAGARINAO y KUNGVANKIJ 1986; CHATAIN y DEWAVRIN 1989). Por otro lado, las variaciones en la hidrodinámica del tanque (CHATAIN 1994; DIVANACH *et al.* 1997; KOUMOUNDOUROS *et al.* 1997a,b; KIHARA *et al.* 2002), se ha visto que favorecen la aparición de lordosis (BACKIEL *et al.* 1984; DIVANACH *et al.* 1997; KIHARA *et al.* 2002). De manera general, el tipo de sistema de cultivo ha sido descrito como factor modulador de la aparición de deformidades esqueléticas, fundamentalmente relacionado con la intensificación de las técnicas de cría, asociando el uso de sistemas extensivos y semi-intensivos con la obtención de peces con muy baja incidencia de deformidades esqueléticas más similares a los peces salvajes, cuando se comparan con ejemplares cultivados mediante técnicas intensivas (DIVANACH y KENTOURI 1983; DIVANACH *et al.* 1996; BOGLIONE *et al.* 2001; KOUMOUNDOUROS *et al.* 2001a; SFAKIANAKIS *et al.* 2004; ROO *et al.* 2005; GIMÉNEZ y ESTÉVEZ 2005) (Figura 7).

FIGURA 7.

Distribución de incidencia de deformidades esqueléticas por sistema de cultivo en dorada (*Sparus aurata*) (ROO *et al.* 2005).





Los antecedentes de los factores bióticos como generadores de deformidades esqueléticas son escasos, siendo los parásitos los que tienen una mayor influencia. Parásitos pertenecientes a la familia *mixosporea* han sido descritos como causantes de deformidades esqueléticas en *Oncorhynchus mykiss*, *Seriola quinqueradiata* y *Perca fluviatilis* (LOM *et al.* 1991).

En relación a factores xenobióticos en la aparición de deformidades esqueléticas ha sido descrita para pesticidas (CHUN *et al.* 1981; THI HONG LIEN *et al.* 1997), herbicidas (KOYAMA 1996), hidrocarburos (GRADY *et al.* 1992), compuestos orgánicos y organoclorados (LINDESJÖÖ *et al.* 1994) y metales (SLOMINSKA y JEZIERSKA 2000). También el exceso de antibióticos en los tratamientos de enfermedades ha sido relacionado con la inducción de deformidades esqueléticas (TOFTEN y JOBLING 1996).

Los requerimientos nutricionales, en condiciones intensivas, son detonantes importantes en la aparición de deformidades esqueléticas. Los *HUFA* (*highly unsaturated fatty acids*) son esenciales para el crecimiento, desarrollo y supervivencia en peces marinos (GAPASIN y DURAY 2001; CAHU *et al.* 2003a,b), y regulan la expresión de genes del desarrollo ya que actúan a nivel molecular a través de receptores nucleares específicos, como *PPAR* (*Proliferative peroxisomes active receptors*) y *RXR* (*retinoic X receptor*). VILLENEUVE *et al.* (2005, 2006) han demostrado que el exceso de *HUFA* en la dieta, puede acelerar la diferenciación de los osteoblastos a través de una sobre regulación de los *RXRα* y las *BMP₄* (*bone morphogenetic protein*), lo que se refleja por la aparición de un mayor número de vértebras. En cuanto a los aminoácidos esenciales, las deficiencias en triptófano han sido asociadas con la presencia de deformidades (WALTON *et al.* 1984; AKIYAMA *et al.* 1985, 1986b; WILSON 1989). La deficiencia de péptidos en la dieta también influye en la incidencia de malformaciones esqueléticas en el desarrollo larvario (CAHU *et al.* 1999). En cuanto a las vitaminas, ha sido demostrada la influencia de los excesos o defectos de las vitaminas A y C en las incidencias de las deformidades esqueléticas en peces (HALVER 1989; DEDI *et al.* 1995; TAKEUCHI *et al.* 1998). En este sentido, es importante resaltar que el ácido retinoico tiene capacidades teratogénicas con influencia en los sucesos que acontecen durante la embriogénesis de animales y humanos, siendo los efectos de éste, mediados a través



de la expresión de los genes *Hox* y *sonic hedgehog (shh)*. Así, un exceso de ácido retinoico en la dieta de las larvas de *Paralichthys olivaceus* provoca la aparición de compresión de las vértebras (TAKEUCHI *et al.* 1998).

En cuanto a los factores genéticos, ha sido puesto de manifiesto determinación unigénica. MAIR (1992), obtuvo una proporción de 3:1 de larvas normales de tilapia del Nilo frente a larvas deformes en la aleta caudal, a partir de 10 cruzamientos entre supuestos heterocigotos, lo que soporta la hipótesis de herencia mendeliana simple de un gen recesivo. De la misma manera, ROSENTHAL y ROSENTHAL (1950) observaron que la lordosis en guppy se debía a un gen recesivo. También en guppy, LODI (1978) encontró que el acortamiento del cuerpo era debido a la fusión de vértebras y heredado como un gen dominante.

En el contexto de la genética cuantitativa, AULSTAD y KITTELSEN (1971) obtuvieron evidencias al encontrar valores de mortalidad del huevo e incidencia de alevines deformes superiores al grupo control, en 2,4 y 38 veces, respectivamente, en la descendencia de nueve grupos diferentes de hermanos carnales de trucha arco iris. POYNTON (1987), sugirió que las deformidades caracterizadas por un acortamiento longitudinal del cuerpo de la trucha común podrían ser explicadas por la utilización de reproductores emparentados, debido al escaso control de los mismos en el momento de establecer grupos de lotes de reproductores. ANDO *et al.* (1995) demostraron diferencias en la aparición de cuatro diferentes tipos de anomalías vertebrales entre 14 estirpes de guppy que son genéticamente diferentes, asociando la alta incidencia de deformidades en dos de las estirpes (59,5 y 70,8%) a un alto nivel de consanguinidad. KINCAID (1983), encontró en una generación de apareamiento de hermanos carnales de trucha arco iris, un aumento de un 37,6% en la incidencia de las deformidades en los alevines. En dorada japonesa, TANIGUCHI *et al.* (1984) describieron que las diferencias en incidencia de lordosis entre cuatro grupos de descendientes a partir de dos familias de medios hermanos paternos, pueden ser causadas por factores anteriores a la eclosión, tales como las condiciones fisiológicas de los huevos y reproductores y factores genéticos. En dorada, ANDRADES *et al.* (1996) explican que la mayoría de los juveniles lordóticos observados en una población de engorde, probablemente provenían de larvas lordóticas supervivientes, sugiriendo que las causas primarias de



aparición de lordosis podrían ser, entre otras, de origen genético que pueden afectar a los huevos durante el desarrollo embrionario. La primera asociación familiar de una deformidad severa en dorada se debe a AFONSO *et al.* (2000), quienes describieron la aparición simultánea de una triple deformidad de columna (*LSK*; lordosis, escoliosis y cifosis) en todas las réplicas de descendientes de una misma familia. HEUPEL *et al.* (1999), describieron una anomalía morfológica parecida a la *LSK* en especies de elasmobranquios con distintas estrategias reproductivas, y aduciendo causas genéticas para explicar su presencia. ASTORGA *et al.* (2003a,b) estudiaron el efecto de la consanguinidad en la aparición de las deformidades esqueléticas de dorada, mediante el cruce de reproductores normales con distintos niveles de consanguinidad ($F = 0,125$; $F = 0,25$), a las edades de 4, 14 y 35 días post-eclosión y a los 194 días de edad. Dichos autores encontraron que al día 4, no existía una relación directa entre el exceso significativo de larvas deformes y el grado de consanguinidad, ya que el cruce de medios hermanos presentó un exceso de deformes mientras que el de hermanos carnales no difirió del cruce control. A día 14, no hubo diferencias entre los dos tipos de cruces consanguíneos y el control, mientras que a día 35 hubo un exceso significativo de larvas deformes en el cruce de hermanos carnales frente al control y de medios hermanos. Sólo a la edad de 194 días, encontraron una incidencia creciente de peces deformes con la consanguinidad aunque no estadísticamente diferente del control.

Aunque son escasas las estimas de heredabilidad para la presencia de deformidades en peces, ha sido puesto de manifiesto el grado de variación genética aditiva para malformaciones individuales o grupos de estas. MCKAY y GJERDE (1986) realizaron estimas para una malformación a modo de giba en una población de salmón del Atlántico a la edad de sacrificio. Mientras que las estimas de la heredabilidad fueron de 0,25 y 0,14 para componentes macho y hembra, respectivamente, dentro de la escala fenotípica, dichas estimas fueron de 0,64 y 0,36 en la escala subyacente, respectivamente. Además, el factor de condición medio de los peces deformes fue 1,3 veces mayor que en los peces sin deformidad, estando ésta relacionada positivamente con el grado de madurez (inmaduros) y el sexo (machos) de los individuos. Los autores sugieren que podría ser incluido en los programas de mejora genética de dicha



especie como un objetivo de selección. Más recientemente, para esta misma deformidad, GJERDE *et al.* (2005) han estimado la heredabilidad en cuatro clases año con valores que oscilaron entre el 0% y el 36%, en la escala subyacente. En trucha arco iris, KAUSE *et al.* (2005) estimaron una componente genética aditiva muy baja ($0,02 \pm 0,005$) para la presencia-ausencia de distintas deformidades esqueléticas desde la cabeza hasta la cola, valoradas visualmente a los dos años de edad. En bacalao, KETTUNEN y FJALESTAD (2006) han estimado la variación genética aditiva para la presencia-ausencia de un conjunto de deformidades espinales con repercusión económica, como lordosis, fusión y opérculo, a +1 y +2 años de vida en un 72% y 45%, respectivamente, en la escala subyacente. KOLSTAD *et al.* (2006), también en bacalao, estimaron dicha determinación genética en un 27% para las deformidades espinales a los dos años de edad. En carpa común, KOCOUR *et al.* (2006) estimaron las heredabilidades para tres tipos de deformidades, boca (normal frente a deformes), aleta anal (presencia-ausencia) y aleta caudal (normal frente a anormal), siendo estas del 3%, 9% y 7%, respectivamente. Sólo la estima para la aleta anal fue estadísticamente distinta de cero. En dorada, ASTORGA *et al.* (2004) estudiaron 38 tipos de malformaciones morfológicas, simples o combinaciones de éstas, encontradas sobre un lote de 11038 descendientes no cribados provenientes de un lote de reproductores con control individual del apareamiento, estimando una heredabilidad de 0,85 para el carácter presencia-ausencia de cualquier tipo de deformidad con el 95% de la probabilidad marginal entre los valores 0,822 y 0,875, y sugiriendo la implicación de un gen mayor. También en dorada, THORLAND *et al.* (2006) estimaron la heredabilidad para la deformidad espinal en un lote industrial de la empresa KEGO S.A. en $0,12 \pm 0,02$ y con una respuesta negativa de la incidencia del 11%, en la primera generación de selección.

BIBLIOGRAFÍA

- AFONSO, J.M., D. MONTERO, L. ROBAINA, N. ASTORGA, M.S. IZQUIERDO y R. GINÉS, 2000. Association of a lordosis-scoliosis-kyphosis deformity in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) with family structure. *Fish Physiol. Biochem.* **22**: 159-163.



- AKIYAMA, T., S. ARAI y T. MURAI, 1985. Tryptophan requirement of chum salmon fry. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **51**: 1005-1008.
- AKIYAMA, T., K. MORI y T. MURAI, 1986a. Effects of temperature on the incidence of scoliosis and cataract in chum salmon fry caused by tryptophan deficiency. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **52**: 2039.
- AKIYAMA, T., T. MURAI y T. NOSE, 1986b. Role of tryptophan metabolites in inhibition of spinal deformity of Chum salmon fry caused by tryptophan deficiency. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **52**: 1255-1259.
- ANDO, D., M. NAKAJIMA y Y. FUJIO, 1995. Strain difference of vertebral abnormality in the guppy *Poecilia reticulata*. *J. Agri. Res.* **46**: 29-34.
- ANDRADES, J.A., J. BECERRA y P. FERNÁNDEZ-LLEBREZ, 1996. Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture* **141**: 1-11.
- ANNA, C., P. GEORGE y T. EVANGELOS, 2006. Aspects of the biology of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) in the Ionian Sea, Greece. *Fish. Res.* **77**: 84-91.
- ARITAKI, M. y T. SEIKAI, 2004. Temperature effects on early development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared brown sole *Pseudopleuronectes herzensteini*. *Aquaculture* **240**: 517-530.
- ASTARLOA, J.M.D., 1995. Ambicoloration in two flounders, *Paralichthys patagonicus* and *Xystreuris rude*. *J. Fish Biol.* **47**: 168- 170.
- ASTORGA, N., A. VALENCIA, H. FENÁNDEZ-PALACIOS, D. MONTERO, M.J. ZAMORANO, C. AGUILERA, R. VALLE y J.M. AFONSO, 2003a. Segregation analysis of skeletal deformities among broodstocks and offspring of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), with three levels of consanguinity. *Genetics in Aquaculture VIII. Puerto Varas, Chile*, pp122.
- ASTORGA, N., A. VALENCIA, H. FENÁNDEZ-PALACIOS, D. MONTERO, M.J. ZAMORANO, C. AGUILERA y J.M. AFONSO, 2003b. Genetic effect of the type of cross and consanguinity level in spawning quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) *Genetics in Aquaculture VIII. Puerto Varas, Chile*, pp86.
- ASTORGA, N., M.J. ZAMORANO, M.A. TORO, L.A. GARCÍA-CORTÉS, D. MONTERO y J.M. AFONSO, 2004. Heredabilidad del carácter presencia o ausencia de deformaciones esqueléticas en dorada (*Sparus aurata* L.) *ITEA* **100A**: 256 – 260.
- AULSTAD, D. y A. KITTELSEN, 1971. Abnormal body curvatures of Rainbow Trout Inbred fry. *J. Fish. Res. Board Can.* **28**: 1918-1920.
- BACKIEL, T., B. KOKUREWICZ y A. OGORZALEK, 1984. High incidence of skeletal abnormalities in carp, *Cyprinus carpio*, reared in cages in flowing water. *Aquaculture* **43**: 369-380.



- BAGARINAO, T. y P. KUNGVANKIJ, 1986. An incidence of swimbladder stress syndrome in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture* **51**: 181-188.
- BARAHONA-FERNANDES, M.J., 1982. Body deformation in hatchery reared European seabass *Dicentrarchus labrax*. Types, prevalence and effect on fish survival. *J. Fish Biol.* **21**: 239-249.
- BATTAGLENE, S.C. y R.B. TALBOT, 1990. Initial swim bladder inflation in intensively reared Australian bass larvae, *Macquaria novemaculeata* (Steindachner) (Perciformes: Percichthyidae). *Aquaculture* **86**: 431-442.
- BENETTI, D.D., 1997. Spawning and larval husbandry of flounder (*Paralichthys wppelmani*) and Pacific yellowtail (*Seriola Mazatlana*), new candidate species for aquaculture. *Aquaculture* **155**: 307-318.
- BERALDO, P., M. PINOSA, E. TIBALDI y B. CANAVESE, 2003. Abnormalities of the operculum in gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphological description. *Aquaculture* **220**: 89-99.
- BERRA, T.M. y R. JEAN AU, 1981. Incidence of teratological fishes from cedar fork creek, Ohio. *Ohio J. Sci.* **81**: 225-229.
- BOGLIONE, C., F. GAGLIARDI, M. SCARDI y S. CATAUDELLA, 2001. Skeletal descriptors as quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture* **192**: 1-22.
- BOGLIONE, C., C. COSTA, P. DI DATO, G. FERZINI, M. SCARDI y S. CATAUDELLA, 2003. Skeletal quality assessment of reared and wild sharpnose sea bream and Pandora juveniles. *Aquaculture* **227**: 373-394.
- BOLKER, J.A. y C.R. HILL, 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *J. Fish Biol.* **56**: 1029-1052.
- BRIDGES, W.R. y B. LIMBACH, 1972. Inheritance of albinism in rainbow trout. *J. Hered.* **63**: 152-153.
- BROWDER, J.A., D.B. McCLELLAN, D.E. HARPER, M.G. KANDRASHOFF y W. KANDRASHOFF, 1993. A major developmental defect observed in several Biscayne Bay, Florida, fish species. *Environ. Biol. Fish.* **37**: 181-188.
- BRUNO, D.W. y A.E. ELLIS, 1988. Histopathological effects in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., attributed to the use of tributyltin antifoulant. *Aquaculture* **72**: 15-20.
- BURTON, D., 2005. In vitro pattern-related effects of forskolin on melanophore adrenoceptor-mediated responses of winter flounder. *J. Fish Biol.* **66**: 230-241.
- CAHU, C., J. ZAMBONINO-INFANTE, P. QUAZUGUEL y M. LE GALL, 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* **171**: 109-119.



- CAHU, C., J. ZAMBONINO-INFANTE y V. BARBOSA, 2003a. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid: neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Bri. J. Nutri.* **90**: 21-28.
- CAHU, C., J. ZAMBONINO-INFANTE y T. TAKEUCHI, 2003b. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* **227**: 245-258.
- CARRILLO, J., G. KOUMOUNDOUROS, P. DIVANACH y J. MARTINEZ, 2001. Morphological malformations of the lateral line in reared gilthead sea bream *Sparus aurata* L. 1758. *Aquaculture* **192**: 281-290.
- CHATAIN, B., 1994. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture* **119**: 371-379.
- CHATAIN, B. y G. DEWAVRIN, 1989. Influence des anomalies de développement de la vessie natatoire sur la mortalité de *Dicentrarchus labrax* au cours du sevrage. *Aquaculture* **78** : 55-61.
- CHERVINSKI, J., 1986. Identification of four *tilapia* species from Lake Kinneret, Israel, by the form of their scales. *Aquaculture* **52**: 235-236.
- CHUN, S., C. PARK, y C. LEE, 1981. Acute toxicity of certain pesticides to teleost, with special respect to TLm and the vertebral abnormality. *Publ. Inst. Mar. Sci. Nat. Fish. Univ. Busan.* **13**, 43-48.
- COBCROFT, J.M., P.M. PANKHURST, J. SADLER y P.R. HART, 2001. Jaw development and malformation in cultured striped trumpeter *Latris lineata*. *Aquaculture* **199**: 267-282.
- CORRALES, J., L.B. NYE, S. BARIBEAU, N.J. GASSMAN y M.C. SCHMALE, 2000. Characterization of scale abnormalities in pinfish, *Lagodon rhomboides*, from Biscayne Bay, Florida. *Environ. Biol. Fish* **57**: 205-220.
- DAOULAS, C.H., A. ECONOMOU y I. BANTAVAS, 1991. Osteological abnormalities in laboratory reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) fingerlings. *Aquaculture* **97**: 169-180.
- DEDI, J., T. TAKEUCHI, T. SEIKAI y T. WATANABE, 1995. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture* **133**: 135-146.
- DIVANACH, P. y M. KENTOURI, 1983. The influence of initial tropic conditions on oil globule resorption, growth and survival of gilthead sea bream *Sparus aurata* larvae reared in extensive breeding. *Aquaculture* **35**: 43-55.
- DIVANACH, P., C. BOGLIONE, B. MENU, G. KOUMOUNDOUROS, M. KENTOURI y S. CATAUDELLA, 1996. Abnormalities in finfish mariculture: An overview of the problem, causes and solutions, pp. 45-66 en *International workshop on seabass and seabream culture: problems and prospects*. Verona, Italia.



- DIVANACH, P., N. PAPANDROULAKIS, P. ANASTASIADIS, G. KOUMOUNDOUROU y M. KENTOURI, 1997. Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase. *Aquaculture* **156**: 145-155.
- ESTÉVEZ, A., L.A. McEVoy, J.G. BELL y J.R. SARGENT, 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot *Scophthalmus maximus* larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* **180**: 321-343.
- ESTÉVEZ, A., T. KANEKO, T. SEIKAI, R.D. DORES, M. TAGAWA y M. TANAKA, 2001. Ontogeny of ACTH and MSH cells in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in relation to albinism. *Aquaculture* **202**:131-143.
- FAUSTINO, M. y D. POWER, 1998. Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. *J. Fish Biol.* **52**: 11-22.
- FAUSTINO, M. y D. POWER, 2001. Osteological development of the viscerocranial skeleton in sea bream: alternative ossification strategies in teleost fish. *J. Fish Biol.* **58**: 537-572.
- FAUSTINO, M., 2002. Developmental osteology of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). Thesis. Faro University, Portugal. 187 pp.
- FAVALORO, E. y A. MAZZOLA, 2003. Meristic variation and skeletal anomalies of wild and reared sharpsnout seabream juveniles (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) off oastal Sicily, Mediterranean Sea. *Aquac. Res.* **34**: 575-579.
- GAPASIN, R. y M. DURAY, 2001. Effects of DHA-enriched live food on growth, survival and incidence of opercular deformities in milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture* **193**: 49-63.
- GAVAIÁ, P.J., M.T. DINIS y M.L. CANCELA, 2002. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **211**: 305-323.
- GIMÉNEZ, G. y A. ESTÉVEZ, 2005. Effects of two culturing techniques on the growth, survival and larval quality of *Dentex dentex* (Linnaeus). LARVI '05-FISH & SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM.C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (Eds). European Aquaculture Society, Special Publication No. 36, Oostende, Belgium.
- GJEDREM, T., 1997. Selective breeding to improve aquaculture production. *World Aquaculture* **28**: 33-45.
- GJERDE, B., M. J. PANTE y G. BAEVERFJORD, 2005. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **244**: 77-87.



- GRADY, A., D. FABACHER, G. FRAME y B. STEADMAN, 1992. Morphological deformities in brown bullheads administered dietary β -naphthoflavone. *J. Aqua. Anim. Health.* **4**: 7-16.
- HALVER, J. 1989. The Vitamins. pp31-109. En: *Fish Nutrition*. Halver, J. (Eds.). Academic Press, Washington, EE.UU..
- HEUPEL, M.R., C.A. SIMPFENDORFER y M.B. BENNETT, 1999. Skeletal deformities in elasmobranchs from Australian waters. *J. Fish Biol.* **54**: 1111-1115.
- HICKEY, C. y B. YOUNG, 1984. Incidence of morphological abnormalities in striped bass from the Hudson river and coastal Long Island, New York. *New York Fish and Game Journal* **31**: 104-108.
- HUIDOBRO, A., A. PASTOR y M. TEJADA, 2000. Quality index method development for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *J. Food Sci.* **65**: 1202-1205.
- JAWAD, L.A., 2005. Scale deformities in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, (Actinopterygii: Cichlidae) from sudan. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* **35**: 61-63.
- KAJISHIMA, T., 1977. Genetic and developmental analysis of some new color mutants in the goldfish, *Carassius auratus*. *Genetics* **86**: 161-174.
- KAUSE, A., O. RITOLA, T. PAANANEN, U. ESKELINEN y E. MÄNTYSAARI, 2003. Big and beautiful? Quantitative genetic parameters for appearance of large rainbow trout. *J. Fish Biol.* **62**: 610-622.
- KAUSE, A., O. RITOLA, T. PAANANEN, H. WALHROOS y E. MÄNTYSAARI, 2005. Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **247**: 177-187.
- KVASNICKA, P., M. FLAJSNANS, P. RAB y O. LINHART, 1998. Inheritance studies of blue and golden varieties of tench (Pisces: *Tinca tinca* L.). *J. Hered.* **89**: 553-556.
- KELSH, R. N., 2004. Genetics and evolution of pigment patterns in fish. *Pigment Cell Res.* **17**: 326-336.
- KETTUNEN, A. y K.T. FJALESTAD, 2006. Genetic parameters for important traits in the breeding program for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *International Symposium Genetics in Aquaculture IX*. Montpellier, France. pp50.
- KIHARA, M., S. OGATA, N. KAWANO, I. KUBOTA y R. YAMAGUCHI, 2002. Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture* **212**: 149-158.
- KINCAID, H.L., 1975. Iridescent metallic blue color variant in rainbow trout. *J. Hered.* **66**: 100-101.
- KINCAID, H.L., 1983. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture* **33**: 215-227.



- KIRPICHNIKOV, V.S., 1981. *Genetic bases of fish selection*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- KOCOUR, M., O. LINHART y M. VANDEPUTTE, 2006. Mouth and fin deformities in common carp: is there a genetic basis?. *Aquac. Res.* **37**: 419-422.
- KOLSTAD, K., I. THORLAND, T. REFSTIE y B. GJERDE, 2006. Body weight, sexual maturity, and spinal deformity in strains and families of Atlantic cod (*Gadus morhua*) at two years of age at different locations along the Norwegian coast. *J. Mar. Sci.* **63**: 246-252.
- KOUMOUNDOUROS, G., G. ORAN, P. DIVANACH, S. STEFANAKIS, y M. KENTOURI, 1997a. The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture* **156**: 165-177.
- KOUMOUNDOUROS, G., F. GAGLIARDI, P. DIVANACH, C. BOGLIONI, S. CATAUDELLA y M. KENTOURI, 1997b. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* fry. *Aquaculture* **149**: 215-226.
- KOUMOUNDOUROS, G., P. DIVANACH y M. KENTOURI, 2001a. The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* L. *Aquaculture* **200**: 285-304.
- KOUMOUNDOUROS, G., D.G. SFAKIANAKIS, E. MAINGOT, P. DIVANACH y M. KENTOURI, 2001b. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Diplodus sargus* (Teleostei: Perciformes: Sparidae). *Mar. Biol.* **139**: 853-862.
- KOUMOUNDOUROS, G., E. MAINGOT, P. DIVANACH, y M. KENTOURI, 2002. Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*): ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture* **209**: 49-58.
- KOYAMA, J. 1996. Vertebral deformity susceptibility of marine fishes exposed to herbicide. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**: 655-662.
- LEWIS, L.M. y S.P. LALL, 2006. Development of the axial skeleton and skeletal abnormalities of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) from first feeding through metamorphosis. *Aquaculture* **257**: 124-135.
- LINDESJÖÖ, E., J. THULIN, B. BENGTSOON y U. TJÄRNLUND, 1994. Abnormalities of a gill cover bone, the operculum, in perch *Perca fluviatilis* from a pulp mill effluent area. *Aqua. Toxicol.* **28**: 189-207.
- LODI, E., 1978. Palla: a hereditary vertebral deformity in the guppy *Poecilia reticulata*, (pisces, osteichthyes). *Genetica* **48**: 197-200.
- LOM, J., A. PIKE, y I. DYKOVÁ, 1991. *Myxobolus sandrae*, the agent of vertebral column deformities of perch *Perca fluviatilis* in northeast Scotland. *Dis. Aqua. Organism.* **12**: 49-53.



- LUTZ, C.G., 1997. What do you get when you cross ... Part 2: Colors in tilapia. *Aquaculture Magazine* **23**: 90-96.
- LYNCH, M. y B. WALSH, 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- MADSEN, L. y I. DALSGAARD, 1999. Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **171**: 41-48.
- MAIR, G., 1992. Caudal deformity syndrome (CDS): an autosomal recessive lethal mutation in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Fish Dis.* **15**: 71-75.
- MANA, R.R. y G. KAWAMURA, 2002. A comparative study on morphological differences in the olfactory system of red sea bream (*Pagrus major*) and black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) from wild and cultured stocks. *Aquaculture* **209**: 285-306.
- MATSUOKA, M., 2003. Comparison of meristic variations and bone abnormalities between wild and laboratory-reared red sea bream. *JARC.* **37**: 21-30.
- McCONNELL, E. y F. BARROWS, 1993. Pathological changes associated with vitamin C deficiency in walleyes. *J. Aquat. Anim. Health.* **5**: 287-293.
- McKAY, L. y B. GJERDE, 1986. Genetic variation for a spinal deformity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* **52**: 263-272.
- MIHELAKAKIS, A. y T. YOSHIMATSU, 1998. Effects of salinity and temperature on incubation period, hatching rate and morphogenesis of the red sea bream. *Aquacult. Int.* **6**: 171-177.
- MOTEKI, M., 2002. Morphological aspects of feeding and improvement in feeding ability in the early larval stages of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.* **68**: 996-1003.
- NICHOLS, K.M., P.A. WHEELER y G.H. THORGAARD, 2004. Quantitative trait *loci* analyses for meristic traits in *Oncorhynchus mykiss*. *Environ. Biol. Fish.* **69**: 317-331.
- OFFICER, R.A., J.G. CLEMENT y D.K. ROWLER, 1995. Vertebral deformities in a school shark, *Galeorhinus galeus*: circumstantial evidence for endoskeletal resorption?. *J. Fish Biol.* **46**: 85-98.
- PAPERNA, I., 1978. Swimbladder and skeletal deformations in hatchery bred *Sparus aurata*. *J. Fish Biol.* **12**: 109-114.
- PILLAI, C. y D.M. THAMPY, 1990. Cases of deformities in some cultivable fishes. *Indian J. Fish.* **2**: 171-173.
- POLO, A., M. YUFERA y E. PASCUAL, 1991. Effects of temperature on eggs and larval development of *Sparus aurata* L. *Aquaculture* **92**: 367-375.
- POYNTON, S., 1987. Vertebral column abnormalities in brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish Dis.* **10**: 53-57.



- PRICE, D.J. y G.M. CLAYTON, 1999. Genotype–environment interactions in the susceptibility of the common carp, *Cyprinus carpio*, to *Ichthyophthirius multifiliis* infections. *Aquaculture* **173**: 149–160.
- RITLAND, K., 1996. A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. *Evolution* **50**:1062– 1073.
- RITLAND, K., 2000. Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Mol. Ecol.* **9**: 1195– 1204.
- ROO, F. J., C.M. HERNÁNDEZ-CRUZ, H. FERNÁNDEZ-PALACIOS y M.S. IZQUIERDO, 2005. Development of skeletal deformities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reared under different larval culture and dietary conditions. LARVI '05–FISH & SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM.C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (Eds). European Aquaculture Society, Special Publication No. 36, Oostende, Belgium.
- ROSENTHAL, H. y R. ROSENTHAL, 1950. Lordosis, a mutation in the guppy *Lebistes reticulatus*. *J. Heredity* **41**: 217-218.
- ROTHBARD, S. y G.W. WOHLFARTH, 1993. Inheritance of albinism in the grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Aquaculture* **115**: 13-17.
- SADLER, J., P.M. PANKHURST, y H.R. KING, 2001. High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **198**: 369-386.
- SÆLE, Ø., J.S. SOLBAKKEN, K. WATANABE, K. HAMRE y K. PITTMAN, 2003. The effect of diet on ossification and eye migration in Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* **220**:683–696.
- SEIKAI, T., J. MATSUMOTO, M. SHIMOZAKI, A. OIKAWA y T. AKIYAMA, 1987. An association of melanophores appearing at metamorphosis as vehicles of asymmetric skin color formation with pigment anomalies developed under hatchery conditions in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Pigment Cell Res.* **1**: 143-151.
- SFAKIANAKIS, D.G., G. KOUMOUNDOUROS, P. DIVANACH y M. KENTOURI, 2004. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture* **232**: 407–424.
- SFAKIANAKIS D.G., E. GEORGAKOPOULOU, I.E. PAPADAKIS, P. DIVANACH, M. KENTOURI y G. KOUMOUNDOUROS, 2005. Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* **254**: 54-64.
- SHIKANO, T., 2005. Marker-based estimation of heritability for body color variation in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **249**: 95–105.



- SLOMINSKA, I. y B. JEZIERSKA, 2000. The effect of heavy metals on postembryonic development of common carp, *Cyprinus carpio* L. Arch. Ryb. Pol. **8**: 119-128.
- SUN, P.L., R.M. OVERSTREET, W.E. HAWKINS, S.H. TSAI y N. BROWN-PETERSON, 1998. Morphological abnormalities in tilapia & other native fish species from southern Taiwan contaminated rivers - also discuss the possible cause of those abnormalities. Aquaculture '98 Book of Abstracts. p.524.
- TAKASHIMA, F., 1978. Vertebral malformation in hatchery-reared red seabream *Chrysophrys major*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fis. **44**: 435-443.
- TAKEUCHI, T., J. DEDI, Y. HAGA, T. SEIKAI y T. WATANABE, 1998. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture **169**: 155-165.
- TANIGUCHI, N., K. AZUMA y S. UMEDA, 1984. Difference due to parents in incidence of vertebral malformation in artificially-bred red seabream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **50**: 787-792.
- TAVE, D., M. REZK y R.O. SMITHERMAN, 1989. Genetics of body color in Tilapia mossambica. J. World Aquacult. Soc. **20**: 214-222.
- THI HONG LIEN, N., D. ADRIAENS y R. JANSSEN, 1997. Morphological abnormalities in african catfish (*Clarias gariepinus*) larvae exposed to malathion. Chemosphere **35**: 1475-1486.
- THOMAS, S.C., D.W. COLTMAN y J.M. PEMBERTON, 2002. The use of marker-based relationship information to estimate the heritability of body weight in a natural population: a cautionary tale. J. Evol. Biol. **15**: 92-99.
- THORLAND I., N. PAPAIOANNOU, L. KOTTARAS, T. REFSTIE, S. PAPASOLOMONTOS y M. RYE, 2006. Family based selection for production traits in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Greece. Genetics in Aquaculture IX. p104. Montpellier, France.
- TOFTEN, H. y M. JOBLING, 1996. Development of spinal deformities in Atlantic salmon and Artic charr fed diets supplemented with oxytetracycline. J. Fish Biol. **49**: 668-677.
- TOMITA, H., 1992. Rs-2 and mo mutants in the medaka (*Oryzias latipes*). Zool. Sci. **9**: 12-14.
- VAGSHOLM, I. y H.O. DJUPVIK, 1998. Risk factors for spinal deformities in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. **21**: 47-53.
- VAN DEN AVYLE, M.J., S.J. GARVICK, V.S. BLAZER, S.J. HAMILTON y W.G. BRUMBAUGH, 1989. Skeletal Deformities in Smallmouth Bass, *Micropterus dolomieu*, from Southern Appalachian reservoirs. Arch. Environ. Contam. Toxicol. **18**: 688-696.



- VAN OOSTEN, J. V., 1957. Skin and scales, pp.207–255 in *The Physiology of Fishes*, edited by M. E. Brown. Academic Press, New York.
- VENIZELOS, A. y D.D. BENETTI, 1999. Pigment abnormalities in flatfish. *Aquaculture* **176**: 181-188.
- VIDELER, J. J., 1994. *Fish Swimming*. Chapman & Hall. London.
- VILLENEUVE L, E. GISBERT, H. LE DELLIOU, C.L. CAHU y J. ZAMBONINO-INFANTE, 2005. Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br. J. Nutr.* **93**: 1-12.
- VILLENEUVE L, E. GISBERT, J. MORICEAU, C.L. CAHU y J. ZAMBONINO-INFANTE, 2006. Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Br. J. Nutr.* **95**: 677-687.
- WALTON, M.J., R.M. COLOSO, C.B. COWEY, J.W. ADRON y D. KNOX, 1984. The effects of dietary tryptophan levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* **51**: 279-287.
- WILSON, R., 1989. Amino Acids and Proteins. En: *Fish Nutrition*. Halver, J. (Eds.). Academic Press, Washi.
- YAMAMOTO, T.O., 1977. Inheritance of nacreous-like scaleness in the Ginbuna, *Carassius auratus langsdorfii*. *Jap. J. Genet.* **52**: 373-377.
- YOSHITOMI, T., J. KOYAMA, A. IIDA, N. OKAMOTO y Y. IKEDA, 1998. Cadmium-induced scale deformation in carp (*Cyprinus carpio*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**: 639-644.

7

ANÁLISIS DE PARENTESCOS MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES

ANÁLISIS DE PARENTESCOS MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES

P. Martínez

Universidad de Santiago de Compostela

J. Fernández

Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria

RESUMEN

La inferencia de las relaciones de parentesco entre individuos a partir de su parecido molecular representa una metodología de gran utilidad para la mejora genética en Acuicultura. Ésta posibilita la reorganización de los stocks de reproductores en grupos de mínimo parentesco, así como la identificación de las familias en planes de selección, para evitar las consecuencias nocivas de la consanguinidad y mantener la máxima diversidad a través de las generaciones. La elección del marcador y de la metodología estadística apropiados, es fundamental para lograr la mejor solución a la problemática planteada. Dependiendo de si tenemos información previa de los grupos generacionales o no, respectivamente, aplicaremos el análisis de paternidad o de parentesco. La aproximación más sencilla para el análisis de paternidad, implica la identificación de los progenitores a partir de la exclusión del resto de candidatos. Sin embargo, esto puede conducir a



más de una solución, resoluble probabilísticamente aplicando métodos de máxima verosimilitud. La capacidad para identificar los progenitores depende del escenario muestral (número de progenitores posible y proporción muestreada), de las características de los marcadores aplicados (polimorfismo, errores de genotipado), así como del grado de cumplimiento de las asunciones teóricas de los modelos aplicados. Existen una gran variedad de programas disponibles relacionados con el análisis de paternidad, que suelen presentar prestaciones complementarias.

Cuando se tiene un grupo de individuos de una sola generación o de relación generacional incierta, el objetivo es estimar las relaciones genéticas entre los individuos, habitualmente expresadas en función del coeficiente de parentesco. El problema general es determinar qué parte del parecido a nivel molecular (identidad en estado) se debe a identidad por descendencia (el parámetro de interés). Existen dos grandes grupos de estimadores a partir de la información molecular. En el primero se estiman las relaciones por separado para cada pareja de individuos (métodos *pairwise*), usualmente utilizando las frecuencias génicas de la población de referencia. Dentro de estos se pueden encontrar los denominados Métodos de Momentos (MME) y los basados en Máxima Verosimilitud (MLE). El otro grupo de estimadores utiliza la información de todos los individuos conjuntamente para determinar la estructura familiar más probable. Por su naturaleza estos métodos realizan una reconstrucción explícita de la genealogía (al menos en una generación), que ha dado lugar a la población actual. Dependiendo del tipo de estimador y de las asunciones que se hacen en su elaboración, cada uno de ellos tiene ventajas y limitaciones que hay que tener en cuenta cuando se decide el estimador a usar. En el presente trabajo se analizan los estimadores más importantes y se ofrece una relación de herramientas informáticas de uso libre que los implementan.

ABSTRACT

The inference of parentage relationships between individuals starting from their molecular resemblance represents an useful methodology for genetic improvement in Aquaculture. This makes possible the reorganization



of broodstocks in groups with low relatedness, as well as the identification of families in selection programs to avoid the harmful effects of inbreeding and to maintain the highest diversity as possible across generations. The choice of the appropriate genetic marker and the statistical methodology is essential to get the best solution for the questions considered. Depending on the availability of previous information on the genealogy, paternity or parentage analysis will be applied. The simplest approach to paternity inference, involves parent identification through the exclusion of the remaining candidates. However, this can lead to more than one solution, solvable after application of maximum likelihood procedures. The ability to identify the parents of each offspring depends on the sampling scenario (number of candidate parents and the fraction sampled), on the potential of the markers used (polymorphism, genotyping errors), and on the conformance to theoretical assumptions of the statistical models applied. A large number of paternity programs are freely available. These usually present complementary performances, and there is not the best software for all situations.

When we deal with a single group of individuals belonging to the same generation or that can not be separated into known generations, the aim is just to estimate the degree of genetic relationship between them, usually expressed as the coancestry coefficient. The basic idea is to determine how much of the molecular similarity (Identity By State) is due to the Identity By Descent (the really important parameter). There are two groups of relationship estimators from the molecular information. One of them includes methods directed at estimating coancestry for only a pair of individuals at a time, usually relaying on the knowledge of the allele frequencies of the reference population. Estimators within this group can be further divided into those called Method of Moments Estimators (MME) and those based on Maximum Likelihood (MLE). The other group of methods uses jointly the information of all individuals to determine the more probable population/familiar structure. They perform an explicit reconstruction of the genealogy leading to the observed population (at least for one generation above). Depending on the type of estimator and the assumptions used in their development, each of them presents some advantages and/or limitations which are to be taken into account when choosing the one to use. In the present study, the most relevant estimators are presented and, also, a list of free software which implement them is made available.



1. INTRODUCCIÓN

El estudio de las relaciones de parentesco mediante marcadores genéticos comienza muy tempranamente en humanos mediante el uso de información referente a grupos sanguíneos (WEIR et al. 2006), y más recientemente en los años 70 con la aplicación de polimorfismos cromosómicos (MILKMAN y ZEITLER 1974) y especialmente alozimas (MEAGHER 1986). Con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, se desarrolla toda una gama de marcadores moleculares que combinan la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la capacidad analítica de los secuenciadores automáticos para la separación de fragmentos. Se descubren entonces los marcadores microsatélite, que poseen las características idóneas para el análisis de parentescos (JONES y ARDREN 2003). El desarrollo paralelo de métodos estadísticos específicos da lugar a una enorme profusión de trabajos empíricos y teóricos en este campo, constituyendo un área muy activa de investigación en la actualidad (ANDERSON y GARZA 2006; HADFIELD et al. 2006; WANG 2006).

Una parte sustancial de los desarrollos estadísticos asociados al estudio de las relaciones de parentesco, surge inicialmente para la resolución de problemas relacionados con la biología evolutiva y la ecología molecular. Más que la propia identificación del parentesco, las cuestiones que se plantean son la estimación del flujo génico o el censo efectivo poblacional, los sistemas de apareamiento y cuidado de la prole, etc. (WILSON y FERGUSON 2002; JONES y ARDREN 2003). El escenario muestral y la problemática a resolver no son exactamente los mismos en la Acuicultura, por lo que algunas de las aplicaciones y herramientas desarrolladas tendrán un uso más limitado en este campo. Por otro lado, el estudio de las relaciones de parentesco ha tenido aplicación en mayor medida en Piscicultura, que sigue modelos intensivos de explotación, y menos en la producción de Crustáceos, y especialmente Moluscos, con modelos extensivos o semiextensivos. Por ello, a pesar de que comienzan a publicarse trabajos en estos últimos grupos (TARIS et al. 2005; JERRY et al. 2006a y b; LUCAS et al. 2006), la problemática planteada en este artículo así como las referencias presentadas, estarán centradas en mayor medida en la Piscicultura.



El estudio de las relaciones de parentesco en Acuicultura está relacionada fundamentalmente con la mejora genética de las especies cultivadas y en menor medida con la seguridad alimentaria y medioambiental (HASTEIN et al. 2001; LIU y CORDES 2004). La elevada fecundidad de los organismos acuáticos junto con la aplicación de programas sencillos de selección masal, ha determinado pérdidas de diversidad genética y la aparición de fenómenos de depresión consanguínea en las especies cultivadas (ver Capítulos 4 y 5). La identificación de las familias en los programas de selección es, por tanto crucial para evitar la aparición de estos efectos negativos. Igualmente, con frecuencia se desconocen las relaciones de parentesco entre los reproductores de la planta, bien porque no existe información detallada de sus origen o porque proceden de otras empresas. Usualmente, los reproductores comprados a otras plantas tienen un elevado parentesco al proceder de pocos progenitores. En todos estos casos, el conocimiento del parentesco es necesario, tanto para diseñar los cruzamientos en especies de freza dirigida, como para estabular los reproductores en grupos de mínimo parentesco en las especies de puesta natural (BORRELL et al. 2004; MARTÍNEZ 2005).

Planes de selección familiar se están desarrollando en algo más de 30 especies acuícolas (GJEDREM 2005). Para su desarrollo es indispensable el chequeo de las familias fundadas en las especies con freza dirigida como el rodaballo o el pez gato. El complejo manejo en planta, que implica entre otras actividades el trasvase entre tanques de los peces y la clasificación por tallas de los alevines, incrementa las posibilidades de error, y en consecuencia que las familias no se correspondan con lo planificado. Asimismo, es usual a partir de una cierta talla, la mezcla de familias en los planes de selección para evitar los efectos de ambiente común en la estima de heredabilidades y en el propio proceso de selección (CASTRO et al. 2004). En este caso, la ponderación de las familias para la selección en relación con la intensidad de selección aplicada, precisa de los parentescos entre los individuos seleccionados. Por otro lado, en las especies de puesta natural como la dorada, la lubina o el lenguado, se hace imprescindible la identificación de las familias que coexisten en el mismo tanque, tanto para evaluar la fertilidad y fecundidad de los reproductores, como para aplicar un plan



de selección familiar (DE LEÓN et al. 1998; BOUDRY et al. 2002; FESSEHAYE et al. 2006). Igualmente, en estas especies la estima de heredabilidades para evaluar la conveniencia y método de selección a aplicar a un carácter, depende de la identificación de las familias (VANDEPUTTE et al. 2005; LUCAS et al. 2006; WANG et al. 2006). Un último aspecto importante relacionado con la selección genética, es el mantenimiento de la diversidad a lo largo de las generaciones. Además de mantener un stock de tamaño apropiado, diversos autores han propuesto métodos basados en el coeficiente de parentesco para minimizar las pérdidas de diversidad genética a lo largo de las generaciones (BALLOU y LACY 1995; CABALLERO y TORO 2000; SEKINO et al. 2004).

Finalmente, aspectos colaterales relacionados con la Acuicultura, aunque igualmente importantes, son la trazabilidad alimentaria y el control de los escapes de individuos cultivados al medio natural (WILSON y FERGUSON 2002). La aplicación del análisis de paternidad mediante marcadores puede permitir trazar los individuos con problemas en el mercado (v.g.: toxinas) o localizados en el medio natural, hasta los progenitores de la piscifactoría que los ha producido (HASTEIN et al. 2001; HAYES et al. 2005). Esta situación se presenta también en las plantas de engorde, que normalmente reciben alevines de distintas empresas, y donde la presencia de algún defecto (v.g.: patologías), únicamente puede ser trazada hasta la empresa de origen mediante análisis de paternidad.

2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE MARCADORES Y SU POTENCIAL PARA ANÁLISIS DE PARENTESCO

2.1. Características de los marcadores

En esencia el estudio de las relaciones de parentesco mediante marcadores moleculares se basa en el grado de similitud genética existente entre parientes, que viene determinado por las leyes Mendelianas de la transmisión genética (Figura 1). Así, un progenitor debe compartir con su hijo un alelo para cada locus analizado (idéntico por descendencia), y la identificación de los padres de un descendiente problema es lo que denominaremos análisis de paternidad. Para este análisis, es por tanto



necesario, tener identificados los individuos pertenecientes a dos generaciones consecutivas, la paterna y la filial. El estudio del parentesco en una misma generación, o entre dos individuos cualesquiera, se basará en la estimación de la proporción de alelos idénticos por descendencia que compartan. Así, los hermanos completos compartirán como promedio 1 alelo por locus, aunque en algunos loci no compartan ningún alelo (25%), otros compartan uno (50%) y un tercer grupo comparta los dos (25%). Los procedimientos estadísticos para identificar los progenitores de un individuo (análisis de paternidad), diferirán de la estimación de parentesco entre pares de individuos (análisis de parentesco), y serán tratados en dos secciones independientes en este artículo.

Por otro lado, el parecido genético entre los individuos se estima a partir del parecido alélico y genotípico en los loci analizados, y éste

FIGURA 1.

Genotipos para loci microsatélite de una familia de un plan de selección genética de rodaballo.

FAMILIA 1	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-8	M-14	M-125
MADRE	165183	095097	165167	090134	147151	192198	116138	132136
PADRE	173181	095095	165165	116120	149151	192194	132132	120136
H1	173183	095095	165167	120134	147151	192198	116132	136136
H2	165173	095097	165165	120134	147151	194198	116132	136136
H3	173183	095097	165167	090120	151151	194198	132138	136136
H4	173183	095097	165165	120134	147151	192192	116132	136136
H5	173183	095095	165165	120134	147151	192198	116132	136136
H6	173183	095097	165165	090116	149151	192198	132138	120136
H7	165173	095095	165165	120134	147151	194198	116132	120132
H8	165173	095097	165165	090120	151151	192194	132138	120132
H9	165173	095097	165165	120134	147151	192192	132138	136136
H10	173183	095095	165167	090116	149151	192194	116132	120132
H11	167169	107125	177179	090122	147151	198202	132132	120128

Nótese que los dos progenitores comparten un alelo para todos los loci con cada descendiente, y que los hermanos pueden compartir entre ellos, 0, 1 o los dos alelos en cada locus.

Los genotipos se dan en pares de bases (165183: heterocigoto para alelos de 165 y 183 pb)

Los loci microsatélite (M) aparecen en la fila superior desde M-1 hasta M-125

En el hijo (H) incompatible (H11) se han marcado en amarillo y rojo los loci incongruentes mendelianamente con uno o los dos progenitores, respectivamente.



será identificado mediante el genotipado por su estado (por ejemplo el tamaño en pares de bases de un microsatélite o la movilidad electroforética de un alozima). Así, diferentes individuos podrán compartir alelos en la población bajo estudio (idénticos en estado), aunque no estén relacionados, dependiendo esencialmente de la frecuencia con que se encuentren en la población analizada. La clave del análisis de parentesco dependerá de la capacidad de los métodos estadísticos para estimar la identidad por descendencia entre individuos, a partir de la identidad en estado obtenida del genotipado y de las frecuencias génicas de la población estudiada (WEIR et al. 2006).

En este contexto, la elección del marcador idóneo es esencial para disponer del potencial adecuado. Para ello, deben tenerse en cuenta distintas características o propiedades de las que depende su capacidad para dicho análisis. Entre éstas debemos considerar el polimorfismo, la fiabilidad del genotipado, la dificultad técnica, el modelo de expresión y el coste. En general, a mayor polimorfismo, medido tanto en relación con el número de alelos como con la heterocigosis (ver Capítulos 1 y 2), mayor potencial para el análisis. La fiabilidad del genotipado es otro elemento esencial, ya que la introducción de errores puede originar falsas exclusiones o incrementar el error en la estimación del parecido genético (SANCRISTOBAL y CHEVALET 1997; HOFFMAN y AMOS 2005; CASTRO et al. 2006). El modelo de expresión es también relevante, ya que en los marcadores dominantes no es posible identificar qué alelos portan los individuos de fenotipo dominante, y en consecuencia la capacidad de asignación disminuye notablemente. Los marcadores codominantes son en este sentido, hasta 10 veces más resolutivos (GERBER et al. 2000). Finalmente, el coste y la dificultad técnica son dos aspectos muy relacionados, pudiendo esta última determinar además, un incremento de los errores de genotipado.

Los marcadores microsatélite han sido, desde su descubrimiento, los que se han utilizado de forma generalizada para el análisis de parentesco (HULATA 2001; WILSON y FERGUSON 2002; JONES y ARDREN 2003). Su elevado polimorfismo, expresión codominante, fiabilidad y sencillez técnica, así como su abundancia y ubicuidad genómica, han determinado que hayan sido utilizados para tal fin. Sin embargo, los microsatélites no están exentos de ciertos inconvenientes. Así, la dificultad



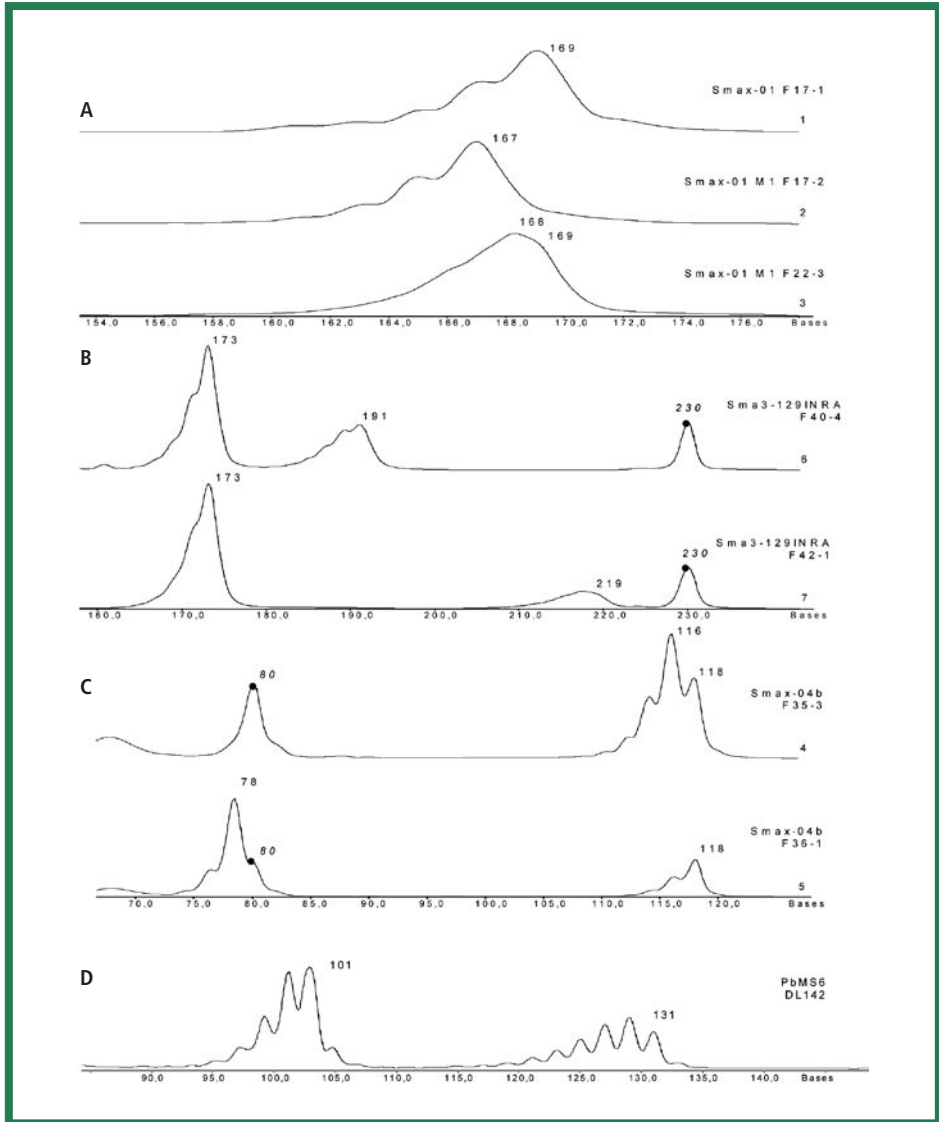
para su obtención no es desdeñable, implicando la construcción de librerías enriquecidas (ZANE et al. 2002) y el chequeo de una proporción importante de clones. La eficiencia en la obtención de microsatélites a partir de estas librerías está normalmente por debajo del 5% (PARDO et al. 2007), con el coste que comporta. Como alternativa, siempre existe la posibilidad de utilizar cebadores de microsatélites de especies filogenéticamente próximas, aunque el éxito de la amplificación cruzada es muy variable y depende en gran medida del grupo que se trate. En peces, se ha observado una elevada conservación interespecífica en salmónidos (ANGERS y BERNATCHEZ 1997), notable en Espáridos (BROWN et al. 2005; PINERA et al. 2006; CASTRO et al. en prensa) y muy baja en Pleuronectiformes (BOUZA et al. 2002; CASTRO et al. 2006).

Otro problema importante asociado con los microsatélites son los errores de genotipado, la presencia de alelos nulos, y más raramente la mutación (MARSHALL et al. 1998; CASTRO et al. 2004; 2006; HOFFMAN y AMOS 2005). Todos éstos determinan un genotipado incorrecto, y por tanto, de su frecuencia dependerá la proporción de asignaciones erróneas. Los errores de genotipado se deben a la presencia de alelos que difieren por 1 pb de alelos adyacentes; al «drop out», que supone la escasa amplificación de los alelos largos en heterocigotos con alelos de talla muy distinta; a la confusión de picos alélicos con estándares internos durante la estimación de las tallas alélicas; o al tartamudeo («stuttering») de la polimerasa durante su amplificación por PCR (Figura 2). Los alelos nulos son ocasionados por la presencia de mutaciones en una de las zonas de unión de los primers, y pueden presentarse en frecuencia elevada en algunos loci (Figura 3; DAKIN y AVISE 2004; CASTRO et al. en prensa). En general, la mayoría de los errores de genotipado o la presencia de alelos nulos conllevan el incorrecto genotipado de individuos heterocigotos, considerados erróneamente como homocigotos. Finalmente, aunque existen microsatélites inestables, con tasas de mutación superiores a 10^{-2} (PRIMMER et al. 1998; BACON et al. 2001), éstas oscilan usualmente entre 10^{-3} y 10^{-5} (SCHLOTTERER 2000), por lo que la fuente de error que introducen es en la práctica despreciable.

Como alternativa a los microsatélites se han barajado los SNPs («single nucleotide polymorphism»), que se deben a polimorfismos puntuales de sustitución nucleotídica (ANDERSON y GARZA 2006; WEIR et

FIGURA 2.

Fuentes de error de genotipado características del análisis con microsatélites



Modificada de Castro et al. (2005).

A) Alelos intermedios; B) Drop out; C) Confusión con un marcador interno; D) «Stuttering»

Los tres primeros casos proceden de tres loci microsatélite de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y el último de dorada (*Sparus aurata*); este ha sido obtenido por amplificación cruzada de un microsatélite de besugo (*Pagellus bogaraveo*).



FIGURA 3.

Familias de rodaballo en las que se muestran dos típicas fuentes de error en la asignación de parentesco asociadas a mutación (familia 2) y alelos nulos (familia 3).

FAMILIA 2	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-8	M-11	M-12	M-14
PADRE	169169	095095	165165	090090	147147	202206	260262	092096	122126
MADRE	165167	125137	165165	116120	147147	194196	258258	088092	124126
H1	165169	095125	165165	090116	147147	196202	258262	092092	122126
H2	167169	095125	165165	090116	147147	194206	258260	092096	122124
H3	167169	095137	165167	090116	147147	194206	258260	092096	124126
H4	165169	095137	165165	090120	147147	194206	258260	088096	122126
H5	165169	095137	165165	090120	147147	194206	258260	088092	126126
H6	167169	095137	165165	090120	147147	194202	258260	092092	126126
H7	167169	095137	165165	090116	147147	194206	258260	088092	122126

FAMILIA 3	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-12	M-125	M-129	M-152
<i>No analizado</i>	<i>167/</i>	<i>095119</i>	<i>179/</i>	<i>088090</i>	<i>151/</i>	<i>092/</i>	<i>128132</i>	<i>167/187</i>	<i>097405</i>
MADRE	152169	095109	165179	116122	147147	090092	128148	173173	095099
H1	152167	095119	165179	088116	147151	090106	128132	187187	095097
H2	167169	095095	165179	090122	147151	092098	128148	167173	095105
H3	152167	109119	165179	090122	147151	092098	128128	167173	097099
H4	152167	095119	165179	088116	147151	090106	128132	187187	095097
H5	152167	095095	179179	088122	147151	092098	128148	187187	095105
H6	167169	095109	179179	088122	147151	090098	132148	173187	099105

Los loci analizados se indican en la fila superior.

En rojo se indican los genotipos de individuos incompatibles con sus progenitores.

En la familia 3 se muestra la posibilidad de deducir el genotipo de un progenitor no analizado mediante análisis mendeliano (genotipos en cursiva).

al. 2006), y los AFLPs (GERBER et al. 2000; EZAZ et al. 2004), cuya base genética es más compleja, detectando tanto sustituciones nucleotídicas como VNTRs («variable number tandem repeats»). Los SNPs son marcadores codominantes, unas 10-20 veces más frecuentes que los microsatélites, con una fiabilidad de genotipado superior y con un coste en torno a 5 veces menor que los microsatélites (HAYES et al. 2005). Como contrapartida suelen ser bialélicos, y en consecuencia su polimorfismo es notablemente menor. Las prestaciones de los SNPs



para análisis de parentesco son probablemente análogas a los microsatélites, siendo la limitación de recursos genómicos en la mayoría de especies acuáticas de interés comercial la que ha limitado su uso como marcadores para parentesco. Por último los AFLPs han sido también utilizados, aunque en menor medida que los microsatélites y SNPs. Su gran ventaja es su bajo coste por locus y la facilidad de su obtención en comparación con los anteriores. En su contra, el ser esencialmente dominantes y mostrar menor fiabilidad de genotipado que los SNPs y microsatélites. Sin embargo, se han desarrollado métodos estadísticos específicos para el análisis de parentesco con AFLPs (GERBER et al. 2000), y se ha evaluado sus prestaciones en relación con microsatélites (EZAZ et al. 2004). En este sentido la preselección de loci en los que el alelo dominante se encuentre a frecuencias entre 0.1 y 0.4, permite mejorar la capacidad de asignación de los AFLPs.

2.2. Potencial estadístico de los marcadores

Aunque el potencial para análisis de parentesco de los marcadores está estrechamente relacionado con el polimorfismo, existen aproximaciones estadísticas más precisas para su evaluación. Esta es obviamente, una cuestión central para obtener el conjunto de marcadores más resolutivos para nuestro análisis. Las aproximaciones tradicionales a esta cuestión están asociadas con el análisis de paternidad (OHNO et al. 1982), y son por otro lado las más utilizadas en la literatura científica. En este sentido, se ha definido el potencial de exclusión de un locus como la capacidad para excluir un falso padre tomado al azar de la población de referencia (normalmente la población de posibles progenitores), cuando el otro progenitor es desconocido (Exclusión 1) o cuando es conocido (Exclusión 2). Naturalmente, el potencial de Exclusión 2 siempre será superior al ser mayores las restricciones mendelianas del sistema analizado (Tabla 1). El análisis depende en esencia del cálculo de la proporción de genotipos que son incompatibles con el padre verdadero. El potencial de exclusión será igual a la suma de las frecuencias de todos los genotipos incompatibles, promediado sobre todos los posibles padres (CHAKRABORTY et al. 1988; SANCRISTOBAL y CHEVALET 1997). El muestreo de genotipos para su cálculo, se realiza asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg a partir de las frecuencias



génicas de la población de referencia. Para incrementar el potencial de exclusión se deben utilizar varios loci. Para el cálculo combinado del potencial sobre varios loci ($P_E(C)$), se asume que los loci segregan independientemente, por lo que se puede estimar a partir del producto de las probabilidades de asignación ($1-P_e$) para los loci analizados (L) según la fórmula:

$$P_E(C) = 1 - \prod_{l=1}^L (1 - P_{e_l})$$

donde P_{e_l} es la probabilidad de exclusión para el locus l th (MARSHALL et al. 1998).

TABLA 1

Valores de diversidad genética y potenciales de exclusión para 10 loci microsatélite en lubina (*Dicentrarchus labrax*).

Locus	Na	He	PIC	Exc ¹	Exc ²
Labrax3	28	0.881	0.870	0.625	0.769
Labrax6	10	0.683	0.635	0.269	0.442
Labrax8	25	0.851	0.838	0.563	0.723
Labrax13	31	0.921	0.914	0.727	0.841
Labrax17	18	0.855	0.837	0.548	0.710
Labrax29	31	0.876	0.866	0.622	0.767
Dla11	16	0.743	0.724	0.381	0.569
Dla12	22	0.920	0.912	0.716	0.835
Dla20	53	0.940	0.935	0.783	0.877
Media/Total	26	0.852	0.837	0.99978	0.999997

Bouza et al. (datos no publicados).

Na: Número de alelos.

He: Heterocigosis esperada.

PIC: Contenido de información polimórfica.

Exc1: Potencial de exclusión 1 (cuando no se conoce ningún progenitor).

Exc2: Potencial de exclusión 2 (cuando se conoce con seguridad un progenitor).

Sin embargo, el método de la probabilidad de exclusión presenta ciertas limitaciones, especialmente cuando se trata de estimar el potencial para análisis de parentesco entre pares de individuos. Además, no introduce en el cálculo los posibles errores de genotipado, ni utiliza toda



la información disponible, particularmente la de los padres compatibles (WANG 2006). GOODNIGHT y QUELLER (1999) propusieron un método más general y potente, aunque no tan inmediato en términos de aplicación informática, para evaluar la «informatividad» de los marcadores. Este se basa en la capacidad de los mismos para discriminar entre dos hipótesis alternativas (primaria y nula). Para ello, se aplica un test basado en la distribución de la razón de probabilidades entre la hipótesis primaria (verdadera) y la hipótesis nula (alternativa) obtenidas por simulación a partir de las frecuencias génicas existentes en la población. En esencia, esta opción nos permite conocer la capacidad de un conjunto de loci para discriminar por ejemplo entre una relación real de hermanos completos, respecto de una supuesta de medios hermanos o no relacionados, en una población específica. Esto posibilita seleccionar los loci apropiados en relación con la problemática que queremos resolver. Posteriormente, WANG (2006) ha perfeccionado este método introduciendo la posibilidad de errores de genotipado y mutaciones, así como utilizando un método más rápido y preciso para determinar la confianza estadística y el potencial sin apoyarse en simulaciones.

3. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

3.1. Estimadores de máxima verosimilitud

Dentro de la estadística paramétrica asumimos que los resultados de un determinado proceso (en nuestro caso las identidades en estado para marcadores entre individuos) son muestras de una variable aleatoria con una distribución conocida (el modelo) que depende de uno o varios parámetros θ (la identidad por descendencia y las frecuencias alélicas de la población de referencia). Cuando dichos parámetros son conocidos se puede construir una función de densidad $f(x | \theta)$ de manera que, *a priori*, podemos saber la probabilidad de obtener un valor concreto. Pero en un problema de estimación (como el que supone determinar el grado de parentesco a partir de datos moleculares), los parámetros del modelo son desconocidos y realizamos la toma de datos precisamente para intentar estimar su valor. Tenemos



ahora unos datos fijos (X_0 , identidades en estado) y podemos definir la verosimilitud de un valor particular de los parámetros (v. g., hermanos) como la probabilidad de haber obtenido esos resultados si el valor de θ fuera ese en concreto, $f(X_0 | \theta)$. La función de verosimilitud $l(\theta | x)$ o $l(\theta)$ es el concepto opuesto a la función de densidad ya que devuelve la probabilidad (o plausibilidad) de valores diferentes de los parámetros condicionado a unos datos fijos.

La verosimilitud permite comparar entre hipótesis alternativas sobre el valor de los parámetros (por ejemplo, H_1 , que uno de los individuos sea padre del otro frente a H_2 , que son no relacionados), de manera que aquel parámetro con la mayor verosimilitud corresponderá con la alternativa más plausible. Habitualmente, las comparaciones se hacen mediante el cociente de verosimilitudes, de manera que la interpretación es más simple porque si $l(\theta_1) / l(\theta_2) = 3$ significará que el valor θ_1 es tres veces más verosímil que su alternativo. Normalmente, se suele trabajar con el logaritmo de la verosimilitud [$L(\theta) = \ln l(\theta)$].

Para encontrar el estimador máximo-verosímil del parámetro de interés podemos calcular la verosimilitud de un rango amplio de valores del mismo (idealmente todos los posibles) y quedarnos con el que mayor verosimilitud presente. Pero si podemos construir la función de verosimilitud y derivarla, sabemos que el máximo estará en el valor que se obtenga al igualar la derivada a cero y despejar el parámetro (si su máximo no está en un extremo de la distribución).

Para dar una idea de la precisión de nuestra estima se pueden calcular intervalos de confianza alrededor del estimador máximo verosímil. En cualquier libro de estadística (por ejemplo el de PEÑA 1994) se puede encontrar una descripción más detallada de los métodos de máxima verosimilitud y la comparación con otros métodos de estimación.

3.2. Estimación Bayesiana

Si se consideran los parámetros como variable aleatoria que depende de unas observaciones o datos fijos se puede obtener su distribución de probabilidad $f(\theta | X_0)$. La probabilidad condicionada de un suceso A dado B es la probabilidad de que se den ambos sucesos sabiendo que el suceso B realmente ha ocurrido. El Teorema de Bayes permite calcular esta probabilidad según la expresión:



$$p(A | B) = \frac{p(B | A) \cdot p(A)}{p(B)}$$

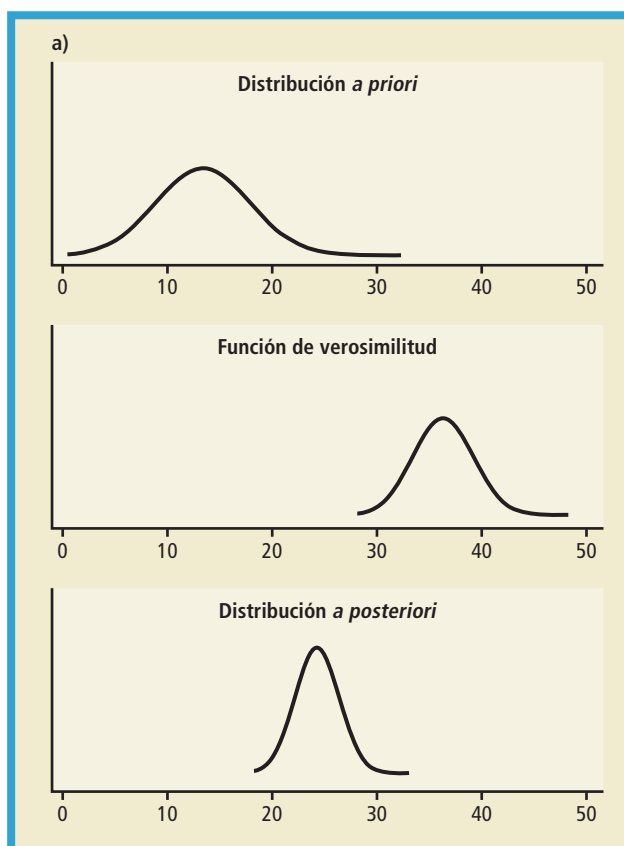
Si trasladamos esta fórmula a la estimación de los parámetros a partir de los datos muestreados tenemos que:

$$f(\theta | X_0) = \frac{f(X_0 | \theta) \cdot f(\theta)}{f(X_0)} = \frac{f(X_0 | \theta) \cdot f(\theta)}{\int f(X_0 | \theta) \cdot f(\theta) d\theta}$$

La lectura de esta expresión nos dice que la distribución final o *a posteriori* depende de la probabilidad de los datos, dado el valor del parámetro (la verosimilitud si lo consideramos función de θ) y de la distribución *a priori* del propio parámetro, reflejo de la información previa que se tenga sobre el proceso. El denominador, no depende de θ , y no afecta a la estimación de los parámetros. De esta manera se podría decir que la distribución posterior es el producto del prior y la verosimilitud y estará situada entre ambas, como se ilustra en la Figura 4a.

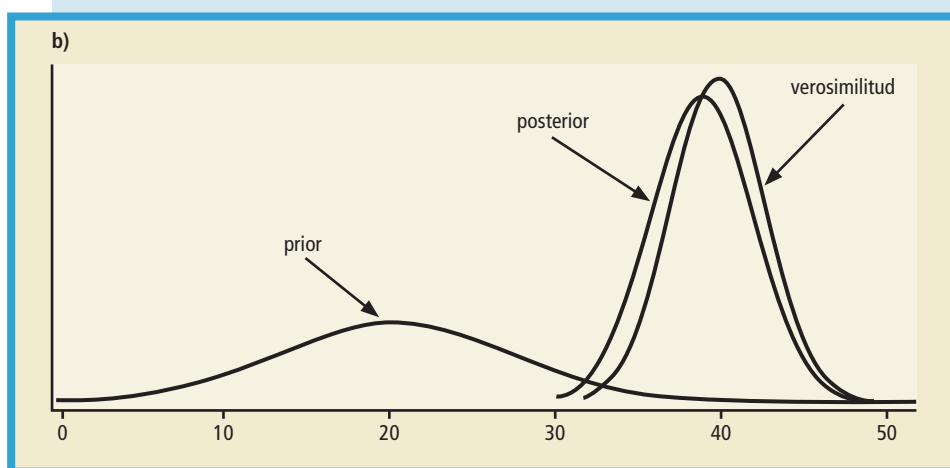
La principal objeción que se hace a la inferencia Bayesiana es que el resultado depende de unas asunciones previas (que pueden incluir los prejuicios del investigador) a través de la probabilidad *a priori*. Para evitar esto siempre se puede utilizar una distribución *a priori* no informativa (por ejemplo una función uniforme para todo el rango de definición del parámetro) y los resultados dependerán de la verosimilitud. Sin embargo, es esta característica precisamente la que hace posible que el enfoque bayesiano pueda procesar información secuencial de una forma más sencilla. Si después de hacer la primera estimación disponemos de una segunda muestra independiente de observaciones podemos rehacer el análisis usando como *a priori* la distribución posterior obtenida con la primera muestra y la verosimilitud de la segunda.

Otra de las ventajas es que la estimación produce toda una distribución, en vez de un valor y un intervalo de confianza como ocurre en la estimación por máxima verosimilitud. Si queremos asignar un valor puntual lo corriente es usar la moda de la distribución posterior, que es el valor más probable. Si optamos por un criterio en el que se minimice el riesgo del estimador a dar valores erróneos (normalmente una función cuadrática) el valor elegido como estima puntual sería la media de la distribución posterior, en vez de la moda.

**FIGURA 4.**

Distribución *a posteriori* como combinación de la información previa (*a priori*) y de la información de los datos (verosimilitud).

b) Con información previa escasa (*a priori* poco informativo) posterior muy similar a la verosimilitud.





Cuanto menor sea la información inicial en relación a la proporcionada por los datos, más se parecerá la distribución posterior a la función de verosimilitud y su moda será más cercana a la estima máximo verosímil (ver Figura 4b). Cuando los tamaños muestrales son grandes los estimadores bayesianos convergen a los estimadores máximo-verosímil, porque la importancia de los datos es mucho más grande que la información previa de la que disponemos. Además la media y la moda de la distribución posterior estarán muy próximas por la normalidad asintótica de esta distribución.

Se puede profundizar más en la metodología bayesiana en el libro escrito por BERNARDO y SMITH (1994).

3.3. Métodos MCMC

En muchas ocasiones los procesos que intentamos describir dependen de más de un parámetro y, consecuentemente, las distribuciones posteriores también lo harán (distribución posterior conjunta). Pero para estimar cada uno de los parámetros tendremos que obtener una distribución posterior dependiente sólo del parámetro concreto, integrando para el resto de parámetros (distribución marginal posterior). Esta integración resulta complicada (si no imposible) por lo que se debe recurrir a algoritmos que permitan obtener las distribuciones marginales sin tenerlas que derivar explícitamente (GELFAND y SMITH 1990). Los métodos MCMC (Markov Chain Monte Carlo) surgen del más primitivo de ellos, el algoritmo de Metropolis-Hastings, siendo el más popular el algoritmo del muestreo de Gibbs. Las cadenas de Markov son sucesiones estocásticas de eventos o estados en los que la probabilidad de un estado concreto es solamente función del estado anterior. El muestreo de Gibbs se basa en este tipo de cadenas, y consiste básicamente en muestrear correlativamente de las distribuciones completas de cada uno de los parámetros, por ciclos, convergiendo esta cadena a la distribución marginal para cada uno de ellos.

Los métodos MCMC también sirven para explorar de una forma más o menos aleatoria un espacio de soluciones factibles muy amplio (por ejemplo, todas las posibles ordenaciones de los individuos en grupos de hermanos) para encontrar la que tiene mayor probabilidad.



3.4. Simulación

Como ya explicábamos en el apartado anterior, en la estimación de relaciones genéticas podemos encontrar operaciones que son difícilmente abordables de forma aritmética y que precisan del uso de otras estrategias. En estos casos una de las herramientas disponibles es la simulación por ordenador. Algunas de estas situaciones, aunque se detallarán en apartados posteriores, pueden ser la determinación de valores de significación para cocientes de verosimilitud, el cálculo de intervalos de confianza para ciertos estimadores o la determinación del punto de corte entre clases de relación adyacentes (por ejemplo, separación entre hermanos y medios hermanos).

Básicamente las simulaciones consisten en generar una serie de individuos virtuales que en cada uno de sus loci llevan alelos con una probabilidad igual a la frecuencia que hemos estimado en la población o que conocemos por otras fuentes. A partir de ellos se generan parejas (o grupos) de descendientes siguiendo las reglas de transmisión Mendeliana, de manera que sabemos las relaciones reales entre cualquiera de estos. A partir de los alelos que portan en sus loci podemos estimar las relaciones y, con muchas parejas de cada tipo, construir una distribución del estimador que permitirá calcular intervalos de confianza y otros valores.

Preferentemente, y si están disponibles, sería mejor simular los parentales virtuales a partir de las frecuencias genotípicas o haplotípicas, porque así se tendría en cuenta en el proceso los posibles desequilibrios de ligamiento entre loci o las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de cada locus.

4. ANÁLISIS DE PATERNIDAD

4.1. Métodos para la asignación de paternidad

El hecho de que cada progenitor comparta necesariamente un alelo por locus con sus descendientes hace posible una aproximación basada en la exclusión, cuestión que no es factible cuando se evalúa el parentesco entre una pareja de individuos cualesquiera. Este mismo hecho posibilita la reconstrucción genotípica de progenitores no muestreados o muertos, y permite asimismo, aproximarse al número

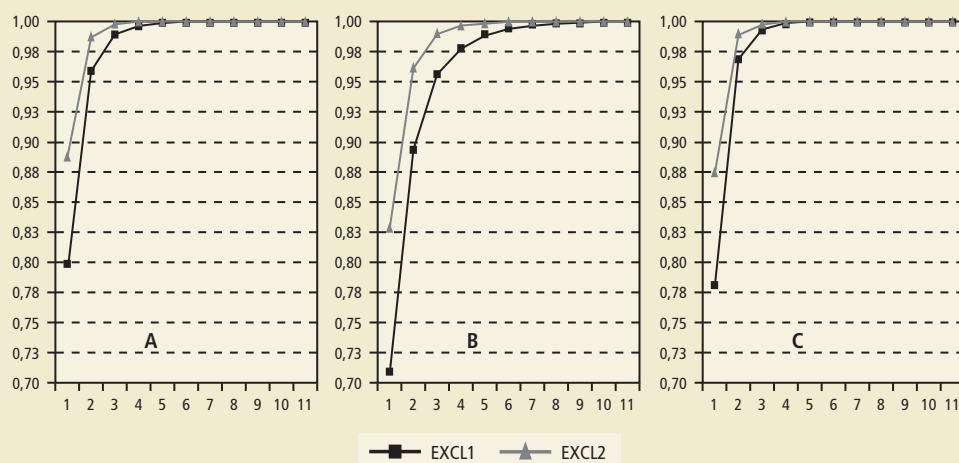


de reproductores que han generado una determinada progenie. Al igual que en el análisis de parentesco, se pueden aplicar también métodos estadísticos de máxima verosimilitud o bayesianos para la asignación de paternidad.

4.1.1. Asignación por exclusión

A primera vista, esta es la solución más atractiva y simple para la asignación de parentesco. Se trata, en definitiva, de llegar a identificar a los padres de un descendiente problema, excluyendo al resto de posibles candidatos mediante la identificación de incompatibilidades mendelianas en alguno de los loci utilizados (Figura 5). Obviamente la capacidad de exclusión dependerá del número de candidatos putativos, del número de loci y de su polimorfismo (WILSON y FERGUSON 2002; JONES y ARDREN 2003). Cuantos más candidatos, mayor número de loci serán necesarios para la exclusión de todos los falsos padres. Sin embargo, esta relación no es lineal, y un locus adicional, compensa un incremento proporcionalmente superior de nuevos candidatos (BERNATCHEZ y DUCHESNE 2000). Finalmente, si conocemos uno de los dos progenitores, la búsqueda del otro será más sencilla (MARSHALL et al. 1998).

Sin embargo, esta aproximación tiene sus limitaciones. En primer lugar, y dependiendo del escenario, es frecuente que con el número de loci manejados no podamos excluir todos los falsos candidatos, y que en consecuencia, tengamos más de dos padres posibles para algunos descendientes (WILSON y FERGUSON 2002). Tengamos en cuenta que el coste de los microsatélites nos aboca a la máxima reducción posible del número de loci, lo cual incrementa la posibilidad de estas situaciones de indefinición (ESTOUP et al. 1998). Por otro lado, el principio de exclusión es válido siempre que no existan errores de genotipado o alelos nulos, lo cual es irreal. El porcentaje de errores de genotipado se sitúa en torno al 2% para microsatélites (ESTOUP et al. 1998; HOFFMAN y AMOS 2005; CASTRO et al. 2004; 2006; en prensa) y la proporción de alelos nulos es variable, pero puede afectar a cerca del 10% de loci microsatélite, y sus frecuencias, aunque suelen estar por debajo del 10%, pueden alcanzar valores del 20% o superiores (DAKIN y AWISE 2004). Ambas circunstancias conducirían a falsas



Modificada de Castro et al. (2005).

A: dorada (*Sparus aurata*); B: rodaballo (*Scophthalmus maximus*); C: lenguado (*Solea senegalensis*).

En abscisas el número de loci utilizados (hasta 11 en todos los casos).

En ordenadas la probabilidad de exclusión de un falso progenitor cuando se desconoce el otro (Excl1) y cuando es conocido (Excl2).

FIGURA 5.

Variación del potencial de exclusión en función del número de loci para tres especies de Peces.

exclusiones o también, aunque menos frecuentemente, a inclusiones erróneas. Por otro lado, y paradójicamente, cuantos más loci manejemos, mayor será la probabilidad de error, y en consecuencia, se incrementarán las falsas exclusiones (MARSHALL et al. 1998). Una posibilidad para evitar éstas, es introducir cierta flexibilidad en el sistema permitiendo un número determinado de incompatibilidades (VANDEPUTTE et al. 2006; TAGGART 2007). Obviamente, esta solución disminuye el potencial de exclusión. En este sentido, la evaluación del mínimo número de loci para asignar correctamente la mayor proporción posible de candidatos es esencial (SLAVOV et al. 2005). En definitiva, la asignación por exclusión presenta un escenario metodológico complejo, y su aplicación será aplicable en contextos muestrales favorables, como veremos más adelante.



4.1.2. Asignación mediante máxima verosimilitud

Como solución al problema del análisis de exclusión se han desarrollado los métodos de máxima verosimilitud (MARSHALL et al. 1998; JONES y ARDREN 2003). En estos no se trata de excluir a los falsos padres, sino de identificar al padre más probable, teniendo en cuenta, además de los genotipos del descendiente y de los posibles progenitores, las frecuencias alélicas de la población de referencia (MEAGHER 1986; MARSHALL et al. 1998). De esta forma se solucionarían las incertidumbres relativas a la existencia de varios padres posibles (ANDERSON y GARZA 2006). Por otro lado, la existencia de errores de genotipado no determinaría la exclusión del progenitor verdadero, que podría seguir siendo la solución más probable. Para el análisis, como en todas las asignaciones de paternidad, debemos considerar que el otro progenitor sea conocido o desconocido. El progenitor más verosímil se obtendrá mediante el logaritmo de la razón de probabilidades («LOD score») de que un individuo sea el padre del descendiente problema, respecto de que lo sea uno tomado al azar de la población de referencia. La probabilidad dependerá de la similitud genética entre el supuesto padre y el descendiente analizado, medida en función del número de alelos que compartan por locus. Esto introducirá un sesgo inevitable en el análisis, ya que los individuos homocigotos tendrán mayor probabilidad de ser progenitores que los heterocigotos, al tener dos copias del alelo compatible con el descendiente problema (JONES y ARDREN 2003). Asumiendo segregación independiente entre los loci, se puede obtener una estima sobre el conjunto de loci analizados, a partir de la suma de sus puntuaciones LOD. Los individuos tomados al azar de la población de referencia se obtendrán a partir de las frecuencias génicas de la misma asumiendo la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg.

Conocer el progenitor más verosímil no es suficiente para establecer la paternidad. Debemos conocer la confianza estadística de ese valor, ya que pueden existir progenitores con probabilidades de asignación muy similares. Las soluciones implementadas por algunos autores tienen en cuenta la diferencia entre el valor LOD más alto y el siguiente (Δ), y obtienen una distribución de probabilidades mediante simulación a partir de las frecuencias génicas de la población de referencia (MARSHALL et al. 1998; GOODNIGHT y QUELLER 1999, GERBER et al. 2000). De esta forma es posible asignar una probabilidad umbral al valor Δ obte-



TABLA 2.

Salida del programa CERVUS para asignación de parentesco siguiendo un procedimiento de máxima verosimilitud.

Progenie	P no exclusion	Prog. Candid.	N loci	N incomp	valor LOD	Δ	Confza
H2	1,59E-04	P1	11	3	2,84E+00	2,69E-01	+
H2	1,59E-04	P2	11	4	2,57E+00	0,00E+00	
H2	1,59E-04	P3	11	2	2,44E+00	0,00E+00	
H3	5,54E-03	P4	11	0	5,22E+00	2,42E+00	*
H3	5,54E-03	P5	11	3	2,80E+00	0,00E+00	
H3	5,54E-03	P6	11	3	2,40E+00	0,00E+00	
H9	5,20E-04	P7	11	1	3,10E+00	2,92E-01	+
H9	5,20E-04	P8	11	3	2,81E+00	0,00E+00	
H9	5,20E-04	P9	11	2	2,09E+00	0,00E+00	

Se muestra el análisis de tres progenitores (H2, H3 y H9) y nueve padres candidatos (P1 a P9) basado en el análisis de 11 loci microsatélite.

P: probabilidad.

N: número.

Prog. Candid.: Progenitores candidatos.

Confza: confianza estadística (+ $P > 80\%$; * $P > 95\%$).

nido en el contexto de la población estudiada. MARSHALL et al. (1998) consideran que valores de Δ superiores al 80% de la distribución son consistentes para la asignación de paternidad en relación a lo observado en poblaciones salvajes (Tabla 2). En otros casos, la información de todos los progenitores es tomada en cuenta para asignar una probabilidad *a posteriori* para cada progenitor siguiendo una aproximación bayesiana (CERCUEIL et al. 2002; SIGNOROVITCH y NIELSEN 2002).

La asignación de máxima verosimilitud puede ser categórica o fraccional (JONES y ARDREN 2003). En la primera, el objetivo es identificar los progenitores verdaderos del descendiente problema. En la asignación fraccionada, la paternidad de cada descendiente se asigna fraccionalmente entre todos los progenitores que tengan valor LOD superior a 0. Aunque parezca un sinsentido desde el punto de vista biológico, la asignación fraccionada ofrece mayor resolución cuando intentamos confirmar hipótesis respecto del éxito reproductivo de determinados grupos de individuos en la población bajo estudio (NIELSEN et al. 2001; DUCHESNE et al. 2002; ARAKI y BLOUIN 2005). Esta aproximación tiene aplicación para



analizar la estructura reproductiva en poblaciones salvajes, aunque puede tener sentido en Acuicultura cuando trabajamos con especies de puesta natural y disponemos de grupos de progenitores de diferentes orígenes o edades entre los que deseamos conocer su éxito reproductivo diferencial.

4.1.3. Reconstrucción genotípica de los parentales

Tal como se indicó anteriormente, el hecho de que cada progenitor comparta un alelo por locus con sus hijos posibilita la reconstrucción genotípica de los mismos, aún cuando no tengamos información de quiénes son, o que hayan muerto (JONES y ARDREN 2003). La reconstrucción es más sencilla cuando se conoce uno de los progenitores (Figura 3), pero es igualmente factible cuando no hay información de los mismos, si la progenie analizada está constituida por familias grandes de medios hermanos y hermanos completos (JONES 2005). Esta opción posibilita asimismo, conocer el número de progenitores responsables de una determinada progenie, únicamente a partir de los datos de ésta (JONES 2001; DUCHESNE et al. 2005). Como ilustración de una aproximación sencilla, el método de locus único, supone que el número mínimo de progenitores es igual al número de alelos del locus más polimórfico dividido por 2. Como veremos, esta cuestión es importante, pues en los procedimientos estadísticos de asignación, una variable clave a tener en cuenta, y que muchos de los programas informáticos solicitan al usuario, es el número total de progenitores y/o la fracción muestreada de los mismos.

4.1.4. Métodos de probabilidad completa

Los modelos de máxima verosimilitud expuestos, no tienen en cuenta información previa de la muestra analizada que podría ser utilizada para asignar el parentesco. En los estudios de ecología molecular, el análisis de parentesco no es más que un medio para conocer parámetros poblacionales relacionados con la estructura reproductiva. En consecuencia, si disponemos de información respecto de qué progenitores son más probables que otros, ésta debería introducirse en el sistema para mejorar la asignación. En acuicultura esta opción podría tener interés, ya que los tanques y fotoperíodos están distribuidos según dimensiones espacio-temporales, y por tanto, no todos los reproductores de la planta tienen la misma probabilidad de ser progenitores de una determinada familia



en la que se ha detectado un error de asignación. NEEF et al. (2001) desarrollaron un modelo bayesiano para introducir la información conocida «a priori» y así poder reducir el espacio de búsqueda de posibles progenitores. Más recientemente HADFIELD et al. (2006) han desarrollado el llamado modelo de probabilidades completas en el que la asignación de parentesco se analiza simultáneamente con la búsqueda de parámetros poblacionales siguiendo un modelo de simulación interactivo.

4.2. Problemática de la metodología estadística

4.2.1. Posibles escenarios en el análisis de paternidad: muestreo

La estrategia a seguir en el análisis de paternidad estará condicionada en parte por el tipo de datos que dispongamos, es decir de nuestro escenario muestral. En Acuicultura las situaciones están más restringidas que lo descrito para poblaciones naturales (JONES y ARDREN 2003). La situación más favorable se da en especies en las que es posible planificar los cruzamientos, como es el caso de los salmónidos o el rodaballo. En estas especies, y si las familias son mantenidas en tanques independientes durante un cierto tiempo, podemos confirmar mediante un muestreo de las progenies, que las familias se corresponden con los progenitores planificados. En estos casos, no se precisa siquiera, de la utilización de programas informáticos, chequeándose la congruencia mendeliana de cada familia manualmente. En especies de estas características con programas de selección, en que las familias se mezclan en tanques comunes, el número de marcadores necesario para identificar los progenitores será bajo, y dependiente del número de familias que se pongan a competir. En rodaballo 2-3 loci suelen ser suficientes para identificar las familias a través de sus progenitores cuando se mezclan 6 familias por tanque (CASTRO et al. datos no publicados).

En las especies de puesta natural, la situación es más compleja, y dependerá en parte del número de reproductores por tanque. En cualquier caso, a diferencia de los análisis en poblaciones naturales, habitualmente se dispone de información de todos o la mayoría de los reproductores. Éstos, a su vez suelen estar subdivididos en tanques, con lo que el número de potenciales reproductores por puesta no suele ser superior



a 50. En estas especies, se desconocen ambos progenitores, por lo que puede ser interesante la búsqueda simultánea de los dos miembros de la pareja, opción recogida en algunos de los programas informáticos (CERCUEIL et al. 2002). Aunque más potente en términos estadísticos, es necesario tomar esta opción con cautela, ya que los errores de genotipado en uno de los dos progenitores impediría la identificación de la pareja.

En todos los casos, a medida que aumente el número de progenitores candidatos se hará necesario aumentar el número de loci para la completa asignación (BERNATCHEZ y DUCHESNE 2000). A diferencia de la situación en la naturaleza, el número de progenitores candidatos es relativamente pequeño, está subdividido en el espacio y en el tiempo, y la gran mayoría de los progenitores son conocidos. Además, es relativamente frecuente poder disponer de familias de hermanos, por lo que se hace posible la reconstrucción genotípica de progenitores no disponibles (descartados o muertos). Por tanto, los requerimientos de muchos de los programas informáticos referidos al número de padres y la fracción muestreada suelen ser variables conocidas, o estimadas con notable fiabilidad en Acuicultura.

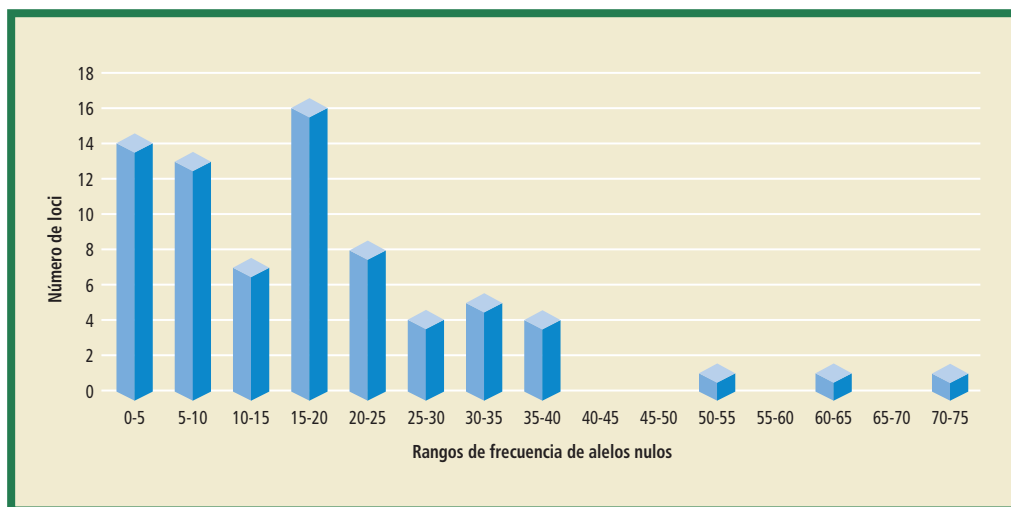
4.2.2. Tratamiento de los problemas técnicos y biológicos

Ya se ha comentado al comienzo de este artículo cuáles son los errores de genotipado asociados a los marcadores, y las fuentes de error relacionadas con las características genéticas de los marcadores. Este apartado estará dedicado a cómo tratar de forma apropiada estos errores, que, por otro lado, están contemplados en gran parte de los programas para análisis de paternidad (JONES y ARDREN 2003). Los alelos nulos, que afectan en mayor medida a los microsatélites, constituyen una de las fuentes de error más importantes a tener en consideración (WILSON y FERGUSON 2002) (Figura 6). Los alelos nulos pueden eliminarse mediante el rediseño de primers, a partir de la secuencia nucleotídica del clon correspondiente (DAKIN y AVISE 2004). Una primera aproximación estadística al problema es utilizar herramientas que nos alerten de los loci que pueden presentar alelos nulos, utilizando datos poblacionales. Los alelos nulos dan lugar a un defecto de heterocigotos en poblaciones panmícticas, y salvo que se trate de una característica general de la población, los loci con alelos nulos a mayor frecuencia,



presentarán déficit de heterocigotos proporcionalmente mayores (BROOKFIELD 1996). Algunos programas diseñados para análisis de paternidad presentan algoritmos para estimar frecuencia de alelos nulos basándose en esta aproximación (MARSHALL et al. 1998). Por otro lado, la detección de alelos nulos será inmediata a partir de datos familiares, debido a la presencia de incompatibilidades homocigoto-homocigoto entre progenitores y descendientes (Figura 3; MARSHALL et al. 1998). Si disponemos de suficientes familias podremos obtener una estima de la frecuencia de nulos muy precisa (CASTRO et al. 2004; DAKIN y AVISE 2004). Una forma de evitar las exclusiones por la presencia de alelos nulos es transformar todos los genotipos homocigotos en heterocigotos para nulos, al menos en aquellos loci en que muestren indicios de su presencia, y especialmente, si utilizamos una aproximación basada en la exclusión. Finalmente, la detección de alelos nulos será mucho más sencilla si disponemos de varios individuos por familia, caso de salmónidos o rodaballo, debido a la reiteración de las incompatibilidades en la misma familia.

FIGURA 6.
Frecuencia de alelos nulos en loci microsatélite.



Modificado de Dakin y Avise (2004).

Se muestra el número de loci con alelos nulos publicados en la literatura científica.

Los rangos de frecuencia se dan en porcentaje.



Ya se ha indicado, que a pesar de tener tasas de mutación muy superiores a las tasas de sustitución nucleotídica, la presencia de incompatibilidades debidas a mutación por la utilización de microsatélites será baja. Según esto, el análisis de miles de genotipos incluirá unas pocas incongruencias debidas a mutación (ELLEGREN 2000). Sin embargo, los errores de genotipado pueden tener niveles de incidencia muy superiores, de un orden similar a los observados para alelos nulos. Particularmente, el «drop out», el «stuttering» y los heterocigotos para alelos consecutivos pueden afectar de forma notable al análisis de paternidad como han puesto de manifiesto distintos autores (CASTRO et al. 2004; 2006; HOFFMAN y AMOS 2005). La reiteración de estos errores facilita su detección, especialmente cuando se dispone de datos familiares, observándose de forma sistemática determinadas incompatibilidades. Esto obliga al reanálisis de los electroferogramas y facilita la detección de los mismos, que en un primer análisis pasaron inadvertidos.

Los diferentes programas tienen usualmente incorporados métodos para evitar la incompatibilidad debida a errores de genotipado y mutaciones, que son tratados de la misma manera. Una de las aproximaciones implica tratar los errores como reemplazamiento del locus completo o del alelo incompatible por un genotipo o alelo, respectivamente, tomado al azar de la población de referencia (MARSHALL et al. 1998; CERCUEIL et al. 2002). Otra forma de abordar el problema es dar una probabilidad al alelo incompatible que sea función de una distribución dependiente de modelos mutacionales específicos, como el modelo de paso («stepwise») o de infinitos alelos, según decida el usuario (SANCRISTOBAL y CHEVALET 1997; DUCHESNE et al. 2005).

4.2.3. Desviaciones de las asunciones teóricas

Como se ha indicado, todas las aproximaciones estadísticas al análisis de paternidad implican una serie de asunciones como son la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg y la segregación independiente entre los marcadores utilizados (WILSON y FERGUSON 2002). La ausencia de panmixia en la población determinará una sobreestimación de los potenciales teóricos de exclusión de los marcadores a aplicar, y en consecuencia, podremos encontrarnos con un potencial de exclusión real, inferior al suministrado por el programa (ESTOUP et al. 1998; CASTRO et al. 2006).



El potencial de exclusión teórico asume también la segregación independiente de los loci manejados, cuestión que casi siempre se desconoce. La presencia de ligamiento cuando se manejan pocos loci podría considerarse muy poco probable. Sin embargo, esta circunstancia ha sido observada en varios estudios (ARDREN et al. 1999; CASTRO et al. 2006; en prensa), debido en parte a que en la obtención de microsatélites se manejan motivos repetidos que se encuentran en los mismos clones de la librería. Las consecuencias negativas del ligamiento están asociadas con la existencia de desequilibrio gamético, tanto más probable, cuanto más próximos se encuentren los loci manejados. Si existe equilibrio gamético, a pesar del ligamiento, éste no debería afectar al potencial de asignación. Incluso, si se conoce la fase de ligamiento, cuestión poco frecuente por otro lado, los loci ligados podrían constituir un superlocus, proporcionando una mayor capacidad de exclusión (JONES et al. 1998). Sin embargo, la capacidad real de asignación dependerá también de los gametos que porten los individuos que han originado la progenie, y es posible que este efecto de muestreo pueda reducir el potencial de exclusión (ANDERSON y GARZA 2006; CASTRO et al. 2006). Como norma, si se dispone de esta información, los loci seleccionados deberían segregar independientemente.

Una última circunstancia que afecta al análisis de paternidad es la existencia de una fuerte estructura familiar entre los progenitores putativos, o especialmente, si entre los posibles progenitores se incluyera un hermano o medio hermano del descendiente problema (ESTOUP et al. 1998; MARSHALL et al. 1998). Esta última circunstancia sería poco probable en Acuicultura siempre que se conozcan las edades de los reproductores, cuestión que no siempre ocurre. En estos casos, el progenitor real puede mostrar valores LOD muy próximos a los de sus parientes, o incluso menores cuando compite con un hermano del descendiente analizado. La mejor solución para estos casos es incrementar el potencial de exclusión incrementando el número de loci, y en general la asignación por exclusión proporcionará mejor resolución que la máxima verosimilitud (Castro et al., en prensa). Obviamente, estas situaciones se evitarían si los reproductores son estabulados acorde a principios de mínimo parentesco.



4.3. Programas informáticos para análisis de paternidad y sus prestaciones

Una de las primeras cuestión que se plantea el investigador es la elección del programa a utilizar entre los muchos disponibles (Tabla 3). No existe el mejor programa para todo, y sí suele ocurrir, que diferentes programas ofrecen prestaciones complementarias (KASUMOVIC et al. 2003). Ya se ha indicado que el conocimiento de los progenitores putativos es conocido con notable precisión en Acuicultura. En consecuencia, programas como PAPA y PASOS con prestaciones relacionadas con la evaluación de la fracción de progenitores muestreada y el grado de precisión de las asignaciones en poblaciones naturales, tienen una aplicación limitada en Acuicultura. Por lo mismo, la especial sensibilidad que muestran algunos programas como CERVUS y FAMOZ a esta variable (MARSHALL et al. 1998; GERBER et al. 2000), no representaría un handicap para su uso. Igualmente, los problemas relativos a la asignación por parejas de otros programas como PAPA y PROBMAX cuando no todos los progenitores han sido muestreados, serían menores. Tengamos en cuenta que estos programas, al buscar los dos miembros de la pareja simultáneamente, serían incapaces de encontrarla cuando uno de los dos progenitores no ha sido muestreado, circunstancia tanto más común cuantos menor sea la fracción de progenitores muestreados (JONES y ARDREN 2003). Aunque aparentemente la reconstrucción de parentales que suministran programas como GERUD (JONES 2005), tiene escasa aplicación en el campo de la Acuicultura, puede proporcionar ayuda, porque siempre hay una pequeña fracción de reproductores que no ha sido muestreada o ha muerto (CASTRO et al. 2004).

En relación con el método de asignación, de nuevo hay que tener presente lo expuesto anteriormente. Al tener disponibles todos los reproductores, los programas como FAP (TAGGART 2007), que aplican principios de exclusión con cierto grado de tolerancia para la asignación, tendrían buenas opciones (VANDEPUTTE et al. 2005). El problema de sobreasignación o asignación incorrecta por no tener disponibles todos los reproductores (DUCHESNE et al. 2005), sería irrelevante. Sin embargo, los programas que se basan en máxima verosimilitud, seguirían siendo perfectamente aplicables, ya que pueden seguir existiendo



más de dos progenitores posibles por descendiente (MARSHALL et al. 1998). En especies de puesta natural donde no hay grupos familiares, la aproximación de máxima verosimilitud constituye la mejor opción, y particularmente, si proveen al usuario del número de incompatibilidades mendelianas, como es el caso del CERVUS, KINSHIP, PATRI y GERUD. Tal como se comentó con anterioridad, los programas de asignación fraccionada estarían limitados a situaciones muy concretas en el campo de la Acuicultura (DUCHESNE et al. 2002; 2005).

Un aspecto importante a considerar en la elección de programa, es el tratamiento que se da a las falsas exclusiones relacionadas con alelos nulos o errores de genotipado (JONES y ARDREN 2003). En este sentido disponer de información previa procedente de análisis poblacionales o familiares es de gran valor, pues nos permite tratar de forma diferente los loci sospechosos de poseer alelos nulos del resto. En este sentido, CERVUS incorpora un algoritmo, que puede ser de gran utilidad, ya que permite al usuario descartar los loci con frecuencias elevadas y estar en guardia frente a aquellos loci con frecuencias inferiores al 5%. Otros programas como PROBMAX (DANZMANN y GHARBI 2001), recodifican todos los homocigotos como heterocigotos para el nulo, evitando de esta manera falsas exclusiones. JONES y ARDREN (2003) consideran esta aproximación como la más conservativa y apropiada cuando se trata de realizar asignaciones categóricas. Sin embargo, CASTRO et al. (2004) sugieren que la aplicación de programas como CERVUS, junto con una buena preparación del usuario, puede ser suficiente, ya que la recodificación incrementaría también las falsas asignaciones. Otros programas como PARENTE, PAPA, FAMOZ y CERVUS, tratan los alelos nulos como errores de genotipado. El problema de esta opción es que el error de genotipado se establece por igual para todos los loci, y esto daría lugar, tomando como referencia la tasa de error la observada en los loci con nulos, a una sobreestima del error en el resto de los loci, incrementando la probabilidad de falsas asignaciones.

Al igual que en el caso de los alelos nulos, el disponer de datos familiares, es de gran ayuda para identificar errores de genotipado sistemáticos producidos por drop out, stuttering o la asignación incorrecta de heterocigotos para alelos consecutivos. Esto nos debe conducir a reanalizar los geles e identificar su causa, poniéndonos en guardia



frente a los mismos, y evitar así las falsas exclusiones. El programa MICRO-CHECKER (VAN OOSTERHOUT et al. 2004) puede ser de gran ayuda para identificar errores sistemáticos de genotipado en microsatélites a partir de datos poblacionales. Se basa en las desviaciones de las distribuciones de homocigotos y heterocigotos por locus para identificar la presencia de alelos nulos, stuttering o drop out. Entre los programas para análisis de parentesco, FAP dispone de una herramienta para la detección de errores sistemáticos de genotipado, que es de gran utilidad (TAGGART 2007). El resto de los programas implementan opciones automáticas que no resuelven por igual todas las situaciones, y que en todo caso suponen opciones conservativas, pero que no evitarían una proporción de asignaciones incorrectas. Así, CERVUS y PARENTE interpretan los errores como reemplazamientos por genotipos o alelos tomados aleatoriamente de la población de referencia teniendo en cuenta las frecuencias génicas de la misma. De esta forma, una asignación será más probable si el error implica un genotipo o alelo frecuentes en la población. Otros programas como PAPA y PASOS, aplican a los errores una probabilidad dependiente de un modelo mutacional concreto, seleccionado por el usuario, preferentemente el modelo de paso (stepwise) en el caso de microsatélites. Finalmente, algunos programas basados en exclusión como FAP o NEWPAT introducen un umbral de tolerancia para determinar la exclusión.

4.4. Aplicación del análisis de paternidad en Acuicultura

En la Tabla 4 se presenta una muestra representativa de las principales publicaciones en Acuicultura, relativa a asignación de paternidad. En ella se destaca en primer lugar el notable incremento en el número de publicaciones en este campo, de manera que en el año 2006 hay tantas publicaciones como en todos los años anteriores. En segundo lugar, aunque la mayoría de los trabajos son en Peces, se detecta un aumento notable en los últimos años en Moluscos y Crustáceos. Los marcadores aplicados son casi exclusivamente microsatélites, pero ya se detecta que en las especies con mayores recursos genómicos, como los salmónidos, empiezan a aparecer publicaciones con SNPs. Es seguro que esta tendencia se acentuará en los próximos años. CERVUS



TABLA 4.
Referencias representativas del análisis de paternidad en Acuicultura.

Especie	Grupo	Marcador	Programa	Tipo análisis	Referencia
<i>Gadus morhua</i>	Peces	Microsatélites	Manual	Asignación de paternidad	Wesmajervi <i>et al.</i> 2006
<i>Pagellus bogaraveo</i>	Peces	Microsatélites	CERVUS	Asignación de paternidad	Lemos <i>et al.</i> 2006
<i>Oreochromis niloticus</i>	Peces	Microsatélites	PAPA	Estructura reproductiva	Fessehayé <i>et al.</i> 2006
<i>Oreochromis niloticus</i>	Peces	Microsatélites/ AFLPs	-	Evaluación ginogenéticos	Ezaz <i>et al.</i> 2004
<i>Clarias gariepinus</i>	Peces	Microsatélites	FAMILY	Programa selección	Volckaert y Hellemans 1999
<i>Morone saxatilis</i> y <i>Morone chrysops</i>	Peces	Microsatélites	Manual	Estimación heredabilidades	Wang <i>et al.</i> 2006
<i>Haliotis asinina</i>	Moluscos	Microsatélites	Manual	Estimación heredabilidades	Lucas <i>et al.</i> 2006
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	Crustáceos	Microsatélites	CERVUS	Asignación de paternidad	Dong <i>et al.</i> 2006
<i>Penaeus monodon</i>	Crustáceos	Microsatélites	CERVUS	Asignación de paternidad	Jerry <i>et al.</i> 2006a
<i>Penaeus japonicus</i>	Crustáceos	Microsatélites	CERVUS	Evaluación crecimiento interfamiliar	Jerry <i>et al.</i> 2006b
<i>Solea senegalensis</i>	Peces	Microsatélites	CERVUS	Asignación de paternidad	Castro <i>et al.</i> 2006
<i>Scophthalmus maximus</i>	Peces	Microsatélites	CERVUS	Asignación de paternidad	Castro <i>et al.</i> 2004
<i>Scophthalmus maximus</i>	Peces	Microsatélites	CERVUS	Evaluación ginogenéticos	Castro <i>et al.</i> 2003
<i>Salmo salar</i>	Peces	Microsatélites/ SNPs	Manual	Asignación de paternidad y análisis de diversidad	Rengmark <i>et al.</i> 2006
<i>Salmo salar</i>	Peces	Microsatélites/ SNPs	Programa propio	Asignación de paternidad y parentesco para trazabilidad alimentaria	Hayes <i>et al.</i> 2005

(Continúa)



(Continuación)

Especie	Grupo	Marcador	Programa	Tipo análisis	Referencia
<i>Cyprinus carpio</i>	Peces	Microsatélites	Programa propio	Estimación heredabilidades	Vandeputte <i>et al.</i> 2005
<i>Crassostrea gigas</i>	Moluscos	Microsatélites	PAPA	Evaluación programa de selección	Taris <i>et al.</i> 2005
<i>Scophthalmus maximus</i>	Peces	Microsatélites	CERVUS PROBMAX	Asignación parentesco	Borrell <i>et al.</i> 2004
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Peces	Microsatélites	Manual	Asignación de parentesco y análisis diversidad	Sekino <i>et al.</i> 2003
<i>Crassostrea gigas</i>	Moluscos	Microsatélites	Manual	Estructura reproductiva	Boudry <i>et al.</i> 2002
<i>Salmo salar</i>	Peces	Microsatélites	KINSHIP	Asignación de parentesco	Norris <i>et al.</i> 2000
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Peces	Microsatélites	Manual	Programa de selección	De León <i>et al.</i> 1998
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Peces	Microsatélites	Manual	Programa de selección	Herbinger <i>et al.</i> 1995

Nota: las referencias constituyen una muestra representativa de las publicaciones para análisis de paternidad en tres de las revistas más relevantes de la Acuicultura.

parece ser el programa de preferencia de la mayoría de los investigadores, aunque la asignación manual es bastante común, y habrá que ver en el futuro la aplicación de programas basados en exclusión con tolerancia, como FAP, que en teoría han sido diseñados pensando en Acuicultura. Finalmente, una parte muy importante de las publicaciones se refieren a la puesta a punto de marcadores microsatélite, aunque también las aplicaciones en el cálculo de heredabilidades, evaluación de la estructura reproductiva y planes de selección en especies de puesta natural son notables.

5. ANÁLISIS DE PARENTESCO

Cuando en el contexto de la genética hablamos de parentesco estamos haciendo referencia, de una forma general, al origen común de



los alelos que poseen dos individuos en un locus determinado. Lo que realmente intentamos detectar o predecir es la aparición de alelos que sean *idénticos por descendencia* (o IBD, *identical by descent*). Que dos alelos sean idénticos por descendencia significa que son copias de un mismo alelo en un ancestro común, en oposición a *idénticos en estado* (IBS o AIS, *identical by state* o *alike in state*) que significa que los dos alelos son iguales aunque provengan de alelos diferentes de la población de referencia. En la Figura 7 se puede ver una representación de ambos conceptos.

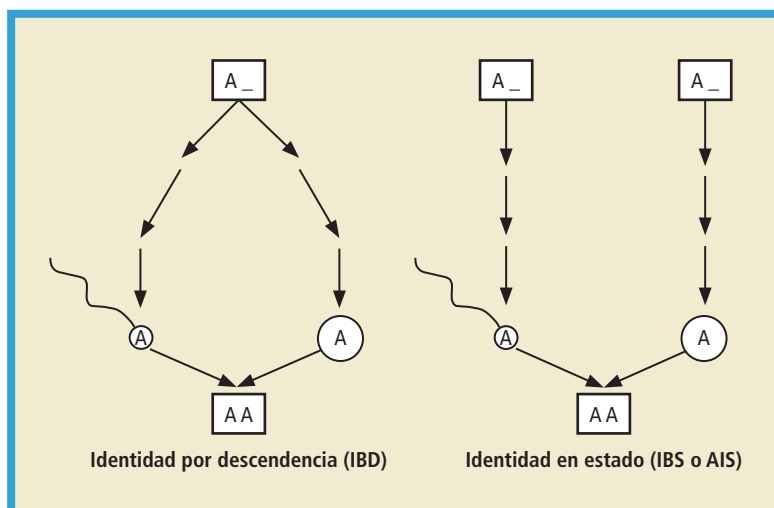


FIGURA 7.
Representación
de la diferencia
entre alelos
*idénticos por
descendencia*
e *idénticos en
estado*.

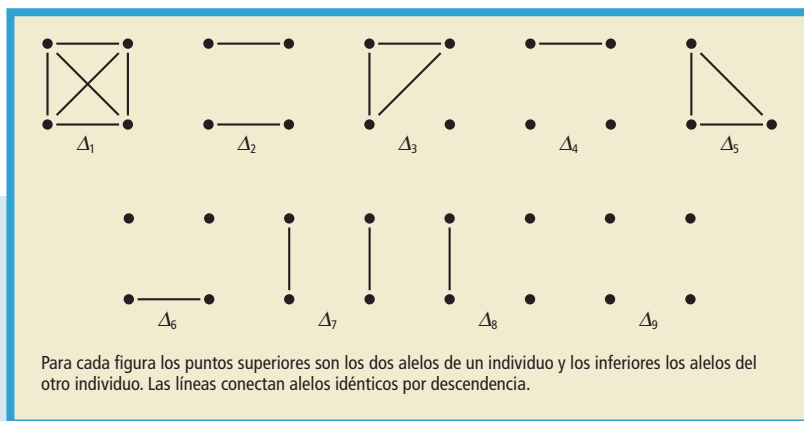
La manera más general y exhaustiva de describir las relaciones entre dos individuos es en términos de los nueve modelos de identidad por descendencia que describió JACQUARD (1970) (ver Figura 8). Se pueden calcular así unos coeficientes $\Delta = (\Delta_1, \Delta_2, \dots, \Delta_9)$ que representan la probabilidad de que los cuatro alelos de cada pareja de individuos tenga ese patrón de IBD.

Otra manera de representar matemáticamente el grado de relación genealógica es mediante las probabilidades de que los genotipos de dos individuos compartan 2 (k_2), 1 (k_1) o 0 (k_0) alelos (THOMPSON 1991).

Habitualmente, el grado de relación genética entre dos individuos se suele resumir usando el coeficiente de parentesco (f o θ , según



FIGURA 8.
Modos de
identidad por
descendencia
entre dos
individuos.



los autores), que ya fue definido por MALECOT (1948) como la probabilidad de que al coger dos alelos al azar en un mismo locus, uno de cada individuo, éstos sean idénticos por descendencia. El coeficiente de parentesco para individuos no consanguíneos es la mitad de la correlación genética aditiva (r), que mide la proporción de alelos idénticos por descendencia por locus entre dos individuos. Algunas metodologías se han desarrollado para estimar r , pero en la mayoría de los casos la transformación entre parámetros es inmediata ($r = 2f$) y por tanto en el texto sólo haremos referencia al estimador de f . Cuando se conoce la genealogía completa, el coeficiente de parentesco se puede calcular fácilmente siguiendo las reglas clásicas (FALCONER y MACKAY 1996) o utilizando métodos tabulares (EMIK y TERRILL 1949). Hay que hacer notar que cuando los dos alelos pertenecen al mismo individuo la probabilidad de que sean IBD es el coeficiente de consanguinidad o de homocigosidad por descendencia del individuo (F), que será igual al parentesco genealógico que existe entre sus padres.

5.1. Información molecular

Cuando no se dispone de la genealogía de la población bajo estudio se debe recurrir a la información que proveen los diferentes marcadores moleculares que se han ido desarrollando. La idea básica es definir una medida del parecido molecular entre individuos, asumiendo que los que mayor número de alelos compartan para los marcadores serán



los que mayor probabilidad tendrán de compartir alelos idénticos por descendencia (BLOUIN, 2003; WEIR et al., 2006). Existen diferentes estrategias y procedimientos de estimación que resumiremos en los siguientes apartados.

5.2. Estimadores por parejas (*pairwise*)

El factor común que presentan estos métodos es que las relaciones se determinan por parejas en base a la información molecular de ambos individuos. La información correspondiente al resto de individuos de la población no se utiliza más que para estimar las frecuencias alélicas.

5.2.1. Parentesco molecular

Este coeficiente resulta de aplicar la definición de MALECOT (1948) a los loci marcadores. Es decir: el parentesco molecular (f_M) entre dos individuos es la probabilidad de que si tomamos en un mismo locus dos alelos al azar, uno de cada individuo, éstos sean iguales (no IBD). El parentesco molecular estará definido entre 0 (cuando en ninguna de las cuatro posibles comparaciones los alelos son iguales) y 1 (cuando todos los alelos son iguales), con sólo dos valores intermedios que corresponden a 0,25 y 0,5. La contribución relativa de cada uno de los alelos de un locus al parentesco molecular se puede calcular por separado y luego sumarse, como se muestra en la Tabla 5 para un locus con tres alelos. Si se dispone de información de varios loci, el parentesco molecular se calcula promediando el valor particular de cada uno de ellos.

TABLA 5.

Contribución de cada uno de los alelos al parentesco molecular entre dos individuos según sus genotipos.

Genotipos	f_{Mi}	f_{Mj}	f_{Mk}	f_M
$A_i A_i, A_i A_i$	1.00	0.00	0.00	1.00
$A_i A_i, A_i A_j$	0.50	0.00	0.00	0.50
$A_i A_i, A_j A_k$	0.00	0.00	0.00	0.00
$A_i A_j, A_i A_j$	0.25	0.25	0.00	0.50
$A_i A_j, A_i A_k$	0.25	0.00	0.00	0.25

El principal problema de esta medida es que sólo expresa IBS por lo que la IBD, que es el parámetro de interés, estará inflada.

5.2.2. Índices de similitud

Originalmente desarrollados para huellas de ADN («DNA fingerprinting»), estos métodos son aplicables para cualquier patrón electroforético en el que se puedan observar bandas diferenciadas. Si tenemos un individuo X en el que se observan n_x bandas y otro Y en el que aparecen n_y bandas de las cuales n_{xy} son comunes, se puede dar una medida de similitud del tipo $S = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y}$ correspondiente al coeficiente de Dice (SNEATH y SOKAL 1973). El rango de este coeficiente oscila entre 0 (no comparten bandas) y 1 (todas las bandas comunes).

Cuando la similitud se calcula a partir de los datos de marcadores codominantes se han propuesto diferentes modificaciones como la de Li et al. (1993) $S = \frac{n_{xy}}{2} \left(\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y} \right)$.

Dichos autores hicieron notar que la esperanza de este índice de similitud es $E(S) = 2f + (1 - 2f)S_0$, donde $S_0 = \sum_{i=1}^n p_i^2 (2 - p_i)$ para un locus con n alelos, donde el alelo i se encuentra a frecuencia p_i en la población de referencia. Esta relación nos permite obtener un primer estimador del parentesco genealógico según la expresión $\hat{f} = \frac{S - S_0}{2(1 - S_0)}$.

Bowcock et al. (1994) sugieren utilizar para análisis multilocus un índice igual al número total de alelos compartidos (un máximo de dos por locus) dividido por dos veces el número de loci genotipados.

5.2.3. Estimadores de Métodos de Momentos (MME)

Para intentar estimar la IBD a partir del parentesco molecular podemos recurrir a la expresión que calcula el valor esperado de dicho parentesco para un alelo concreto i , como $E(f_{Mi}) = f \cdot p_i + (1 - p_i)p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del alelo en la población base o de referencia y f el parentesco genealógico (de IBD). El primer sumando corresponde a la probabilidad de encontrar dos alelos i idénticos por descendencia, mientras que el segundo sumando es la probabilidad de obtener dos alelos iguales en una población en la que la frecuencia del mismo



fuera p_i . Despejando de la fórmula anterior se puede conseguir un sencillo estimador de la IBD debida a un alelo $\hat{f} = \frac{f_{Mi} - p_i^2}{p_i(1 - p_i^2)}$ (RITLAND 1996).

Las estimas para cada uno de los alelos de un locus se pueden promediar de formas diferentes dependiendo de la ponderación (w_i) que elijamos (LI y HORVITZ 1953; RITLAND 1996).

Usando un enfoque diferente, LYNCH y RITLAND (1999) desarrollaron un estimador de parentesco a partir de la probabilidad de observar un genotipo determinado en un individuo probando (Y con alelos k y m) condicionado a que hemos observado otro genotipo en un individuo referencia (X con alelos i y j). Estas probabilidades son proporcionales a la probabilidad de compartir uno y dos alelos, por lo que podemos calcular una estimación del coeficiente de parentesco usando la variable S_{ij} que toma el valor 1 cuando i y j son iguales (independientemente de si están en el mismo o diferente individuo) y $S_{ij} = 0$ si son distintos. Por la idea subyacente de la predicción del genotipo en Y mediante el genotipo en X , a estos métodos se les denomina *estimadores de regresión*. Por su naturaleza son «asimétricos», la estima f_{XY} (X es el referente e Y el probando) no tiene por qué ser igual a f_{YX} , utilizándose como estimador la media aritmética de los dos valores.

Relacionado con el anterior estimador, aunque originalmente desarrollado para estimar el parentesco promedio de un grupo de individuos, el estimador de QUELLER y GOODNIGHT (1989) se formula con los mismos parámetros que el de LYNCH y RITLAND (1999). Este estimador no está definido para loci bialélicos cuando los individuos en estudio son heterocigotos por lo que su uso estaría restringido a loci multialélicos.

WANG (2002) desarrolló un estimador de regresión recalculando las probabilidades de observar parejas de genotipos con diferentes índices de similitud ($S = 1, \frac{3}{4}, \frac{1}{2}$ o 0 correspondientes a la definición de LI et al. 1993, del apartado anterior). En su formulación, P_1 es equivalente a $S = 1$ y P_2 a $S = \frac{3}{4}$. Aunque en ciertas condiciones coincide con los estimadores de QUELLER y GOODNIGHT (1989) y LYNCH y RITLAND (1999), posee mejores propiedades para ciertas situaciones testadas por simulación. Las expresiones concretas para aplicar los estimadores a partir de los datos de un solo locus se pueden encontrar en la Tabla 6a.



TABLA 6a.

Diferentes estimadores para locus único con las ponderaciones correspondientes.

Asunción	Estimador	Referencia
$w_i = p_i(1 - p_i)$	$\hat{f} = \frac{f_{Mi} - \sum_{i=1}^n p_i^2}{1 - \sum_{i=1}^n p_i}$	LI y HORVITZ (1953)
$w_i = \frac{1 - p_i}{n - 1}$	$\hat{f} = \frac{1}{n - 1} \sum_{i=1}^n \frac{f_{Mi} - p_i^2}{p_i}$	RITLAND (1996)
	$\hat{f}_{xy} = \frac{p_i(S_{jk} + S_{jm}) + p_j(S_{ik} + S_{im}) - 4p_i p_j}{2(1 + S_{ij}) + S_{km}(p_i + p_j) - 8p_i p_j}$	LYNCH y RITLAND (1999)
	$\hat{f}_{xy} = \frac{(S_{ik} + S_{im} + S_{jk} + S_{jm}) - p_i - p_j - p_k - p_m}{2 + S_{ij} + S_{km} - p_i - p_j - p_k - p_m}$	QUELLER y GOODNIGHT (1989)
	$\hat{f}_{xy} = \frac{4P_1 + 3P_2 - 2\left(1 + \sum_{i=1}^n p_i^2\right)}{4\left(1 - \sum_{i=1}^n p_i^2\right)}$	WANG (2002)

Cuando se quieren promediar las estimas obtenidos de varios loci las diferencias se presentarán a la hora de qué relación asumimos entre loci y de la ponderación que demos a cada una de ellas. En la Tabla 6b se resumen alguno de los estimadores MME multilocus propuestos.

Comparativas de la precisión de diferentes estimadores MME se pueden encontrar en VAN DE CASTEELE et al. (2001), TORO et al. (2002), WANG (2002) y CSILLÉRY et al. (2006).

5.2.4. Estimadores de Máxima Verosimilitud (MLE)

Si recordamos el concepto de verosimilitud que se explicó en apartados anteriores, una manera de abordar el problema de la estima es calcular la probabilidad de haber obtenido la pareja de genotipos observados (\mathcal{S}_i en la notación de MILLIGAN 2003; ver también HERBINGER et al. 1997; KALINOWSKI et al. 2006) según el grado de relación (Δ) lo que es igual a la verosimilitud de Δ , $L(\Delta) = \Pr(\mathcal{S}_i | \Delta) = \sum \Pr(\mathcal{S}_i | S_j) \Delta_j$, siendo S_j cada uno de los nueve modos de identidad



TABLA 6b.
Diferentes estimadores multilocus con las asunciones implícitas
y las ponderaciones correspondientes.

Estimador unilocus	Asunción	Estimador multiloci	Referencia
LI y HORVITZ (1953)		$\hat{f} = \frac{\sum_{l=1}^N \hat{f}_l}{N}$	TORO <i>et al.</i> (2002)
LI y HORVITZ (1953)	Correlación entre estimas = 1	$\hat{f} = \frac{\sum_{l=1}^N f_{Ml} - \sum_{l=1}^N \sum_{i=1}^n p_{li}^2}{N - \sum_{l=1}^N \sum_{i=1}^n p_{li}^2}$	RITLAND (1996)
RITLAND (1996)	Correlación entre estimas = 0 (wl = nl = 1)	$\hat{f} = \frac{\sum_{l=1}^N \sum_{i=1}^n \frac{f_{Mli} p_{li}^2}{p_{li}^2}}{\sum_{l=1}^N (n_l - 1)}$	RITLAND (1996)
LYNCH y RITLAND (1999)	$w_l = \frac{(1 + S_{ij})(p_i + p_j) - 4p_i p_j}{8p_i p_j}$	$\hat{f} = \frac{1}{\sum_{l=1}^N w_l} \sum_{l=1}^N w_l \hat{f}_l$	LYNCH y RITLAND (1999)
QUELLER y GOODNIGHT (1989)		Suma de los numeradores de los estimadores unilocus dividida por la suma de los denominadores	TORO <i>et al.</i> (2002)

por descendencia explicados en un apartado anterior. Recordando que dichos modos pueden resumirse en los coeficientes k_0 , k_1 y k_2 , y sabiendo que el coeficiente de parentesco en poblaciones no consanguíneas es $f = \frac{1}{4} k_1 + \frac{1}{2} k_2$, podemos calcular la verosimilitud de un valor de parentesco a partir de las expresiones de la Tabla 7, que dependen de las frecuencias de cada alelo en la población (p_i , p_j , p_k , p_m).

Cuando se dispone de información de más de un locus el estimador máximo-verosímil se obtendrá multiplicando las verosimilitudes de cada uno de los loci. En MILLIGAN (2003) se presenta los factores que afectan a la precisión de este tipo de estimadores en comparación con los estimadores MME.



TABLA 7.

Probabilidad de las nueve posibles combinaciones de genotipos en una pareja de individuos dados los modos de identidad por descendencia k_0, k_1, k_2 .

X	Y	k_0	k_1	k_2
$A_i A_i$	$A_i A_i$	p_i^4	p_i^3	p_i^2
$A_i A_i$	$A_i A_j$	$2 p_i^3 p_j$	$p_i^2 p_j$	
$A_i A_i$	$A_j A_j$	$p_i^2 p_j^2$		
$A_i A_j$	$A_i A_i$	$2 p_i^3 p_j$	$p_i^2 p_j$	
$A_i A_j$	$A_i A_j$	$4 p_i^2 p_j^2$	$p_i p_j (p_i + p_j)$	$2 p_i p_j$
$A_i A_i$	$A_j A_k$	$2 p_i^2 p_j p_k$		
$A_j A_k$	$A_i A_i$	$2 p_i^2 p_j p_k$		
$A_i A_j$	$A_i A_k$	$4 p_i^2 p_j p_k$	$p_i p_j p_k$	
$A_i A_j$	$A_k A_m$	$4 p_i^2 p_j p_k p_m$		

5.2.5. Problemas de los estimadores por parejas

Varios son los factores que afectan a la fiabilidad de los estimadores *pairwise*. Todos ellos asumen que los alelos dentro de cada locus están en equilibrio de Hardy-Weinberg y que no existe desequilibrio de ligamiento entre loci. Aunque no se ha evaluado formalmente, todos los autores coinciden que la falta de cumplimiento de estas premisas podría sesgar las estimas.

Uno de los problemas más importantes es que tanto los MME como los MLE precisan del conocimiento de las frecuencias alélicas en la población base o referencia (WANG 2002; TORO et al. 2002; THOMAS 2005). Cuando el número de generaciones desde la misma es reducido y el tamaño poblacional es grande, no se esperan cambios importantes en las frecuencias y la estima obtenida en los mismos individuos de los que estamos calculando su parentesco es aceptable. Pero si ha habido lugar para que actúe la deriva genética (muchas generaciones y/o censos reducidos) las frecuencias se habrán modificado y puede incluso que se hayan perdido alelos. En estas condiciones, y como demostraron TORO et al. (2002), se obtienen infraestimas porque se magnifica la probabilidad de homocigosis en estado de los alelos supervivientes. Los métodos MME pueden llegar a dar valores negativos (fuera del rango lógico) que



son difícilmente interpretables. La correlación de las estimas con los verdaderos valores de parentesco es baja incluso con un número alto de marcadores si las frecuencias que se usan no son las reales. Cuando se conocen las verdaderas frecuencias los estimadores tiene un comportamiento mejor (TORO et al. 2002).

En el plano práctico, la estimación del parentesco entre individuos se suele reducir a decidir entre unos pocos tipos de relación. Por ejemplo, podemos querer decidir si dos individuos son hermanos o no relacionados. Los MLE, por su naturaleza, no tienen problema porque lo único que hay que hacer es encontrar cuál de los grados de relación posee la máxima verosimilitud y clasificar la pareja en ese grupo. Si se quiere comparar entre dos tipos de parentescos concretos (habitualmente comparar un grado de relación con no estar relacionados) se puede calcular el cociente de verosimilitudes. El nivel de significación se puede obtener simulando (con las frecuencias de la población) un número grande de parejas correspondiente al tipo de relación con menor verosimilitud y calcular el cociente de verosimilitudes para cada una de ellas bajo las dos hipótesis. El porcentaje de réplicas que superen el valor observado será la probabilidad de haber clasificado erróneamente la pareja (p -valor).

Por el contrario, los estimadores MME producen estimas en un rango continuo. Es necesario, por tanto, determinar puntos de corte a partir de los cuales cambiará la asignación a grados de parentesco prefijados (Figura 9). Si no poseemos información previa, lo habitual es poner los puntos de corte en los valores medios entre los verdaderos coeficientes de parentesco de cada tipo de relación: 0,0625 para el paso entre no relacionados y medios hermanos y 0,1875 entre medios hermanos y hermanos (ver Figura 10). De esta manera se pretende que la probabilidad de sobreestimar el parentesco sea la misma que la de infraestimarlos (igualar errores de Tipo I y II). Pero si existe un tipo de relación más frecuente los puntos de corte deben desplazarse para asegurar la simetría de los errores de clasificación (MARTÍNEZ et al. datos no publicados). Si existe una estima previa del porcentaje de cada tipo de relación se podría realizar una simulación de un número de parejas de cada tipo proporcional a esos valores y determinar los valores críticos de forma empírica. Así los puntos de corte estarían desplazados hacia las clases menos frecuentes.

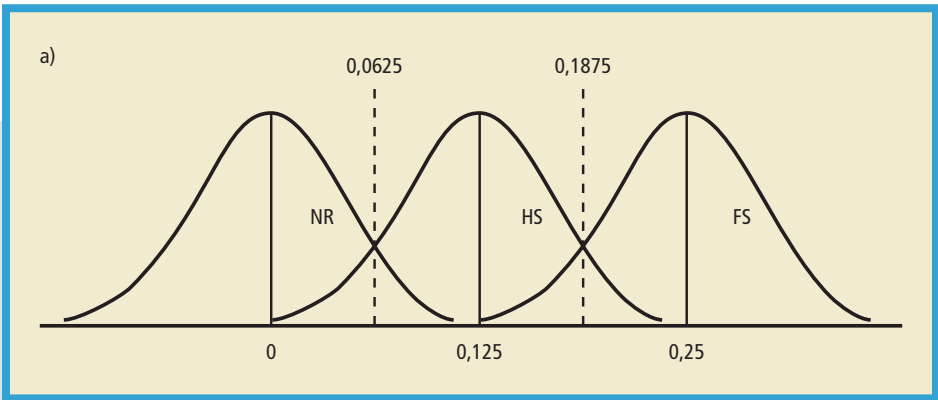


FIGURA 9.

Distribuciones de las estimas obtenidas para parejas de hermanos, medio hermanos o no relacionados, respectivamente, con los puntos de corte utilizados habitualmente.

FIGURA 10.

Relaciones de parentesco entre pares de individuos de un stock de reproductores.

	R3	R5	R6	R8	R10	R13	R14	R19	R21	R23	R1	R4	R7
R3													
R5	-0,0260												
R6	0,1004	0,0907											
R8	0,0153	0,1548	0,1092										
R10	0,1146	0,0461	0,1256	0,1248									
R13	0,3352	0,1020	0,2131	-0,0015	0,1166								
R14	0,1028	0,2278	0,0287	0,2577	0,1031	0,0805							
R19	0,0898	0,1036	0,0603	0,3503	0,1186	0,0678	0,2052						
R21	-0,0305	0,0065	-0,0375	-0,0050	-0,0420	0,0444	0,1209	-0,0135					
R23	0,2921	0,0142	0,1009	-0,0915	0,0832	0,3354	-0,0555	0,0084	0,0033				
R1	0,2725	0,0419	0,0462	-0,1205	-0,0205	0,2891	-0,0090	-0,0250	0,0266	0,3012			
R4	0,0705	0,0335	-0,0475	0,0577	0,0067	-0,0040	0,1415	0,0774	0,0548	-0,0150	-0,1035		
R7	-0,0265	-0,0700	-0,1070	0,0529	-0,0705	-0,0995	0,0056	0,0173	0,0487	-0,0880	-0,1210	0,0830	
R9	-0,0015	0,1077	0,0837	0,2460	0,0583	0,0098	0,1394	0,1845	0,1133	-0,0945	-0,0680	-0,0120	0,0093

Nota: Las parejas de no emparentados se muestran en verde, los medios hermanos en amarillo y los hermanos en rojo. Para la clasificación se han considerado los límites entre no emparentados y medios hermanos en 0.0625, y entre medios hermanos y hermanos en 0.1875.



Un tercer problema que presentan los estimadores *pairwise* es que, al tratar las parejas de forma independiente, puede conducir a asignaciones incongruentes y matrices de parentesco aberrantes (THOMAS y HILL 2000; FERNÁNDEZ y TORO 2006). Por ejemplo, la información molecular puede considerar que los individuos A y B son hermanos y que, por otro lado, los individuos B y C también lo son. Eso no garantiza que A y C se consideren hermanos, lo que sería correcto. Puede que la información molecular nos lleve a clasificar esta última pareja como medios hermanos. RODRÍGUEZ-RAMILO et al. (datos no publicados), evaluando diferentes estimadores por parejas en una población de rodaballo de 560 individuos y genotipada para 11 microsatélites, han observado que los tripletes de hermanos no recíprocos son entre el 68% y el 83% de todos los tripletes de hermanos generados.

THOMAS y HILL (2002) apuntan que otra de las incongruencias que se puede dar en una asignación dos a dos es que se formen grupos de hermanos con genotipos incompatibles con las leyes de transmisión Mendelianas. Por ejemplo, tres individuos de genotipos AA, BB y CC, respectivamente, sabemos que no pueden ser a la vez hermanos, pero en una comparación por parejas no se puede excluir la posibilidad automáticamente.

5.3. Reconstrucción de grupos genealógicos

Este tipo de métodos surgió como alternativa a los métodos de estimación de parentesco por parejas, para aprovechar la información del resto de individuos de la población. Un primer acercamiento lo encontramos en BROWNING y THOMPSON (1999) donde se propone la comparación entre tríos de individuos en vez de parejas. De esa manera, ciertas incompatibilidades de genotipos pueden ser detectadas y los parentescos asignados con mayor corrección. Este método fue ampliado por SIEBERTS et al. (2002) para estimaciones conjuntas de tríos en los que se mezclan hermanos, medios hermanos, gemelos y no relacionados, usando Cadenas de Markov para determinar las probabilidades posteriores de cada tipo de relación.

Generalizando, lo ideal sería utilizar la información de todos los individuos de la población y estimar de forma simultánea todas las relaciones de parentesco. Bajo esta metodología lo que se obtiene es



la estructura global de relaciones y, por tanto, la reconstrucción explícita de la genealogía (al menos en una generación). La contrapartida es que los cálculos que precisan estos métodos son más complejos y computacionalmente costosos. Es por ello que la mayoría de ellos se han restringido a la reconstrucción de familias de hermanos.

ALMUDEVAR y FIELD (1999) presentaron un algoritmo de enumeración de familias factibles, de manera que el objetivo es localizar las familias con el mayor número de componentes posibles. Cuando existen dos configuraciones alternativas con el mismo número de individuos se elige aquella que presente una verosimilitud parcial mayor. Otra manera de obtener soluciones compuestas por familias con el máximo número de integrantes es calcular el *Índice de Simpson* (BUTLER et al. 2004) que para una población de N individuos estructurados en g

grupos de N_i individuos cada uno se define como
$$\frac{\sum_{i=1}^g N_i(N_i - 1)}{N(N - 1)}.$$

Al igual que en el anterior algoritmo se deben usar técnicas Monte Carlo para buscar la configuración que maximice el índice. En ambos casos, los grupos que se forman se testan que son compatibles para los marcadores con la herencia Mendeliana (pueden provenir de una sola pareja).

Otro grupo de métodos que se pueden encontrar en la literatura utilizan también algoritmos MCMC para moverse a través del espacio de todas las configuraciones factibles (es decir, grupos de hermanos genotípicamente compatibles), pero el criterio para decidir la configuración más probable es el valor para una función de los cocientes de verosimilitudes de todas las parejas posibles de individuos (SMITH et al. 2001) o la verosimilitud total conjunta de cada una de las particiones posibles (PAINTER 1997; THOMAS y HILL 2000; EMERY et al. 2001; SMITH et al. 2001). El cálculo de las verosimilitudes de una familia concreta dependerá, al igual que ocurría en los MLE por parejas, de las frecuencias de los diferentes alelos, y también del número de individuos de cada genotipo que agrupemos en esa familia, como se puede ver en la Tabla 8.

Así, se puede ver que una familia en la que cinco miembros sean de genotipo AA y otros cinco sean BB, aunque posible, es mucho menos probable (verosímil) que una familia en la que también existan heterocigotos.



TABLA 8.

Verosimilitudes de familias de hermanos según los genotipos para un locus.

Genotipos	Verosimilitud
AA	$p_A^4 + 4 p_A^3 p_X (1/2)^n + 4 p_A^2 p_X^2 (1/4)^n$
AB	$2[p_A^2 p_B^2 + (1/2)^{nAB} 2(p_A^3 p_B + p_A^2 p_B p_X + p_A p_B^3 + p_A p_B^2 p_X) + (1/4)^{nAB} 4(p_A^2 p_B p_X + p_A p_B^2 p_X + p_A p_B p_X^2)] + (1/2)^{nAB} 4 p_A^2 p_B^2$
AA BB	$4 p_A^2 p_B^2 (1/4)^n$
AA AB	$4 p_A^3 p_B (1/2)^n + 4 p_A^2 p_B^2 (1/4)^{nAA} (1/2)^{nAB} + 8 p_A^2 p_B p_X (1/2)^n$
AA AB BB	$4 p_A^2 p_B^2 (1/4)^{nAA+nBB} (1/2)^{nAB}$
AA BC	$8 p_A^2 p_B p_C (1/4)^n$
AB AC	$4 p_A^2 p_B p_C (1/2)^n + 8 p_A^2 p_B p_C (1/4)^n + 8 p_A p_B p_C p_D (1/4)^n$
AA AB AC	$8 p_A^2 p_B p_C (1/4)^n$
AA AB BC	$8 p_A^2 p_B p_C (1/4)^n$
AB AC BC	$8 p_A^2 p_B p_C (1 - p_X) (1/4)^n$
AA AB AC BC	$8 p_A^2 p_B p_C (1/4)^n$
AC BD	$8 p_A p_B p_C p_D (1/4)^n$
AD AC BC	$8 p_A p_B p_C p_D (1/4)^n$
AC AD BC BD	$8 p_A p_B p_C p_D (1/4)^n$

p_X es la frecuencia de todos los alelos que no aparecen en la familia considerada.

nAB es el número de individuos, en una familia de n miembros, que tienen genotipo AB.

THOMAS y HILL (2002) y WANG (2004b) extendieron estos métodos para considerar también poblaciones con estructura jerárquica (anidada) de familias de hermanos y medios hermanos.

Hemos de hacer notar en este punto que, aunque los métodos expuestos en este apartado tienen claras ventajas sobre los métodos por parejas, siguen adoleciendo de algunos problemas. El primero de ellos es que su uso está limitado a estructuras muy simples (hermanos o medios hermanos) y exigen un conocimiento a priori más o menos detallado de la estructura de la población. Por otra parte, el cálculo de las verosimilitudes precisa del conocimiento de las verdaderas frecuencias de la población (excepto en el caso del estimador basado en el *Índice de Simpson* y el de ALMUDEVAR y FIELD, 1999, que se basa en verosimilitudes parciales). Además, todas las fórmulas están obtenidas bajo la asunción de existe equilibrio de Hardy-Weinberg para los alelos de cada locus y equilibrio de ligamiento entre loci.



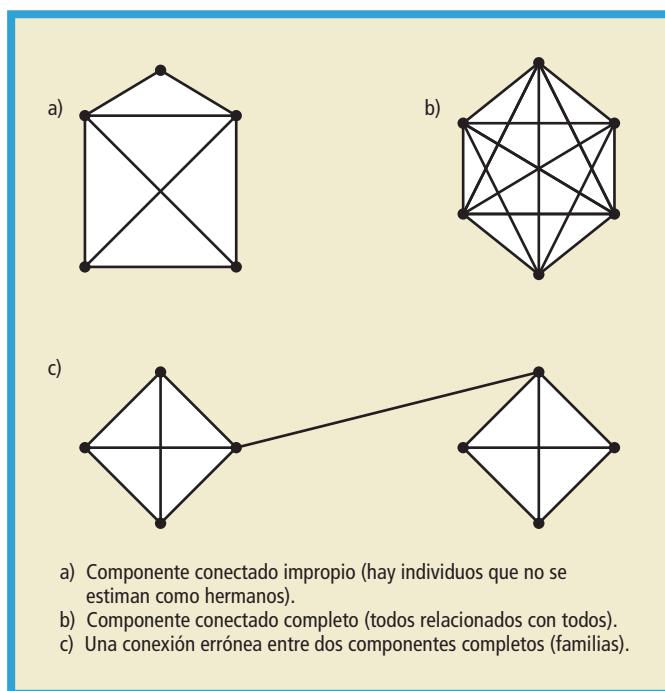
Uno de los últimos métodos desarrollados es el de FERNÁNDEZ y TORO (2006), basado en la observación hecha por TORO et al. (2002) de que, aunque el parentesco molecular de una pareja es una sobreestima, la matriz de parentescos moleculares puede tener una correlación alta con la matriz de parentescos reales. Así propusieron un método que usa un algoritmo del tipo «*simulated annealing*» para buscar en el espacio de todas las configuraciones poblacionales utilizando como criterio de decisión la correlación de la matriz de parentescos calculada con los marcadores con la matriz de parentescos genealógicos de la estructura propuesta. Obviamente, sólo se consideran las configuraciones en las que las familias de hermanos son compatibles para los marcadores. La ventaja de este método es que no necesita el conocimiento de las frecuencias y no hace asunciones acerca del desequilibrio entre o dentro de locus. Además, como los cálculos son más sencillos permite abordar estructuras más complejas (familias no anidadas) e incluso relaciones de grado mayor como primos o hermanos de padres consanguíneos, al poder reconstruir genealogías de más de una generación. La eficiencia de algunos de estos estimadores bajo distintos supuestos ha sido testada por BUTLER et al. (2004) y FERNÁNDEZ y TORO (2006).

Una forma novedosa de abordar el problema de la estimación conjunta de los parentescos de toda una población la propusieron BEYER y MAY (2003). Su método se basa en la teoría de gráficos y representa la población como nodos (cada individuo) que pueden estar unidos por líneas representando que son hermanos. En la Figura 11 se pueden observar diferentes agrupaciones de nodos conectados que constituyen familias de hermanos.

A partir de una configuración inicial determinada en base a los cocientes de verosimilitudes por parejas (GOODNIGHT y QUELLER 1999) se intenta llegar a una estructura en la que los grupos tengan todos los nodos conectados entre sí pero desconectados de los nodos de otras familias, mediante algoritmos gráficos como los de *minimum-cut*.

5.4. Marcadores dominantes

Todos los estimadores presentados hasta el momento (excepto para los primeros índices de similitud) están desarrollados para marcadores codominantes. Pero en ocasiones es mucho más fácil y barato poner

**FIGURA 11.**

Representación gráfica de un grupo de individuos (puntos) con indicación de los que estimamos como hermanos (líneas de unión).

a punto marcadores dominantes en algunas especies. Es por ello que la estimación de parentesco a través de estos marcadores podría ser una buena alternativa.

HARDY (2003) propuso un estimador partiendo de la base de que el parentesco entre dos individuos es proporcional a la correlación de las frecuencias fenotípicas para cada alelo en ambos individuos. Para loci dominantes estas frecuencias sólo pueden ser 0 (ausencia de banda) o 1 (presencia de banda por poseer el alelo dominante). La ventaja de este estimador, además de la naturaleza de los marcadores que puede usar, es que está definido también para situaciones en que la población no está en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo para aprovecharse de esta característica el grado de desviación debe ser conocido (hay que saber, a través de una estima independiente, el coeficiente de consanguinidad promedio de la población).

WANG (2004a) y RITLAND (2005) desarrollaron estimadores del tipo Método de Momentos a partir de los valores esperados de los coefi-



cientes del número de alelos IBD compartidos por dos individuos (k_0 , k_1 , k_2) dependiendo del fenotipo de las parejas para el marcador, que aparecen en la Tabla 9. Hay que hacer notar que esta tabla es equivalente a la Tabla 7, con la diferencia de que ahora las tres únicas posibilidades distinguibles es que ambos individuos presenten banda, que sólo uno presente banda o que ninguno presente banda.

TABLA 9.
Probabilidad de las tres posibles combinaciones de fenotipos en una pareja de individuos dados los modos de identidad por descendencia k_0 , k_1 , k_2 .

X	Y	k_0	k_1	k_2
Recesivo	Recesivo	q^4	q^3	q^2
Dominante	Recesivo	$2(1 - q^2)q^2$	$2q^2 - 2q^3$	
Dominante	Dominante	$2(1 - q^2)^2$	$1 - 2q^2 + q^3$	$1 - q^2$

q es la frecuencia del alelo recesivo.

A partir de estas probabilidades el razonamiento es similar al utilizado en el caso de los estimadores MME desarrollados para marcadores codominantes y las limitaciones de los mismos también (dependencia del conocimiento previo de las frecuencias, asunción de equilibrio entre y dentro de loci, ...).

5.5. Errores de genotipado

Un problema que no puede dejarse de lado es que las inferencias en cualquiera de los estimadores presentados las estamos haciendo a partir de unos datos moleculares que asumimos correctos. Pero los datos moleculares pueden contener errores. Los tipos de errores posibles se enumeraron en un apartado anterior. Además la aparición de mutaciones en el material genético no es despreciable. Estimaciones de las tasas de aparición de diferentes errores se presentan en TALBOT et al. (1995) y EWEN et al. (2000).

En el caso de estimadores pairwise la incorrecta asignación de un genotipo a un individuo afecta al parecido molecular del mismo con los demás, pero su influencia será relativa dependiendo de la cantidad de información de otros loci correctamente genotipados. EPSTEIN et al. (2000)



incluyen en su estimador de máxima verosimilitud la posibilidad de que haya errores asumiendo que cuando observan un alelo igual en dos individuos la probabilidad de que realmente esté mal genotipado es ϵ y de que esté bien genotipado $(1 - \epsilon)$. Se pueden recalcular entonces las probabilidades de ser IBD en función de los genotipos observados.

Sin embargo, los estimadores por grupos son mucho más sensibles a estos errores puntuales, pues pueden provocar que el individuo portador presente un genotipo incompatible con los de su verdadera familia, independientemente de la cantidad de marcadores de los que tengamos datos correctos. Una primera solución es la que proponen FERNÁNDEZ y TORO (2006). La idea es relajar las condiciones de compatibilidad en la formación de grupos de hermanos permitiendo que haya un determinado número de loci para los que se presenten incompatibilidades, con el riesgo de aceptar también asignaciones erróneas de individuos bien genotipados.

WANG (2004b) extendió un modelo similar al de EPSTEIN et al. (2000) para calcular las verosimilitudes de las diferentes configuraciones poblacionales integrando las probabilidades de diferentes tipos de error. A partir de la configuración con la máxima verosimilitud, propone calcular los cocientes de verosimilitud para cada familia y locus, asumiendo que una de las tasas de error es cero o que ambas son cero. De esta manera se pueden detectar aquellos loci en los que es más probable que haya ocurrido un error y a qué tipo corresponde.

El uso de cualquier tipo de información previa (por ejemplo genealógica) es vital para depurar al máximo los datos antes de utilizar cualquier estimador. Esta práctica redundará en la precisión de los estimadores.

5.6. Medidas de precisión

La elección de estimador, aparte de las consideraciones relativas a su naturaleza (pairwise o de grupo, dependiente de frecuencias o no, etc) necesita de alguna medida de precisión o fiabilidad que nos permita comparar bajo diferentes situaciones, cuando se disponga de datos con genealogía o se realice un estudio de simulación.

Si pensamos en el parentesco como valores asociados a cada pareja, parece lógico utilizar el sesgo (diferencia entre el valor estimado y el

verdadero valor) para determinar la «bondad» del estimador. Aunque el valor esperado del parentesco proporcionado por un estimador sea insesgado, puede que una dispersión excesiva de las estimas alrededor de ese valor esperado hagan el estimador poco eficiente. Una de las maneras de medir dicha variabilidad es a través del Error Cuadrático Medio (o su raíz cuadrada; MILLIGAN 2003).

Otra medida de ajuste posible es la correlación existente entre la matriz de parentescos estimados y las relaciones genealógicas para todas las parejas posibles (TORO et al. 2002; FERNÁNDEZ y TORO 2006).

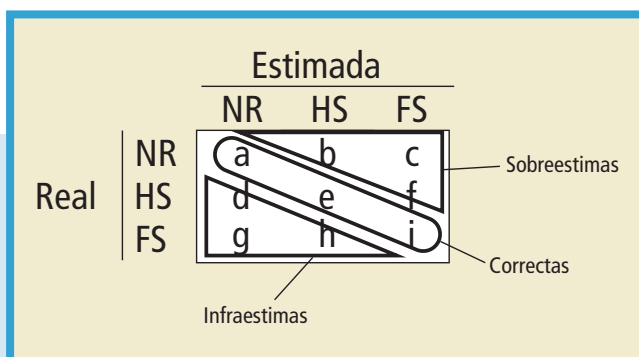
Cuando la relación entre individuos se puede clasificar en tipos de parentesco (habitualmente hermanos, medios hermanos o no relacionados) la precisión del método se puede medir mediante la proporción de parejas asignadas a su verdadero grupo y los errores de clasificación (BLOUIN et al. 1996; THOMAS y HILL 2002; FERNÁNDEZ y TORO 2006). En la Figura 12 se muestran las nueve posibles combinaciones de relación real y relación estimada.

Así se puede determinar la tendencia de un determinado método a sobreestimar o infraestimar y las potencias relativas para detectar tipos de relación concreta. Obviamente, si queremos utilizar esta medida con los estimadores por parejas MME, primero habrá que convertir los valores continuos en grupos cualitativos, con los problemas que ya se apuntaron.

Una comparación más general se puede hacer usando el número de parejas estimadas como hermanos, medios-hermanos o no relacionados y el verdadero número de cada tipo de relación para calcular el

FIGURA 12.

Tipos de asignaciones posibles considerando tres tipos de parentesco: no relacionados (NR), medios hermanos (HS) o hermanos (FS).





valor en un test de Chi-cuadrado. Cuanto mayor sea el valor obtenido peor será el ajuste entre las estimas y la realidad.

SMITH et al. (2001), para el caso de reconstrucción de familias de hermanos, propusieron una medida de ajuste que consiste en determinar el número mínimo de cambios que hay que realizar (individuos que habría que mover) para convertir la estructura estimada en la verdadera estructura poblacional. Una sofisticación del método diferenciaría entre movimientos de individuos aislados y el movimiento de bloques de individuos (por ejemplo, no es lo mismo clasificar en diferentes familias erróneas N individuos que separar una familia correcta en dos familias, una de ellas conteniendo a los N individuos anteriores).

De cualquier manera, y como han puesto de manifiesto diferentes autores (FERNÁNDEZ y TORO 2006; OLIEHOEK et al. 2006), la verdadera comparativa entre estimadores se debería realizar a nivel práctico. Es decir: puede que si queremos usar los parentescos para llevar a cabo un esquema de apareamiento de mínimo parentesco sean menos importantes las sobreestimas, mientras que si los incluimos en una evaluación del mérito genético mediante metodología BLUP sean preferibles las infraestimas. OLIEHOEK et al. (2006) encontraron que el ranking de estimadores usando como criterio la cantidad de diversidad genética mantenida en una población gestionada con contribuciones de mínimo parentesco cambiaba dependiendo de la estructura poblacional y no del número de marcadores y su grado de polimorfismo. En el campo de la acuicultura, PORTA y FERNÁNDEZ (datos no publicados) han comprobado que las diferencias en precisión entre varios estimadores prácticamente desaparecen cuando se utilizan los parentescos para redistribuir los individuos de un stock en tanques de manera que el parentesco promedio de los tanques sea mínimo (se evita apareamiento entre parientes y se iguala la representatividad genética de cada tanque).

5.7. Programas

Existe un amplio abanico de programas informáticos destinados a la estimación de parentesco que implementan mayoritariamente metodologías *pairwise*, aunque ya se han desarrollado varios programas de reconstrucción de genealogías. En la Tabla 10 se presenta un resumen de los programas más relevantes disponibles.



TABLA 10.
Programas disponibles para la estimación del parentesco.

Programa	Limitaciones / Comentarios	Referencia	Página web
Pairwise (ML)			
RELPAIR	Permite ligamiento / Tiene en cuenta errores de genotipado / Admite marcadores del cromosoma X / Admite genealogías probables como input (testar errores de genealogía)	Epstein et al. (2000)	http://www.sph.umich.edu/statgen/boehnke/relpair.html
PREST	Permite ligamiento / Tiene en cuenta errores de genotipado (algunos casos) / Admite genealogías probables como input (testar errores de genealogía)	McPeck y Sun (2000)	http://galton.uchicago.edu/~mcpeek/software/prest/
ECLIPSE (en PANGAEA)	Analiza las relaciones de tríos de individuos / Permite ligamiento / Tiene en cuenta errores de genotipado (algunos casos) / Admite genealogías probables como input (testar errores de genealogía)	Sieberts et al. (2002)	http://www.stat.washington.edu/thompson/Genepi/pangaea.shtml
ML-RELATE		Kalinowski et al. (2006)	http://www.montana.edu/kalinowski/kalinowski_software.htm
Pairwise (MM)			
RELATEDNESS	Sólo para Macintosh / Asume loci no ligados	Queller y Goodnight (1989)	http://www.gsoftnet.us/GSoft.html
KINSHIP	Sólo para Macintosh / Asume loci no ligados	Goodnight y Queller (1999)	http://www.gsoftnet.us/GSoft.html
DELRIIOUS	Requiere el software Mathematica / Asume loci no ligados	Stone y Björklund (2001)	http://www.zoo.utoronto.ca/stone/delrious/delrious.htm
MER	Marcadores dominantes o codominantes	Wang (2002); Wang (2004a)	http://www.zoo.cam.ac.uk/ioz/software.htm
SPAGEDI	Marcadores dominantes o codominantes / Compara diferenciación genética con distancia geográfica	Hardy y Vekemans (2002); Hardy (2003)	http://www.ulb.ac.be/sciences/ecoevol/spagedi.html
Reconstrucción genealogía			
BOREL (en PANGAEA)	Familias de FS (evaluación de verosimilitud)	Painter (1997)	http://www.stat.washington.edu/thompson/Genepi/pangaea.shtml
PRT	Familias de FS (enumeración de grupos compatibles)	Almudevar y Field (1999)	http://www.urmc.rochester.edu/smd/biostat/people/faculty/almudevar.html
PARENTAGE	Familias FS y HS no anidadas / Incorpora información previa disponible / Tiene en cuenta errores de genotipado / Muy lento y poco preciso con poblaciones grandes	Emery et al. (2001)	http://www.mas.ncl.ac.uk/~nijw/

(Continúa)



(Continuación)

Programa	Limitaciones / Comentarios	Referencia	Página web
COLONY	Familias FS anidadas en familias HS / Tiene en cuenta errores de genotipado / Usa los genotipos conocidos de padres	Wang (2004b)	http://www.zoo.cam.ac.uk/ioz/software.htm
MOLCOAN	No necesita estimas de las frecuencias / Familias FS y HS no anidadas (1 generación) u otras relaciones (< 1 generación) / Usa la genealogía conocida / Permite errores de genotipado	Fernández y Toro (2006)	http://www.uvigo.es/webs/c03/webc03/XENETICA/XB2/Jesus/Fernandez.htm

BIBLIOGRAFÍA

- ALMUDEVAR A., y C. FIELD, 1999 Estimation of single-generation sibling relationships based on DNA markers. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* **4**: 136–165.
- ANDERSON, E. C., y J. C. GARZA, 2006 The power of single-nucleotide polymorphisms for large-scale parentage inference. *Genetics* **172**: 2567–2582.
- ANGERS, B., y L. BERNATCHEZ, 1997 Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 230–238.
- ARAKI, H., y M. S. BLOUIN, 2005 Unbiased estimation of relative reproductive success of different groups: evaluation and correction of bias caused by parentage assignment errors. *Mol. Ecol.* **14**: 4097–4109.
- ARDREN, W. R., S. BORER, F. THROWER, J. E. JOYCE y A.R. KAPUSCINSKI, 1999 Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss*. *J. Hered.* **90**: 529–536.
- BACON, A. L., M. G. DUNLOP y S. M. FARRINGTON, 2001 Hypermutable at a poly(A/T) tract in the human germline. *Nucleic Acids Res.* **29**: 4405–4413.
- BALLOU, J. D. y R. C. LACY, 1995 Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed populations, pp. 76–111 en *Population Management for Survival and Recovery*, editado por J. D. Ballou, M. Gilpin y T. J. Foose, Columbia Univ. Press, New York.
- BERNARDO, J. M., y A. F. M. SMITH, 1994 *Bayesian theory*. John Wiley & Sons.
- BERNATCHEZ, L., y P. DUCHESNE, 2000 Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**: 1–12.
- BEYER, J., y B. MAY, 2003 A graph-theoretic approach to the partition of individuals into full-sib families. *Mol. Ecol.* **12**: 2243–2250.



- BLOUIN, M. S., M. PARSONS, V. LACAILLE, Y S. LOTZ, 1996 Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Mol. Ecol.* **5**: 393–401
- BLOUIN, M. S. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *TREE* **18**: 503-511.
- BORRELL, Y. J., J. ALVAREZ, E. VÁZQUEZ, C. F. PATO, C. M. TAPIA, J. A. SÁNCHEZ y G. BLANCO, 2004 Applying microsatellites to the management of farmed turbot stocks (*Scophthalmus maximus* L.) in hatcheries. *Aquaculture* **241**: 133-150.
- BOUDRY, P., B. COLLET, F. CORNETTE, V. HERVOUET y F. BONHOMME, 2002 High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture* **204**: 283-296.
- BOUZA, C., J. CASTRO, P. PRESA, L. SÁNCHEZ y P. MARTÍNEZ, 2002 Allozyme and microsatellite diversity in natural and domestic populations of turbot (*Scophthalmus maximus*) in comparison with other Pleuronectiformes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **59**: 1460-1473.
- BOWCOCK, A. M., A. RUIZ-LINARES, J. TOMFOHRDE, E. MINCH, J. R. KIDD, y L. L. CAVALLI-SFORZA, 1994 High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**: 455-457.
- BROOKFIELD, J. F. Y., 1996 A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol. Ecol.* **5**: 453-455.
- BROWN, R. C., M. TSALAVOUTA, V. TERZOGLU, A. MAGOULAS y B. J. MCANDREW, 2005 Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the Sparidae family. *Mol. Ecol. Notes* **5**: 605-607.
- BROWNING Y THOMPSON 1999 Interference in the analysis of genetic marker data. *Am. J. Hum. Genet. Suppl* **65**: A244
- BUTLER, K., C. FIELD, C. M. HERBINGER, y B. R. SMITH, 2004 Accuracy, efficiency and robustness of four algorithms allowing full sibship reconstruction from DNA marker data. *Mol. Ecol.* **13**: 1589–1600.
- CABALLERO, A., M. A. TORO, 2000 Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genet. Res.* **75**: 331-343.
- CASTRO, J., C. BOUZA, L. SÁNCHEZ, R. M. CAL, F. PIFERRER y P. MARTÍNEZ, 2003 Gynogenesis assessment by using microsatellite genetic markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biotechnol.* **5**: 584-592.
- CASTRO, J., C. BOUZA, P. PRESA, A. PINO-QUERIDO, A. RIAZA, I. FERREIRO, L. SÁNCHEZ y P. MARTÍNEZ, 2004 Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* **242**: 119-135.



- CASTRO, J., A. PINO-QUERIDO, D. CHAVARRÍAS, P. MERINO, I. FERREIRO, A. RIAZA, M. HERMIDA, C. BOUZA, L. SÁNCHEZ y P. MARTÍNEZ, 2005 Asignación de parentescos mediante marcadores microsatélite en rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lenguado (*Solea senegalensis*) y dorada (*Sparus aurata*). pp. 456-457 *X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía (Valencia).
- CASTRO, J., A. PINO, M. HERMIDA, C. BOUZA, A. RIAZA, I. FERREIRO, L. SÁNCHEZ y P. MARTÍNEZ, 2006 A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions. *Aquaculture* **261**: 1194-1203.
- CASTRO, J., A. PINO, M. HERMIDA, C. BOUZA, D. CHAVARRÍAS, P. MERINO, L. SÁNCHEZ y P. MARTÍNEZ, 2007 A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* (En prensa)
- CERCUEIL, A., E. BELLEMAIN y S. MANEL, 2002 PARENTE : computer program for parentage analysis. *J. Hered.* **93**: 458-459.
- CHAKRABORTY, R., T. R. MEAGHER y P. E. SMOUSE, 1988 Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics* **118**: 527-536.
- CSILLÉRY K., T. JOHNSON, D. BERALDI, T. CLUTTON-BROCK, D. COLTMAN, B. HANSSON, G. SPONG, J. M. PEMBERTON, 2006 Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. *Genetics* **173**: 2091-2101
- DAKIN, E. E., y J. C. AVISE, 2004 Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**: 504-509.
- DANZMANN, R., G., 1997 PROBMAX: a computer program for assigning unknown parentage in pedigree analysis from known genotypic pools of parents and progeny. *J. Hered.* **88**: 333.
- DANZMANN, R., G. y K. GHARBI, 2001 Gene mapping in fishes: a means to an end. *Genetica* **111**: 3-23.
- DE LEÓN, F. J. G., M. CANONNE, E. QUILLET, F. BONHOMME y B. CHATAIN, 1998 The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **159**: 303-316.
- DONG, S. R., J. KONG, T. S. ZHANG, X. H. MENG y R. C. WANG, 2006 Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* **258**: 283-288.
- DUCHESNE, P., M. H. GODBOUT y L. BERNATCHEZ, 2002 PAPA (package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. *Mol. Ecol. Notes* **2**: 191-193.
- DUCHESNE, P., T. CASTRIC y L. BERNATCHEZ, 2005 PASOS (parental allocation of singles in open systems): a computer program for individual parental allocation with missing parents. *Mol. Ecol. Notes* **5**: 701-704.



- ELLEGREN, H. 2000 Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.* **16**: 551-558.
- EMERY, A. M., I. J. WILSON, S. CRAIG, P. R. BOYLE y L. R. NOBLE, 2001 Assignment of paternity groups without access to parental genotypes: multiple mating and developmental plasticity in squid. *Mol. Ecol.* **10**: 1265-1278
- EMIK, L. O., y C. E. TERRILL, 1949 Systematic procedures for calculating inbreeding coefficients. *J. Hered.* **40**: 51-55.
- EPSTEIN, M. P., W. L. DUREN, y M. BOEHNKE, 2000 Improved inference of relationship for pairs of individuals. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 1219-1231
- ESTOUP A., K. GHARBI, M. SAN CRISTOBAL, C. CHEVALET, P. HAFFRAY y R. GUYOMARD, 1998 Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**: 715-725.
- EWEN, K. R., M. BAHLO, S. A. TRELOAR, D. F. LEVINSON, B. MOWRY, J. W. BARLOW, y S. J. FOOTE, 2000 Identification and analysis of error types in highthroughput genotyping. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 727-736
- EZAZ, M. T., S. SAYEED, B. J. McANDREW y D. J. PENMAN, 2004 Use of microsatellite loci and AFLP markers to verify gynogenesis and clonal lines in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquac. Res.* **35**: 1472-1481.
- FALCONER, D. S., y T. F. MACKAY, 1996 *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th edn. Longman, Harlow, Essex.
- FERNÁNDEZ, J., y M. A. TORO, 2006 A new method to estimate relatedness from molecular markers. *Mol. Ecol.* **15**: 1657-1667.
- FESSEHAYE, Y., Z. EL-BIALY, M. A. REZK, R. CROOIJMANS, H. BOVENHUIS y H. KOMEN, 2006 Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. *Aquaculture* **256**: 148-158.
- GELFAND, A. E., y A. F. M. SMITH, 1990 Sampling based approaches to calculating marginal densities. *J. Am. Stat. Assoc.* **85**: 398-409.
- GERBER, S., S. MARIETTE, R. STREIFF, C. BODENES y A. KREMER, 2000 Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Mol. Ecol.* **9**: 1037-1048.
- GJEDREM, T., 2005 *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*. Springer, Dordrecht.
- GOODNIGHT, K. F., y D. C. QUELLER 1999 Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Mol. Ecol.* **8**: 1231-1234



- HADFIELD, J. D., D. S. RICHARDSON y T. BURKE, 2006 Towards unbiased parentage assignment: combining genetic, behavioural and spatial data in a Bayesian framework. *Mol. Ecol.* **15**: 3715-3730.
- HARDY, O., 2003 Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Mol. Ecol.* **12**: 1577-1588.
- HARDY, O., y X. VEKEMANS, 2002 SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes*, **2**, 618-620.
- HASTEIN, T., B. J. HILL, F. BERTHE y D. V. LIGHTNER, 2001 Traceability of aquatic animals. *Rev. Sci. Tech. – Off. Int. Épizoot.* **20**: 564-583.
- HAYES, B., A. K. SONESSON y B. GJERDE, 2005 Evaluation of three strategies using DNA markers for traceability in aquaculture species. *Aquaculture* **250**: 70-81.
- HERBINGER, C. M., R. W. DOYLE, C. T. TAGGART, S. E. LOCHMAN, A. L. BROOKER, J. M. WRIGHT, y D. COOK, 1997 Family relationships and effective population size in a natural cohort of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.*, **54**: 11-18.
- HERBINGER, C. M., R. W. DOYLE, E. R. PITMAN, D. PAQUET, K. A. MESA, D. B. MORRIS, J. M. WRIGHT y D. COOK, 1995 DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture* **137**: 245-256.
- HOFFMAN, J. I., y W. AMOS, 2005 Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Mol. Ecol.* **14**: 599-612.
- HULATA, G., 2001 Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* **111**: 155-173.
- JACQUARD, A., 1970 Structures génétiques des populations. Masson & Cie, Paris.
- JERRY, D. R., B. S. EVANS, M. KENWAY y K. WILSON, 2006a Development of a microsatellite DNA parentage marker suite for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **255**: 542-547.
- JERRY, D. R., N. P. PRESTON, P. J. CROCOS, S. KEYS, J. R. S. MEADOWS y Y. T. LI, 2006b Application of DNA parentage analysis for determining relative growth rates of *Penaeus japonicus* families reared in commercial ponds. *Aquaculture* **254**: 171-181.
- JONES, A. G. 2001 GERUD 1.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from progeny arrays using multilocus DNA data. *Mol. Ecol. Notes* **1**: 215-218.



- JONES, A. G. 2005 GERUD 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Mol. Ecol. Notes* **5**: 708-711.
- JONES, A. G., C. KVARNEMO, G. I. MOORE, L. W. SIMMONS y J. C. AVISE, 1998 Microsatellite evidence for monogamy and sex-biased recombination in the Western Australian seahorse, *Hippocampus angustus*. *Mol. Ecol.* **7**: 1497-1505.
- JONES, A. G., y W. R. ARDREN, 2003 Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol. Ecol.*, **12**: 2511-2523.
- KALINOWSKI, S. T., A. P. WAGNER y M. L. TAPER, 2006 ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol. Ecol. Notes* **6**: 576-579.
- KASUMOVIC, M. M., L. M. RATCLIFFE y P. T. BOAG, 2003 A method to improve confidence in paternity assignment in an open mating system. *Can. J. Zool.* **81**: 2073-2076.
- LEMONS, A., A. I. FREITAS, A. T. FERNANDES, R. GONCALVES, J. JESUS, C. ANDRADE y A. BREHM, 2006 Microsatellite variability in natural populations of the blackspot seabream *Pagellus bogaraveo* (Brunnick, 1768): a database to access parentage assignment in aquaculture. *Aquac. Res.* **37**: 1028-1033.
- LI, C. C., y D. G. HORVITZ, 1953 Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Am. J. Hum. Genet.* **5**: 107-117.
- LI, C. C., D. E. WEEKS, y A. CHAKRABARTI, 1993 Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. *Hum. Hered.* **43**: 45-52.
- LIU, Z. J., y J. F. CORDES, 2004 DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**: 1-37.
- LUCAS, T., M. MACBETH, S. M. DEGNAN, W. KNIBB y B. M. DEGNAN, 2006 Heritability estimates for growth in the tropical abalone *Haliotis asinina* using microsatellites to assign parentage. *Aquaculture* **259**: 146-152.
- LYNCH, M., y K. RITLAND, 1999 Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* **152**: 1753-1766.
- MALÉCOT, G., 1948 *Les mathématiques de l'hérédité*. Masson et Cie, Paris.
- MARSHALL, T. C., J. SLATE, L. E. B. KRUUK y J. M. PEMBERTON, 1998 Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* **7**: 639-655.
- MARTÍNEZ, P., 2005 Mejora genética en Acuicultura. En: X Congreso Nacional de Acuicultura, Gandía (Valencia). pp: 436-439.
- MCPEEK, M. S., y L. SUN, 2000 Statistical tests for detection of misspecified relationships by use of genome screen data. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 1076-1094.



- MEAGHER, T. R., 1986 Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. *Am. Nat.* **128**: 199-215.
- MILKMAN, R., y R. R. ZEITLER, 1974 Concurrent multiple paternity in natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **78**: 1191-1193.
- MILLIGAN, B. G., 2003 Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* **163**: 1153-1167.
- NEEF, B. D., J. REPKA y M. R. GROSS, 2001 A Bayesian framework for parentage analysis: The value of genetic and other biological data. *Theor. Popul. Biol.* **59**: 315-331.
- NIELSEN, R., D. K. MATTILA, P. J. CLAPHAM y P. J. PALSBOELL, 2001 Statistical approaches to paternity analysis in natural populations and applications to the North Atlantic humpback whale. *Genetics* **157**: 1673-1682.
- NORRIS, A. T., D. G. BRADLEY y E. P. CUNNINGHAM, 2000 Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmon salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* **182**: 73-83.
- OHNO, Y., I. M. SEBETAN y S. AKAISHI, 1982 A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles. *Forensic Sci. Int.* **19**: 93-98.
- OLIEHOEK P.A., J. J. WINDIG, J. A. M. VAN ARENDONK, P. BIJMA, 2006 Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservation programs. *Genetics* **173**: 483-496
- PAINTER, I., 1997 Sibship reconstruction without parental information. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* **2**: 212-229.
- PARDO, B. G., C. FERNÁNDEZ, M. HERMIDA, A. VÁZQUEZ, M. PÉREZ, P. PRESA, M. CALAZA, J. A. ALVAREZ-DIOS, A. S. COMESAÑA, J. RAPOSO-GUILLÁN, C. BOUZA y P. MARTÍNEZ, 2006 Development and characterization of 248 novel microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genome* **50**: 329-332.
- PEÑA, D., 1994 *Estadística. Modelos y métodos. 1. Fundamentos*. 7.ª ed. Alianza Editorial, Madrid.
- PINERA, J. A., D. Bernardo, G. Blanco, E. Vázquez y J. A. Sánchez, 2006 Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Ecol. Notes* **6**: 33-35.
- PRIMMER, C. R., N. SAINO, A. P. MOLLER y H. ELLEGREN, 1998. Unravelling the processes of microsatellite evolution through analysis of germ line mutations in barn swallows *Hirundo rustica*. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1047-1054.
- QUELLER, D. C., y K. F. GOODNIGHT, 1989 Estimating relatedness using molecular markers. *Evolution* **43**: 258-274.



- RENGMARK, A. H., A. SLETTAN, O. SKAALA, O. LIE y F. LINGAAS, 2006 Genetic variability in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmon salar*) strains estimated by SNP and microsatellites. *Aquaculture* **253**: 229-237.
- RITLAND, K., 1996 Estimators for pairwise relatedness and inbreeding coefficients. *Genet. Res.* **67**: 175-186.
- RITLAND, K., 2005 Multilocus estimation of pairwise relatedness with dominant markers. *Mol. Ecol.* **14**: 3157-3165.
- SANCRISTOBAL, M., y C. CHEVALET, 1997 Error tolerant parent identification from a finite set of individuals. *Genet. Res. Camb.* **70**: 53-62.
- SCHLÖTTERER, C., 2000 Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**: 365-371.
- SEKINO, M., K. SAITOH, T. YAMADA, A. KUMAGAI, M. HARA e Y. YAMASHITA, 2003 Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture* **221**: 255-263.
- SEKINO, M., T. SUGAYA, M. HARA y N. TANIGUCHI, 2004 Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **233**: 163-172.
- SIEBERTS, S. K., E. M. WIJSMAN, E. A. THOMPSON, 2002 Relationship inference from trios of individuals, in the presence of typing error. *Am. J. Hum. Genet.* **70**: 170-180.
- SIGNOROVITCH, J., y R. NIELSEN, 2002 PATRI- paternity inference using genetic data. *Bioinformatics* **18**: 341-342.
- SLAVOV, G. T., G. T. HOWE, A. V. GYAOUROVA, D. S. BIRKES y W. T. ADAMS, 2005 Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: accounting for mistyping. *Mol. Ecol.* **4**: 3109-3121.
- SMITH, B. R., C. M. HERBINGER, y H. R. MERRY, 2001 Accurate partition of individuals into full-sib families from genetic data without parental information. *Genetics* **158**: 1329-1338.
- SNEATH, P. H. A., y R. R. SOKAL, 1973 *The Principles and Practice of Numerical Classifications*. W.H. Freeman, San Francisco.
- STONE, J., y M. BJÖRKLUND, 2001 DELRIIOUS: a computer program designed to analyse molecular marker data and calculate delta and relatedness estimates with confidence. *Mol. Ecol. Notes* **1**: 209-212.
- TALBOT, C. C. JR, AVRAMOPOULS, D., GERKEN, S., CHAKRAVARTI, A., ARMOUR, J. A., MATSUNAMI, N., WHITE, R. y ANTONARAKIS, S. E., 1995 The tetranucleotide repeat polymorphism D21S1245 demonstrates hypermutability in germline and somatic cells. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 1193-1199.



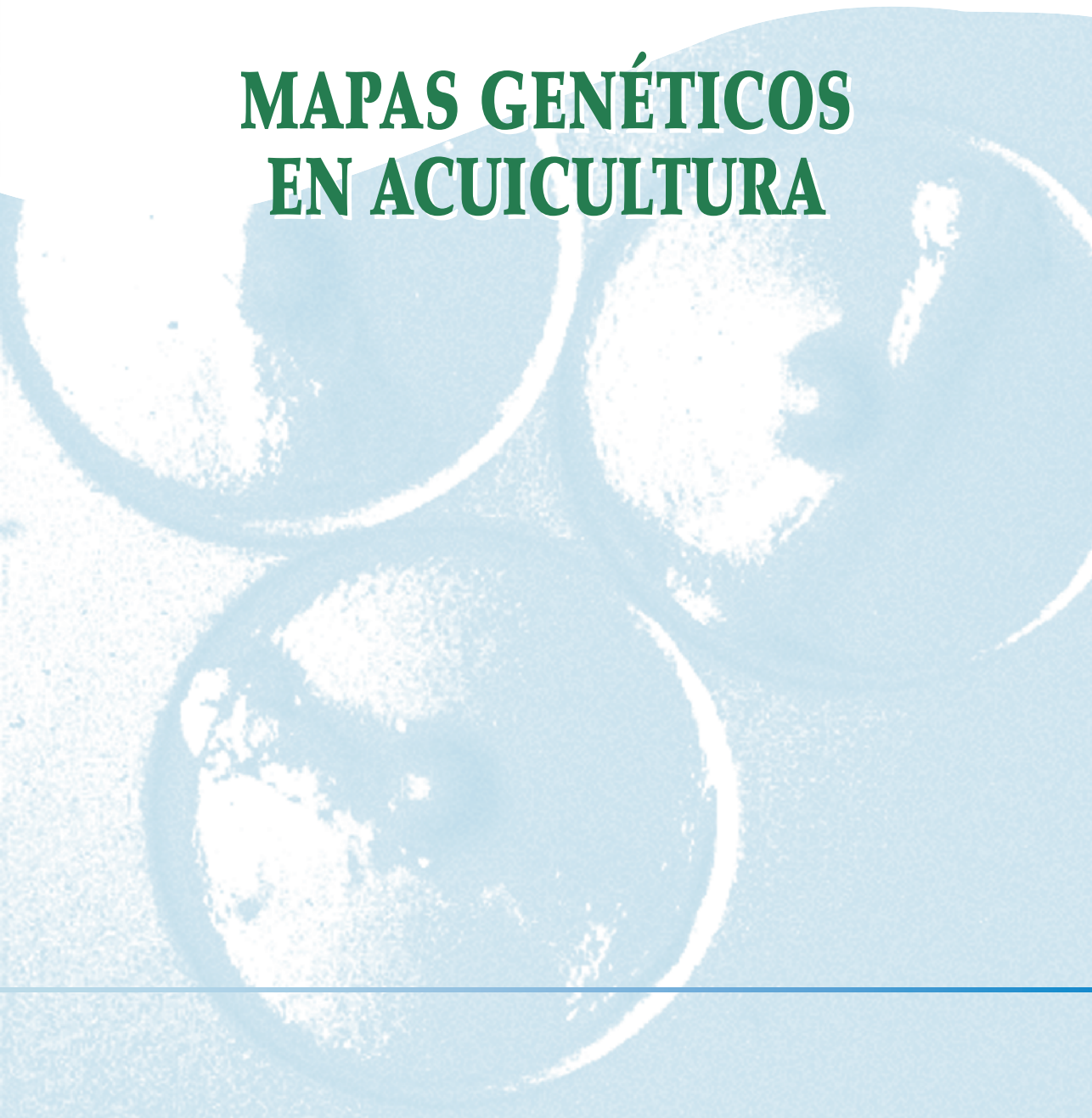
- TAGGART, J. B., 2007 FAP: an exclusion-based parental assignment program with enhanced predictive functions. *Mol. Ecol. Notes* **7**: 412-415.
- TARIS, N., S. BARON, T. F. SHARBEL, C. SAUVAGE y P. BOUDRY, 2005 A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquac. Res.* **36** : 516-518.
- THOMAS, S. C., 2005 The estimation of genetic relationships using molecular markers and their efficiency in estimating heritability in natural populations. *Phil. Trans. R. Soc. B* **360**: 1457-1467.
- THOMAS, S. C., y W. G. HILL, 2000 Estimating quantitative genetic parameters using sibships reconstructed from marker data. *Genetics*, **155**: 1961–1972.
- THOMAS, S. C., y W. G. HILL, 2002 Sibship reconstruction in hierarchical population structures using Markov chain Monte Carlo techniques. *Genetical Research*, **79**: 227–234.
- THOMPSON, E. A., 1991 Estimation of relationships from genetic data. En: *Handbook of Statistics* (editores C. R. Rao, R. Chakraborty), Vol. 8, pp. 255-269. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- TORO, M. A., C. BARRAGÁN, C. ÓVILO, J. RODRIGÁNEZ, C. RODRÍGUEZ, y L. SILLÓ, 2002 Estimation of coancestry in Iberian pigs using molecular markers. *Cons. Genet.* **3**: 309-320.
- VAN DE CAASTELE, T., P. GALBUSERA, y E. MATTHYSEN, 2001 A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Mol. Ecol.* **10**: 1539-1549.
- VAN OOSTERHOUT, C., W. F. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS, y P. SHIPLEY, 2004 MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **4**: 535-538.
- VANDEPUTTE, M., M. KOCOUR, S. MAUGER, M. DUPONT-NIVET, D. DE GUERRY, D. GELA, D. VALLOD, O. LINHART y B. CHEVASSUS, 2005 Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* **247**: 31-32.
- VANDEPUTTE, M., S. MAUGER y M. DUPONT-NIVET, 2006 An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Mol. Ecol. Notes* **6**: 265-267.
- VOLCKAERT, F. A. M., y B. HELLEMANS, 1999 Survival, growth and selection in a communally reared multifactorial cross of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* **171**: 49-64.
- WANG, J., 2002 An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* **160**: 1203–1215.



- WANG, J., 2004a Estimating pairwise relatedness from dominant genetic markers. *Mol. Ecol.* **13**: 3169–3178.
- WANG, J., 2004b Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* **166**: 1963-1979.
- WANG, J., 2006 Informativeness of genetic markers for pairwise relationship and relatedness inference. *Theor. Popul. Biol.* **70**: 300-321.
- WANG, X. X., K. E. ROSS, E. SAILLANT, D. M. GATLIN y J. R. GOLD, 2006 Quantitative genetics and heritability of growth-related traits in hybrid striped bass (*Morone chrysops* female x *Morone saxatilis* male). *Aquaculture* **261**: 535-545.
- WEIR, B. S., A. D. ANDERSON y G. M. HEPPLER, 2006 Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nat. Rev.* **7**: 771-780.
- WESMAJERVI, M. S., J. I. WESTGAARD y M. DELGHANDI, 2006 Evaluation of a novel pentaplex microsatellite marker system for paternity studies in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac. Res.* **37**: 1195-1201.
- WILSON, A. J., y M. M. FERGUSON, 2002 Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications, and practical considerations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **59**: 1696-1707.
- WORTHINGTON WILMER, J., P. J. ALLEN y P. P. POMEROY *et al.*, 1999 Where have all the fathers gone? An extensive microsatellite analysis of paternity in the grey seal (*Halichoerus grypus*). *Mol. Ecol.* **8**: 1417-1429.
- ZANE, L., L. BARGELLONI y T. PATARNELLO, 2002 Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* **11**: 1-16.

8

MAPAS GENÉTICOS EN ACUICULTURA



MAPAS GENÉTICOS EN ACUICULTURA

C. Bouza

Universidad de Santiago de Compostela

P. Martínez

Universidad de Santiago de Compostela

Resumen

El mapeo genético representa un primer nivel de análisis estructural del genoma. Permite establecer diagramas lineales de los cromosomas de una especie, localizando la posición relativa de distintos elementos genéticos anónimos o funcionales, incluyendo genes. Los mapas genéticos representan una primera aproximación para la identificación de mutantes o genes de interés, y, en último término, para su caracterización molecular y funcional. Son, por tanto, herramientas de investigación esenciales en producción animal y vegetal, para estudiar la base genética de enfermedades y caracteres productivos de interés. Además, el análisis de ligamiento proporciona mapas de referencia para desarrollar o completar mapas físicos y proyectos genoma. La relación entre mapas físicos y genéticos no es siempre lineal debido a la existencia de entrecruzamientos múltiples y a la variación de la probabilidad de entrecruzamiento a lo largo del cromosoma. Para solventar este problema, se han propuesto diferentes funciones de mapa con distintas



asunciones sobre el nivel de interferencia cromosómica. En este contexto, cobra especial importancia la localización de los centrómeros, ya que limitan la probabilidad de entrecruzamiento en su proximidad. En organismos acuáticos, el posicionamiento de estas estructuras cromosómicas se realiza mediante el análisis de medias tétradas utilizando ginogenéticos diploides. Además este análisis, proporciona una herramienta más potente para asociar mutantes y marcadores a grupos de ligamiento, para evaluar la existencia de ligamiento entre pares de marcadores o para estudiar el patrón de entrecruzamientos a lo largo del eje cromosómico mediante el análisis de segregación conjunta. El conocimiento preciso de las tasas de recombinación entre sexos, regiones cromosómicas y familias, tiene gran relevancia práctica para el diseño experimental en las especies objeto de análisis genómico. En este artículo se revisan los principales aspectos metodológicos en la construcción de mapas de ligamiento, haciendo énfasis en los datos disponibles en organismos acuáticos. Asimismo, se presentan las principales aplicaciones del mapeo genético para estudios evolutivos y aplicados para la mejora de la producción en acuicultura.

Abstract

Genetic mapping represents a first level of the structural genomic analysis. It enables to establish a diagram of the chromosomes of a species showing the relative position of anonymous and functional genetic elements, including genes. Genetic maps represent a first approach for identifying and isolating mutants or relevant genes, and lastly to ascertain their molecular and functional properties. They are essential for animal and plant production to find out the genetic basis of diseases and other productive traits. In addition, linkage analysis provides the framework maps which are essential as reference for developing and completing physical maps and genomic projects. The relationship between physical and genetic maps is not always linear due to the existence of multiple cross-overs and to the variation of chiasma probability along chromosomes. Different mapping functions have been proposed to solve this problem, with different assumptions about the level of chromosomal interference. In this context, localizing centromeres appears as a relevant task, since they reduce cross-over probability in their



vicinity. In aquatic organisms, locating centromeres is accomplished through half-tetrad analysis using diploid gynogenetic progenies. Additionally, this analysis provides a powerful tool to associate mutants or genetic markers to linkage groups, to evaluate the existence of linkage between pairs of markers, or to obtain a detailed picture of cross-over pattern across chromosomes through joint segregation analysis. Knowledge of the rates of recombination dependent on sex, chromosomal region or family has substantial practical significance for experimental design and genomic analysis in the species of interest. In this paper, we present a review of the main methodological aspects involved in map construction, with particular emphasis in available data from aquatic organisms. In the same way, the main applications of genetic mapping in evolutionary and applied studies for production improvement of aquaculture are presented.

1. INTRODUCCIÓN

El mapeo genético representa una de las principales herramientas del análisis genético para el conocimiento de la organización de los cromosomas y de los genomas (SEWELL *et al.* 1999; DANZMANN y GHARBI 2001). Utilizando un símil geográfico, los mapas permitirían posicionar los distintos tipos de elementos estructurales, físicos y políticos (marcadores genéticos, centrómeros, telómeros) en distintos niveles de organización, desde los continentes (cromosomas de una especie), a países y redes de carreteras (resolución decreciente de regiones dentro de cada cromosoma).

Frente al fuerte progreso de los estudios de genómica estructural y de los mapas genéticos en un amplio rango de especies terrestres, tanto animales como vegetales, los estudios en organismos acuáticos han sido hasta el momento muy limitados (ANDERSON y GEORGES 2004; WANG *et al.* 2007). De las ~25,000 especies de peces, existen mapas genéticos disponibles en menos de 20, incluyendo modelos de investigación (*Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Xiphophorus* spp., *Takifugu rubripes*). La escasez de mapas genéticos es aún más acusada en moluscos (3 de ~80,000 spp.) y crustáceos (4 de ~30,000 spp.). A lo largo de la última década se ha iniciado la construcción de mapas genéticos en



organismos acuáticos de interés comercial, principalmente en peces (DANZMANN y GHARBI 2001; FRANCH *et al.* 2006; WANG *et al.* 2007), así como en unas pocas especies de moluscos y crustáceos (HUBERT y HEDGECOCK 2004; SEKINO y HARA 2007). Los mapas genéticos de ligamiento representan recursos genómicos valiosos de aplicación directa para la mejora de la producción en la acuicultura, permitiendo la identificación de regiones genómicas y genes relacionados con caracteres productivos (ver Capítulo 9). Asimismo, son indispensables para el análisis genómico comparado y para el desarrollo de proyectos genoma en especies de interés (DANZMAN y GHARBI 2001; JAILLON *et al.* 2004; KAI *et al.* 2005; SARROPOULOU *et al.* 2007).

2. CONCEPTOS BÁSICOS DE LIGAMIENTO Y RECOMBINACIÓN

La construcción de mapas genéticos o de ligamiento utiliza el análisis clásico de recombinación para posicionar y ordenar linealmente genes y otro tipo de marcadores sobre grupos de ligamiento (GRIFFITHS *et al.* 2002). Se basa esencialmente en el método propuesto por STURTEVANT (1913) en *Drosophila melanogaster* para estimar la distancia entre pares de genes a partir del porcentaje de recombinantes (Frecuencia de Recombinación, FR). El concepto clásico, todavía vigente, de mapa de ligamiento o mapa genético se basa en la relación directa entre la distancia entre genes y la probabilidad de entrecruzamiento, deducida a partir de la FR. La unidad de mapa (u.m.) o centimorgan (cM) como medida de distancia genética, se correspondería con un 1% de FR. La lógica utilizada consiste en determinar la distancia entre pares de loci ligados, que se suman para estimar la distancia genética total, constituyendo un grupo de ligamiento. El análisis puede expandirse hasta incluir un gran número de loci en tantos grupos de ligamiento como número haploide de cromosomas tenga la especie estudiada.

Sin embargo, la distancia de mapa entre dos loci ligados no siempre está relacionada de forma lineal con la FR observada. En primer lugar, los entrecruzamientos dobles y múltiples que tienen más probabilidad de ocurrir entre genes distantes no contribuyen proporcionalmente a la FR. Esta relación es además dependiente del grado de interferencia



cromosómica (ausencia de independencia entre sucesos de entrecruzamiento simultáneos; ver apartado 5). Para solventar estos problemas surgen las funciones de mapa. Éstas tratan de establecer la relación entre la distancia genética y la FR observada entre genes (Figura 1). Se han propuesto diferentes funciones con distintas asunciones acerca del nivel de interferencia cromosómica, que depende de la distancia existente entre marcadores, de la especie e incluso de la región cromosómica considerada (OTT 1999; ZHAO Y SPEED 1996; NUEZ 2000; SAKAMOTO *et al.* 2000). Bajo interferencia completa ($i = 1$), la relación lineal se mantendría hasta la distancia de 50 cM, valor máximo de FR, que no supera este valor independientemente de la distancia considerada.

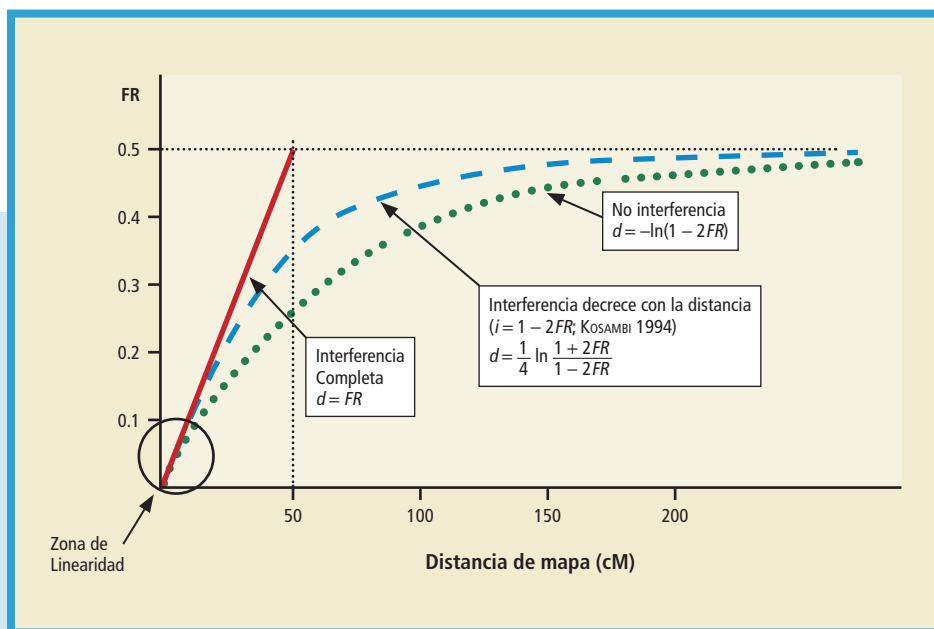


FIGURA 1.

Funciones de mapa: Relación entre la frecuencia de recombinación observada (FR) y la distancia genética de mapa (en cM) entre pares de marcadores. La distancia de mapa (d) equivaldría a la mitad del número promedio de entrecruzamientos expresado en porcentaje. Se presentan tres funciones de mapa con diferentes asunciones sobre el nivel de interferencia.
(Modificada de HARTL y JONES 1998).



Asumiendo ausencia de interferencia ($i = 0$), la función matemática se ajustaría a una distribución de Poisson. Cualquier función de mapa que considere la existencia de interferencia discurrirá en el intervalo entre estas dos relaciones extremas. Entre ellas, una de las más sencillas y utilizadas en las últimas décadas en un amplio rango de organismos es la función de KOSAMBI (1944) que asume una disminución lineal de la interferencia a medida que aumenta la distancia genética ($i = 1 - 2r$). Dado que la mayoría de las funciones son casi lineales para distancias menores de 10 cM y bajo cualquier patrón de interferencia (Figura 1), los mapas obtenidos con una densidad de marcadores elevada son mucho más consistentes. En éstos, las regiones adyacentes entre loci son esencialmente aditivas, una propiedad importante del mapeo genético. En este contexto de mapeo genético de elevada densidad, las funciones de mapa han vuelto a cobrar gran interés científico aunque ninguna de las más sencillas parece ajustarse adecuadamente a grandes conjuntos de datos (ZHAO y SPEED 1996; WINDEMUTH *et al.* 1998).

3. MARCADORES GENÉTICOS PARA LA CARTOGRAFÍA GENÉTICA

En sus inicios, la cartografía genética se basó en marcadores génicos mendelianos, fundamentalmente caracteres morfológicos y bioquímicos, con limitaciones en cuanto a su número y variabilidad. Como consecuencia, los mapas de ligamiento obtenidos mostraban una baja densidad de marcadores génicos, sobre todo en genomas de gran tamaño. En las últimas décadas, los marcadores genéticos moleculares derivados de la tecnología del ADN han supuesto un enorme avance en el desarrollo y mejora de los mapas genéticos en animales, vegetales y humanos (BROWN 1999; NÚEZ y CARRILLO 2000). En especies de acuicultura se dispone de diferentes tipos de marcadores moleculares, entre ellos RAPDs («random amplified polymorphic DNA»), AFLPs («amplified fragment length polymorphism»), microsatélites o SNPs («single nucleotide polymorphism») (LIU y CORDÉS *et al.* 2004; GJEDREM 2005; CHISTIakov *et al.*, 2006). Su valor relativo para el mapeo genético depende del tipo de herencia, de la facilidad/coste de su caracterización, del polimorfismo, así como del grado de transferencia



a nivel intra e interespecífico (DANZMANN y GHARBI 2001). Los marcadores que no precisan de conocimiento genómico previo (RAPDs y AFLPs) han demostrado su utilidad para establecer con relativa rapidez mapas premilitares en peces, moluscos y crustáceos (DANZMAN y GHARBI 2001; ZHANG *et al.* 2006; SEKINO y HARA 2007). Entre sus principales limitaciones se encuentran el modo de herencia dominante y el bajo nivel de polimorfismo que limitan su utilización cruzada entre familias y poblaciones dentro de especie (HUBERT y HEDGECOCK 2004). Entre los marcadores idóneos para el análisis de ligamiento se encuentran los microsatélites, debido a su sencilla amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), herencia codominante, alta densidad en los genomas y elevada variabilidad dentro de especie (DANZMAN y GHARBI 2001). La dependencia de conocimiento genómico previo ha constituido la principal limitación para la aplicación de estos marcadores. En los últimos años se han ido incorporando técnicas genómicas eficientes para aislar y caracterizar cientos de marcadores microsatélites para el mapeo genético (ZANE *et al.*, 2002; PARDO *et al.* 2007). Aún así, los mapas de microsatélites están disponibles en un número relativamente reducido de especies acuícolas, mayoritariamente peces, incluyendo varias especies modelo (DANZMAN y GHARBI 2001; WANG *et al.* 2007; SEKINO y HARA 2007).

La mayoría de los marcadores moleculares son presuntamente anónimos. Retomando el símil geográfico, los marcadores anónimos representarían las señalizaciones kilométricas distribuidas por el mapa de carreteras, sin significado propio, pero esenciales para localizar por ejemplo los núcleos urbanos, que equivaldrían a genes o secuencias genómicas de interés. El creciente desarrollo del análisis genómico ha incrementado el número de marcadores situados en regiones codificantes. Así, se han detectado microsatélites o SNPs dentro de regiones génicas conservadas no transcritas (3'UTR) e incluso SNPs responsables de mutaciones que causan variaciones fenotípicas (GJEDREM 2005). Estos marcadores son idóneos para el mapeo de genes y tienen un especial interés para aplicar selección asistida por marcadores («Marker Assisted Selection»; MAS) y para estudios genéticos evolutivos. Estas estrategias, ampliamente utilizadas en peces modelo, están empezando a desarrollarse en especies acuícolas de interés comercial (WALDBIESER



et al. 2001; MANEERUTTANARUNGOJ *et al.* 2006; WANG *et al.*, 2007). Los SNPs, aunque menos informativos que los microsatélites, constituyen una promesa de futuro asociado al desarrollo de tecnología genómica en acuicultura (GJEDREM 2005). Hasta el momento, aparte de los peces modelo, se han descrito muy pocos SNPs en especies acuícolas de interés comercial, fundamentalmente en salmónidos (GenBank).

4. CARTOGRAFÍA GENÉTICA

La elaboración de mapas genéticos en la práctica totalidad de organismos se basa en la utilización de cruzamientos dirigidos (familias de referencia) para evaluar la cosegregación meiótica del mayor número posible de marcadores. El proceso de mapeo genético engloba varias etapas sucesivas (DANZMANN y GHARBI 2001), que se inician con el genotipado de los marcadores en la familia de referencia (progenitores y progenie). Los datos genotípicos obtenidos se introducen en un programa informático adecuado para realizar el análisis de ligamiento, que incluye el establecimiento de las relaciones de ligamiento entre los marcadores testados, reflejadas finalmente en grupos de ligamiento. Además, el proceso de mapeo incluye la ordenación multipunto relativa de los distintos marcadores en cada grupo de ligamiento.

4.1. Familias de referencia para el mapeo genético

Distintos diseños experimentales han demostrado su utilidad para establecer familias de referencia que maximicen la heterocigosis para un conjunto de marcadores disponibles, permitiendo el seguimiento de los productos gaméticos de un progenitor a través de dos o más generaciones sucesivas (Tabla 1). Una de las estrategias clásicas se basa en la disponibilidad de líneas consanguíneas divergentes para obtener F_1 y retrocruzamientos, que aseguren la segregación de los loci heterocigóticos a partir de un único parental. Este diseño ha estado restringido a los peces modelo que disponen de líneas puras. Alternativamente, se han utilizado también cruzamientos interespecíficos. La aplicación de técnicas de manipulación cromosómica (ver capítulo 10) ha permitido también obtener diversos tipos de familias segregantes en distintas especies de peces, incluyendo androgenéticos y ginogenéticos, tanto haploides como



diploides. El uso de familias haploides facilita el mapeo de marcadores dominantes (AFLPs, RAPDs) a través del análisis gamético directo. Adicionalmente, el análisis de ginogenéticos diploides (medias tétradas) permite posicionar los centrómeros en los grupos de ligamiento (ver apartado 5). Las dificultades de aplicación de las estrategias anteriores en muchas especies de interés en acuicultura ha determinado la utilización de familias diploides biparentales de origen genético diverso (híbridos de primera generación, retrocruzamientos) como poblaciones segregantes en el mapeo genético. Si bien no proceden de líneas puras, ambos parentales pueden ser heterocigotos para diferentes loci, y por tanto informativos en el análisis de ligamiento de cada parental. Si se realizan cruzamientos entre híbridos en los que no se pueda trazar el origen parental de los alelos, es necesario un tratamiento de datos que contemple la fase de ligamiento desconocida. Cuando se dispone de información genotípica en pedigrís con varias generaciones es posible establecer la fase de ligamiento entre marcadores, facilitando la cartografía genética (Figura 2).

TABLA 1.

Tipos de familias de referencia para el mapeo genético en especies acuícolas.

Tipo de familia de referencia	Mapas genéticos específicos (Referencias)
Líneas consanguíneas	<i>O. latipes</i> (KOCHER <i>et al.</i> 1998) <i>D. rerio</i> (NARUSE <i>et al.</i> 2000)
Ginogenéticos haploides	<i>D. rerio</i> (POSTLETHWAIT <i>et al.</i> 1994) <i>Oreochromis</i> spp. (KOCHER <i>et al.</i> 1998) <i>S. maximus</i> (BOUZA <i>et al.</i> datos no publicados)
Androgenéticos haploides y diploides	<i>O. mykiss</i> (YOUNG <i>et al.</i> 1998) <i>S. salar</i> (SINGER <i>et al.</i> 2002)
Ginogenéticos diploides	<i>D. rerio</i> (KELLY <i>et al.</i> 2000) <i>S. trutta</i> (GHARBI <i>et al.</i> 2006)
Cruzamientos interespecíficos	<i>Xiphophorus</i> spp. (WORAM <i>et al.</i> 2004) <i>Seriola</i> spp. (OHARA <i>et al.</i> 2005).
Familias biparentales diploides	<i>C. gigas</i> (HUBERT y HEDGECOCK 2004) <i>Oreochromis</i> spp. (LEE <i>et al.</i> 2005) <i>D. labrax</i> (CHISTIAKOV <i>et al.</i> 2005) <i>S. aurata</i> (FRANCH <i>et al.</i> 2006) <i>P. monodon</i> (MANEERUTTANARUNGOJ <i>et al.</i> 2006) <i>L. calcarifer</i> (WANG <i>et al.</i> 2007) <i>S. maximus</i> (BOUZA <i>et al.</i> datos no publicados)

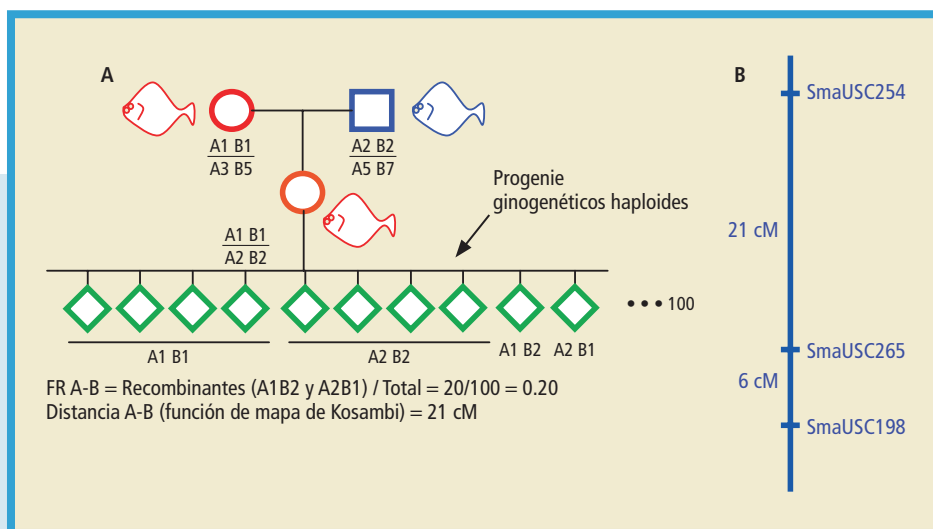


FIGURA 2.

Ejemplo de análisis de ligamiento entre marcadores microsatélite de rodaballo (*S. maximus*; PARDO *et al.* 2007), utilizando una familia de referencia ginogenética haploide con fase de ligamiento conocida: A) Estima de distancia genética entre los marcadores A (SmaUSC254) y B (SmaUSC265); B) Mapa de ligamiento para tres marcadores, A, B y C (SmaUSC198), a partir de las distancias genéticas por pares: A-B: 21cM; A-C: 27 cM; B-C: 6 cM (grupo de ligamiento 5 del mapa genético de rodaballo, BOUZA *et al.* datos no publicados).

4.2. Análisis de ligamiento: Método LOD

Las familias informativas que muestran segregación simultánea para dos marcadores permiten testar ligamiento significativo y estimar la FR. Las familias con fase de ligamiento desconocida no permiten deducir las combinaciones genotípicas parentales, aunque puede asignarse una probabilidad a las posibles alternativas en base a los datos de la progenie. Para establecer el ligamiento entre pares de marcadores, se utiliza el método de puntuaciones LOD (logaritmo de la ratio de verosimilitudes). Éste estima la probabilidad de obtener la distribución genotípica observada para una $FR \geq 0$ respecto a la de obtener los mismos datos si no hubiese ligamiento ($FR = 50\%$; MORTON 1995; OTT 1999). Este cálculo puede ser programado en software para permitir el análisis de múltiples pares de marcadores (Tabla 2). El valor LOD



máximo obtenido frente a una escala gradual de posibles FR (0 – 50%) puede tomarse como la mejor estima del valor de recombinación, y por tanto de la distancia entre dos marcadores. Cualquier puntuación LOD > 0 apoya el ligamiento, considerándose firme la evidencia si es 1000 veces más probable frente a la hipótesis de segregación independiente (LOD > 3; OTT 1999; STRACHAN y READ 1999). El método LOD aplicado en 1950 al análisis de ligamiento en humanos ha subsistido a la era del mapeo molecular, representando un aspecto esencial en la informatización de la cartografía genética (MORTON 1995). Su extensión al análisis multipunto posibilita la ordenación de múltiples marcadores en mapas de referencia y la localización de un gen respecto a numerosos marcadores a lo largo de un cromosoma. La ordenación de tres marcadores ligados es un problema clásico sencillo (GRIFFITHS *et al.* 2002), pero para múltiples puntos se convierte en un complejo problema computacional que requiere la programación de algoritmos que

TABLA 2.

Software utilizado para la construcción de mapas genéticos en distintas especies acuícolas.

Paquetes informáticos ^a	Especies	Referencia software (web)
CRI-MAP	<i>Dicentrarchus labrax</i> ¹ <i>Sparus aurata</i> ²	GREEN <i>et al.</i> 1990 (http://bimas.dcrtr.nih.gov/sw.html#crimap)
JOINMAP	<i>Salmo salar</i> ³ <i>Oreochromis</i> spp. ⁴ <i>Haliotis</i> spp. ⁵ <i>Scophthalmus maximus</i> ⁶	DANZMAN 2001 (http://www.uoguelph.ca/~rdanzman/software)
LINKMFEX	<i>Oncorhynchus mykiss</i> ⁶ <i>Salvelinus alpinus</i> ⁷ <i>Salmo trutta</i> ⁸ <i>Lates calacarifer</i> ⁹	DANZMAN 2001 (http://www.uoguelph.ca/~rdanzman/software)
MAPMAKER	<i>Danio rerio</i> ¹⁰ <i>Cassostrea gigas</i> ¹¹ <i>Litopenaeus vannamei</i> ¹² <i>Takifugu rubripes</i> ¹³	LANDER <i>et al.</i> 1987 (http://www.genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software)
MAP MANAGER	<i>Paralychtys olivaceous</i> ¹⁴ <i>Seriola</i> spp. ¹⁵	MANLY y OLSON 1999 (http://mapmgr.roswellpark.org/mapmgr.html)

^a Información adicional sobre recursos informáticos de análisis de ligamiento: <http://linkage.rockefeller.edu/>

¹ CHISTIAKOV *et al.* 2005; ² FRANCH *et al.* 2006; ³ MOEN *et al.* 2004; ⁴ LEE *et al.* 2005; ⁵ SEKINO y HARA 2007; ⁶ SAKAMOTO *et al.* 2000;

⁷ WORAN *et al.* 2004; ⁸ GHARBI *et al.* 2006; ⁹ WANG *et al.* 2007; ¹⁰ Shimoda *et al.* 1999; ¹¹ HUBERT y HEDGECOCK 2004; ¹² Zhang *et al.* 2006;

¹³ Kai *et al.* 2005; ¹⁴ COIMBRA *et al.* 2003; ¹⁵ OHARA *et al.* 2005; ¹⁶ BOUZA *et al.* datos no publicados.



apliquen un criterio de ordenación, variable en función del programa informático escogido (WEIR 1996; NÚEZ 2000).

Diversos programas han permitido acomodar el análisis de ligamiento a los distintos tipos de familias segregantes disponibles en especies de interés en acuicultura (Tabla 2). Dicho análisis se inicia con la identificación estadística de grupos de marcadores ligados (grupos de ligamiento) para la especie considerada. Usualmente en el mapeo inicial se detectan más grupos de ligamiento que los correspondientes al número haploide de cromosomas (Tabla 3). Esto puede explicarse debido a que grupos pequeños de 2-3 marcadores pueden estar realmente ligados a extremos terminales de otros grupos de ligamiento mayores, debido a una baja densidad de marcadores en el mapa inicial. Estas discrepancias suelen desaparecer cuando se incrementa la densidad de los mapas genéticos o se integran varias familias de referencia para construir mapas consenso (SHIMODA *et al.* 1999; LEE *et al.* 2005). Una vez que han sido identificados los grupos de ligamiento, es necesario establecer el orden lineal de los marcadores en el mapa de cada grupo, recalculando las distancias de recombinación entre pares de marcadores. En familias biparentales este proceso ha de realizarse independientemente para cada parental. Una vez establecido el orden de los marcadores, se pueden estimar las distancias de mapa utilizando la FR observada o en base a una función de mapa, siendo mayoritariamente utilizada la de Kosambi (DANZMANN y GHARBI 2001).

Algunos de los programas de análisis de ligamiento, como JOINMAP o LINKMFEX (Tabla 2), facilitan la construcción de mapas genéticos a partir de múltiples familias o cruzamientos interespecíficos, integrando mapas independientes obtenidos de parentales distintos, siempre que existan marcadores de anclaje comunes entre mapas. Los mapas consolidados que integran diferentes familias y tipos de marcadores constituyen herramientas cartográficas de referencia para una especie dada (SEWELL *et al.* 1999). Asimismo, representan una estrategia experimental para analizar la variación en FR a nivel intra e interespecífico, un aspecto de gran relevancia evolutiva y aplicada para la búsqueda de genes de interés (SEWELL *et al.* 1999; NICHOLS *et al.* 2003; HUBERT y HEDGECOCK 2004; GHARBI *et al.* 2006; SEKINO y HARA 2007).



TABLA 3.
Características de mapas genéticos en especies representativas de interés en acuicultura.

Especie	Genoma haploide (~Mb)	GL	n	Marcadores	Longitud (~cM)	Resolución (~cM)	~Mb/cM	~Ratio FR F:M
PECES								
<i>Danio rerio</i> ¹	1700	25	25	2000m	2300	1.2	0.74	2.7:1
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ²⁻³	3500	29-31	29-32	² 191m, 17g, Sx	1350 – 4590	3.4 ² – 7.1 ³	2.6 ² – 0.76 ³	3.3:1
				³ 974A, 226m, > 30g				10:1 / centromeros
								1:10 / telomeros
<i>Ictalurus punctatus</i> ⁴	1000	32	29	243m, 20g, Sx	2234	8.7	0.45	3.2:1
<i>Oreochromis</i> spp. ⁵	1100	24	22	521m, 21g, Sx, P	1311	2.4	0.84	1:1
<i>Seriola</i> spp. ⁶								
<i>S. quinqueradiata</i> (F)	800	25	24	165m	902	2.7	0.89	1:1.6
<i>S. lalandi</i> (M)		21	24	122m	1715	4.8	0.47	
<i>Takifugu rubripes</i> ⁷	400	24	22	200m	697.1 (M)	4.1	0.57	1.7:1
		29	22		1214 (F)	7.1	0.33	
<i>Salmo trutta</i> ⁸	3000	37	40	288m, 13g, Sx	346 (M)	NP	0.81	6.4:1
					913 (F)		1.24	
<i>Salvelinus alpinus</i> ⁹	3000	46	39-41	184m, 129A, 13g, Sx	390 (M) – 992 (F)	NP	3.02 – 7.69	1.7:1
<i>Paralichthys olivaceus</i> ¹⁰	800	25-27	23	111m, 352A	1100	6.6 -8.0	0.73	1:7.4
<i>Dicentrarchus labrax</i> ¹¹	830	25	24	162m, 11g	1762	5.0	0.47	1.5:1
<i>Sparus aurata</i> ¹²	1000	26	24	204m	1242 (C)	9.7	0.81	1.2:1
					1171 (M)		0.85	

(Continúa)



(Continuación)

Especie	Genoma haploide (~Mb)	GL	n	Marcadores	Longitud (~cM)	Resolución (~cM)	~Mb/cM	~Ratio FR F:M
					1452 (F)		0.69	
<i>Lates calcarifer</i> ¹³	700	27	24	240m, 10me	415 (M)	4.7	1.69	2.1:1
		25	24		874 (F)	6.2	0.80	
<i>Scophthalmus maximus</i> ¹⁴	800	26	22	242m	1343 (C)	5.6	0.52	1.6:1
MOLUSCOS-CRUSTÁCEOS								
<i>Cassostrea virginica</i> ¹⁵	700	12	10	282A	858 (M) - 1296 (F)	5.7 – 10.8	0.81 – 0.54	1.4:1
<i>Cassostrea gigas</i> ¹⁶	900	11	10	102m	766 (M)	8.0	1.17	1.3:1
		12	10		1020 (F)	10.0	0.88	
<i>Haliotis</i> spp. ¹⁷	1800	18	18	180m, Sx	702 (M)	4.7	2.56	1.3:1
		19	18		888 (F)	6.3	2.03	
<i>Penaeus monodon</i> ¹⁸⁻¹⁹	2000	36-47	44	¹⁸ 189A, 12m, 15	878 ¹⁸ – 1100 ¹⁹ (M)	7.8 ¹⁸	2.3 ¹⁸ – 2.0 ¹⁹	1:1.3 ¹⁸ – 1:1.2 ¹⁹
		29-36	44	¹⁸ + ¹⁹ 13m, 36me	630 ¹⁸ – 891 ¹⁹ (F)	8.0 ¹⁹	3.2 ¹⁸ – 2.2 ¹⁹	
<i>Litopenaeus vannamei</i> ²⁰⁻²¹	2000	47-51 ²⁰	44	²⁰ 390A	2116 ²⁰ – 3221 ²¹ (M)	14.0 ²⁰	0.95 ²⁰ – 0.62 ²¹	1.3:1 ^{20,21}
		45 ²¹	44	²¹ 816A, 30m, Sx	2771 ²⁰ – 4134 ²¹ (F)	15.0 ²¹	0.72 ²⁰ – 0.48 ²¹	
<i>Daphnia pulex</i> ²²	180	12	12	185m	1200	7.0	0.15	NP

Estima del tamaño genómico haploide (Animal Genome Size Database; <http://www.geneomesize.com>); GL (n.º de grupos de ligamiento); n (número haploide de cromosomas); Longitud de mapa genético (C: consenso; F: femenino; M: masculino); Resolución: densidad promedio entre marcadores; Mb/cM: Relación entre distancia genética y física; Ratio FR F:M (ratio de frecuencia de recombinación entre el mapa femenino y masculino); Marcadores: tipo y número utilizado (m: microsatélites, me: microsatélites dentro de secuencias expresadas ESTs; A: AFLPs, R: RAPDs, g: secuencia génica, S: SNPs, Sx: sexo; P: fenotipo pigmentación). NP: Datos no publicados.

¹ SHIMODA *et al.* 1999; ² SAKAMOTO *et al.* 2000; ³ NICHOLS *et al.* 2003; ⁴ WALDBIESER *et al.* 2001; ⁵ LEE *et al.* 2005; ⁶ OHARA *et al.* 2005; ⁷ KAI *et al.* 2005; ⁸ GHARBI *et al.* 2006; ⁹ WORAN *et al.* 2004; ¹⁰ COIMBRA *et al.* 2003;

¹¹ CHISTIakov *et al.* 2005; ¹² FRANCH *et al.* 2006; ¹³ WANG *et al.* 2007; ¹⁴ BOUZA *et al.* datos no publicados; ¹⁵ Yu y Guo 2003; ¹⁶ Hubert y Hedgecock 2004; ¹⁷ SEKINO y HARA 2007; ¹⁸ WILSON *et al.* 2002;

¹⁹ MANEERUTTANARUNGOJ *et al.* 2006; ²⁰ PEREZ *et al.* 2004; ²¹ ZHANG *et al.* 2006; ²² CRITESCU *et al.* 2006.



4.3. Mapas genéticos en especies de interés en acuicultura

Las estrategias de construcción de mapas genéticos han ido evolucionando a lo largo de la última década, incorporando progresivamente un mayor número de recursos genéticos y genómicos (distintos tipos de familias de referencia y marcadores; Tabla 3). En los mapas preliminares de baja resolución, la distancia genética promedio entre marcadores suele ser elevada. Frente a éstos, los mapas de alta resolución están basados en una elevada densidad de marcadores tanto anónimos como génicos, pero restringidos a unos pocos peces modelo, como por ejemplo, *D. rerio*, especie también de interés acuático (SHIMODA *et al.* 1999; Tabla 3). En los mapas genéticos de referencia para la mayoría de especies cultivadas se han posicionado escasos marcadores codificantes (Tabla 3), incluyendo algunos alozimas, ESTs («expressed sequence tags»), y unos cuantos rasgos fenotípicos como sexo o pigmentación epitelial (SAKAMOTO *et al.* 2000; WALDBIESER *et al.* 2001; WORAM *et al.* 2004; GHARBI *et al.* 2006).

Entre las especies de peces de interés en acuicultura, destacan los esfuerzos de mapeo genético realizados en salmónidos, con diferentes marcadores y familias segregantes (SAKAMOTO *et al.* 2000; NICHOLS *et al.* 2003; GHARBI *et al.* 2006). A pesar de ello, algunos de los mapas generados presentan importantes limitaciones de resolución y cobertura genómica (<10% y <40% de los mapas masculino y femenino en *Salmo trutta*; GHARBI *et al.* 2006; Tabla 3). La complejidad del análisis de ligamiento en salmónidos se debe a las propias características de este grupo de peces de origen tetraploide y genomas de gran tamaño (DANZMANN y GHARBI 2001; GHARBI *et al.* 2006). Por ello, han cobrado gran importancia los mapas consenso dentro de especie y el mapeo comparativo (Tabla 3; *Onchorynchus mykiss*; NICHOLS *et al.* 2003) para mejorar la cobertura de los mapas específicos y servir de referencia en estudios evolutivos (GHARBI *et al.* 2006).

En moluscos y crustáceos el desarrollo de mapas genéticos ha sido todavía más limitado que en peces, estando restringido a unas pocas especies de interés en acuicultura (Tabla 3). La práctica totalidad de mapas disponibles están basados en marcadores AFLPs, en algún caso con notables discrepancias entre mapas para una misma especie



(PEREZ *et al.* 2004; ZHANG *et al.* 2006). Se ha sugerido que el tamaño de los mapas preliminares en crustáceos podría estar sobreestimado, proponiéndose la idoneidad de los microsatélites para su cartografía genética y la importancia del mapeo comparativo respecto a genomas modelo bien caracterizados (CRISTESCU *et al.* 2006). Hasta la fecha, se dispone de mapas basados en microsatélites en tres invertebrados marinos, dos moluscos y el crustáceo *Daphnia* propuesto como modelo por su pequeño genoma (Tabla 3). Al igual que en peces, la aplicación de microsatélites fácilmente exportables a distintas familias dentro de especie ha facilitado el mapeo genético integrado, esencial para establecer mapas consenso y localizar regiones génicas de interés (SEKINO y HARA 2007).

4.3.1. Características de los mapas genéticos: Precisión y resolución

Analizando los mapas genéticos desarrollados en especies representativas de interés en acuicultura (Tabla 3) se observa una importante heterogeneidad en la resolución promedio de mapa (inversamente relacionada con la distancia entre marcadores). Los valores publicados oscilan entre 1.2 cM en el mapa avanzado del pez modelo *D. rerio* y 15.0 cM en el mapa preliminar de un crustáceo (*Litopenaeus vannamei*). La resolución promedio por especie (7.2 ± 0.7 cM) evidencia el grado de desarrollo limitado de los mapas genéticos en este grupo de organismos hasta la fecha. De forma paralela, al comparar las estimas de genoma haploide (Mb) con las longitudes de mapa genético disponibles (cM) se observa una importante variación en la relación distancia genética y física entre especies. Los valores estimados oscilan entre ~450 kb/cM en tilapia (*Oreochromis* spp.) y ~7,700 kb/cM en el salmónido *Salvelinus alpinus*, situándose el valor promedio para el total de especies consideradas en 1.16 ± 0.23 Mb/cM, próximo al valor obtenido en un amplio rango de organismos, incluyendo humanos (~1 Mb/cM; BROWN 1999).

Un aspecto de enorme interés que emerge del análisis comparativo tiene relación con las diferencias en FR detectadas a nivel intra e interespecífico. Se ha descrito heterogeneidad en FR entre sexos, dependiente de la región cromosómica considerada (heterocromatina



constitutiva, centrómeros, telómeros, puntos calientes de recombinación; ver apartado 5), pero también entre familias y poblaciones. Esta variación refleja un fenómeno general constatado en un amplio espectro de organismos, que puede determinar importantes limitaciones de resolución y precisión de los mapas genéticos, incluso en especies modelo de alto desarrollo genómico (BROWN 1999).

La existencia de variación posicional en FR, con valores reducidos en regiones de heterocromatina constitutiva intersticial se ha utilizado como posible explicación de algunos «gaps» (distancias entre marcadores) mayores de 30 cM no asociados a centrómeros en mapas genéticos de alta densidad como el de *D. rerio* (SHIMODA *et al.* 1999).

Respecto a la variación entre sexos, en mamíferos los machos (sexo heterogamético) muestran una FR global menor, aunque existen excepciones notables (oveja, vacuno). La mayoría de los mapas genéticos en especies de peces e invertebrados marinos se ajustan a la regla general de mamíferos, con FR más baja en machos con ratios dependientes de la especie (Tabla 3; por ejemplo *O. mykiss*, *Ictalurus punctatus*, *Cassostrea gigas*, *L. vannamei*). Aunque la mayoría de las especies no presenta heteromorfismos cromosómicos detectables, estos datos podrían apuntar hacia un sistema de determinación del sexo tipo XY en muchas de estas especies dioicas para las que los sistemas de determinación cromosómica del sexo aún no han sido resueltos. En el mapa de *Paralichthys olivaceus* se han descrito diferencias de recombinación inusuales en la literatura, hasta casi ocho veces superiores en machos que en hembras. Sin embargo, en otras especies como tilapia, con sistema XY y un locus determinante del sexo identificado, no se han encontrado diferencias significativas de recombinación entre machos y hembras (LEE *et al.* 2005).

Las FR según el sexo pueden presentar variaciones importantes entre y dentro de grupos de ligamiento, en algún caso invirtiendo la ratio entre sexos para regiones genómicas específicas (KAI *et al.* 2005; LEE *et al.* 2005; FRANCH *et al.* 2006; SEKINO y HARA 2007; BOUZA *et al.* datos no publicados). En distintas especies, se han descrito diferencias de recombinación entre telómeros y centrómeros específicas de sexo con valores extremos en salmónidos que presentan interferencia telo-



mérica casi completa en las meiosis femeninas (SAKAMOTO *et al.* 2000; LEE *et al.* 2005; GHARBI *et al.* 2006) (Tabla 3).

La estimación de las diferencias entre sexos en FR puede estar enmascarada por diferencias interindividuales en FR (ver apartado 5.3). Así se han descrito variaciones de las relaciones de ligamiento entre parentales procedentes de diferentes familias o poblaciones, especialmente en especies que presentan reordenaciones cromosómicas intraespecíficas, como algunos salmónidos y moluscos (HUBERT y HEDGECOCK 2004; GHARBI *et al.* 2006; SEKINO y HARA 2007). El análisis de ligamiento en especies hermafroditas con alternancia sexual a lo largo de la vida, como *Sparus aurata*, ofrece interesantes modelos para estimar FR específicas de sexo a nivel intraindividual (FRANCH *et al.* 2006).

El conocimiento preciso de las tasas de recombinación globales y posicionales en machos y hembras, pero también familiares, tiene gran relevancia práctica para el diseño experimental en las especies objeto de análisis genómico. El uso exclusivo de meiosis según sexo / familia / posición con mayor tasa global de FR será útil para el mapeo de alta resolución y también en el clonaje posicional al maximizarse la ratio de distancia genética vs. física. Alternativamente, el uso de meiosis en el sexo / familia con menor FR facilitará la asociación de una mutación o marcador a un grupo de ligamiento, así como mantener relaciones de ligamiento entre alelos de interés en fase de acoplamiento, útil en la selección asistida por marcadores.

5. ESTRUCTURA CROMOSÓMICA Y LOCALIZACIÓN DE CENTRÓMEROS: ANÁLISIS DE MEDIAS TÉTRADAS

5.1. Distancias gen-centrómero

Tal como se ha comentado, la correspondencia entre mapas físicos y mapas genéticos no es perfecta (KAUFFMAN *et al.* 1995). La distorsión de esta relación viene dada porque la probabilidad de los entrecruzamientos a lo largo del eje cromosómico no es constante (ALLENDORF y DANZMANN 1997; SAKAMOTO *et al.* 2000; DANZMANN y GHARBI 2001). Se ha demostrado que en general, la recombinación disminuye en regiones próximas a los centrómeros, y es máxima hacia los telómeros (CHOO



1998; SAKAMOTO *et al.* 2000; DANZMANN y GHARBI 2001). En consecuencia, la posición de los centrómeros en los mapas genéticos afectará a la distribución de los entrecruzamientos durante la meiosis y será relevante para interpretar la relación existente entre distancia física y distancia genética. La distribución de quiasmas tiene importantes consecuencias aplicadas, ya que los marcadores en regiones próximas a los centrómeros marcarán distancias físicas mayores, lo cual afectará a

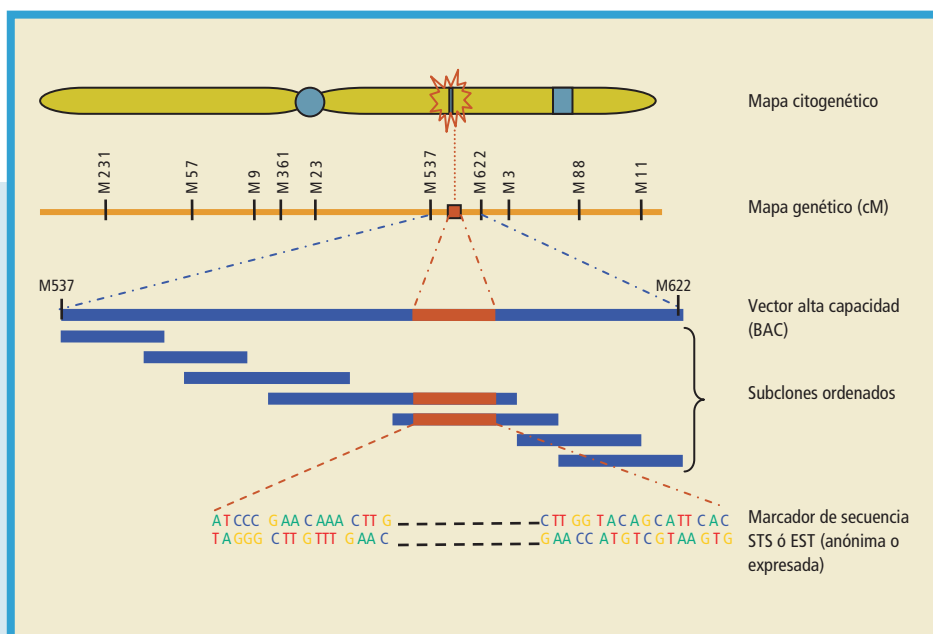


FIGURA 3.

Integración de mapas citogenético, genético y físico. El mapa genómico de un cromosoma dado puede contener: i) información citogenética (morfología y bandeo cromosómico), ii) posiciones relativas de marcadores genéticos en un mapa de ligamiento, iii) secuencias cromosómicas largas en clones de alta capacidad, como BACs, caracterizados a su vez en subclones solapados de menor capacidad.

Se ilustra un ejemplo de cómo los marcadores moleculares permiten integrar los distintos niveles de mapeo: los marcadores flanqueantes (M537 y M622) de una región de interés (marcada en rojo) en un mapa genético, permiten su localización física en la colección de clones para su caracterización molecular y para la localización cromosómica mediante hibridación *in situ*.

(Modificada de HARTL y JONES 1998).



estrategias de clonaje posicional, identificación de QTLs y su aplicación en selección asistida por marcadores.

Las distancias gen-centrómero se pueden estimar en mamíferos mediante el análisis de familias con trisomías autosómicas, el estudio de la no-disyunción en teratomas ováricos y mediante el análisis de ligamiento cuando existe un marcador centrómero (DA *et al.* 1995). En organismos acuáticos, el método más común para estimar las distancias entre los marcadores y el centrómero, es el análisis de medias-tétradas en ginogenéticos diploides (ALLENDORF *et al.* 1986; DANZMANN y GHARBI 2001) o más raramente a partir de triploides (NOMURA *et al.* 2006) (Tabla 4). Esta aproximación se ha popularizado dada la sencillez que implica la manipulación de los conjuntos cromosómicos durante la reproducción en estos organismos, y la plasticidad genética que muestran frente a modificaciones de ploidía.

Mediante la aplicación de sencillas operaciones, que incluyen la destrucción del material genético por radiación (UV, radiación gamma) y la retención del segundo corpúsculo polar mediante choque térmico o de presión, se pueden obtener progenies 100% ginogenéticas diploides (ver capítulo 10). Con este material es posible distinguir los marcadores o genes que segregan en la primera o en la segunda división meiótica, y en consecuencia estimar su distancia al centrómero (Figura 4).

En esencia para un marcador segregante (heterocigótico en la madre), los descendientes homocigóticos serían el resultado de la segregación en la meiosis I, mientras que los heterocigotos se producirían por el entrecruzamiento entre el marcador y el centrómero, y segregarían en la meiosis II en condiciones normales (ausencia de choque para bloquear la extrusión del 2.º corpúsculo polar). Si la distribución de puntos de entrecruzamiento o quiasmas fuera aleatoria a lo largo del eje cromosómico (no hay interferencia), la frecuencia máxima de heterocigotos sería de 0.667 (THORGAARD *et al.* 1983). Sin embargo, se ha observado en distintos organismos como hongos y peces, que sí existe interferencia, es decir, que la presencia de un entrecruzamiento influye sobre la probabilidad de otro entrecruzamiento en la proximidad (KAUFFMAN *et al.* 1995). La interferencia será positiva o negativa, respectivamente, si un entrecruzamiento disminuye o aumenta la pro-



TABLA 4.

Principales referencias sobre estudios de medias tétradas para la estimación de distancias gen-centrómero en organismos acuáticos.

Especie	N.º/tipo Marcadores	Desviación segregación	Desviación interfamiliar	Análisis de segregación conjunta	Posición centrómeros /Interferencia/otros	Referencia
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	8 Aloz.	1/21 No	1/8 No	Si	No Si (0.55)	THORGAARD <i>et al.</i> 1983
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	25 Aloz.	0/69 -	2/108 Si (1)	Si	No Si (0.56)	ALLENDORF <i>et al.</i> 1986
<i>Ictalurus punctatus/furcatus</i>	6 Aloz.	0/9 -	0/3	Si	No Si (0.62)	LIU <i>et al.</i> 1992
<i>Danio rerio</i>	10 Microsat.	1/10 No	No	Si	No Si (0.72)	KAUFFMAN <i>et al.</i> 1995
<i>Danio rerio</i>	2 mutantes morfológicos RAPDs	-	-	Si	Si/Localización de mutantes (b.s.a.)	JOHNSON <i>et al.</i> 1995
<i>Danio rerio</i>	>25 Microsat., STSs	-	No	Si	Si Consolidación mapa	JOHNSON <i>et al.</i> 1996
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	209 Microsat., Aloz., RAPDs, ESMPs	-	Si -	Si	Si Consolidación mapa	SAKAMOTO <i>et al.</i> 2000
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	312 Microsat., Aloz., AFLPs, PINES	No	1/14 No	No	No Si (0.52)	LINDNER <i>et al.</i> 2000
<i>Danio rerio</i>	45 Microsat., RAPDs	-	No -	Si	Si/ Localización de mutantes	MOHIDEEN <i>et al.</i> 2000

(Continúa)



(Continuación)

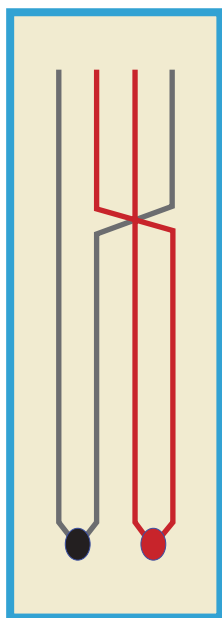
Especie	N.º/tipo Marcadores	Desviación segregación	Desviación interfamiliar	Análisis de segregación conjunta	Posición centrómeros /Interferencia/otros	Referencia
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	15 Microsat.	3/27 No	0/10 -	No	No Si (0.41)	MORISHIMA <i>et al.</i> 2001
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	69 Microsat.	-	-	Si	Si/ Análisis de QTLs	O'MALLEY <i>et al.</i> 2002
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	900 Microsat. AFLPs, ESMPs, Aloc.	-	-	-	Si Consolidación mapa	NICHOLS <i>et al.</i> 2003
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	37 Aloc.	2/52 No	14/21 Si	No	No Si (0.02-0.98)	MATSUOKA <i>et al.</i> 2004
<i>Halotis discus</i>	9 Microsat.	0/15 -	0/7 -	No	No No (0.22)	LI y KIJIMA, 2005
<i>Anguilla japonica</i>	43 Microsat.	*	-	No	No Si (0.65)	NOMURA <i>et al.</i> 2006

Marcadores: Aloc.: alozimas; Microsat.: microsatélites; STS: sequence tagged site; ESMP: expressed sequence marker polymorphism; PINE: polymorphic interspersed nuclear elements.

En desviaciones de la segregación e interfamiliares se indican el número de desviaciones significativas ($P < 0.05$) respecto del total (parte superior) y si existen diferencias significativas después de la corrección para múltiples test (parte inferior).

En posición centrómeros/interferencia/otros se indica si en el estudio se aborda el posicionamiento de los centrómeros y si se detecta interferencia positiva. Entre paréntesis se da la media de la proporción de heterocigotos observada. En este mismo apartado se indican aspectos específicos de algunos estudios.

*Único estudio en que aborda el análisis de medias tétradas con triploides.

**FIGURA 4.**

Ejemplo de entrecruzamiento sencillo entre dos crómatidas para ilustrar el análisis de medias tétradas en ginogenéticos diploides. Los loci situados más allá del punto de entrecruzamiento, darán lugar a heterocigotos en la progenie ginogenética para loci segregantes (heterocigotos en la madre), mientras que todos los loci situados entre el punto de entrecruzamiento y el centrómero serán homocigotos en la descendencia.

babilidad de otro en la proximidad. Cuando existe interferencia positiva la frecuencia de heterocigotos en ginogenéticos diploides puede superar la frecuencia de 0.667, y si la interferencia es completa, puede llegar a ser 1, la máxima posible.

La distancia entre un marcador y el centrómero se obtiene habitualmente por relación directa con la proporción de heterocigotos observada en este tipo de progenies, de manera que cuanto mayor sea ésta, más alejado se encontrará un marcador del centrómero (DANZMANN y GHARBI 2001). Sin embargo, esta relación no es lineal a lo largo de todo el cromosoma y dependerá por un lado, del número y distribución de los puntos de entrecruzamiento (quiasmas), que no es totalmente aleatoria. Además, tal como se ha explicado en apartados anteriores de este capítulo, cuanto mayor es la distancia, la probabilidad de entrecruzamientos múltiples aumenta siendo más difícil su detección, y en consecuencia, la relación con la distancia se hace más compleja. Así, se ha observado, que en los cromosomas o brazos cromosómicos cortos, la tasa de recombinación por longitud física es mayor, ya que al menos es necesario un entrecruzamiento por brazo para estabilizar la unión de los bivalentes



en meiosis (KABACK *et al.* 1989). Esto implica cantidades inferiores de ADN por cM en el mapa genético de cromosomas o brazos cortos. Por otro lado, cuando aparecen varios quiasmas en el mismo brazo, éstos tienden a localizarse en posiciones alejadas entre sí (ZICKLER y KLECKNER 1999), poniendo de manifiesto la existencia de interferencia positiva. La existencia de una elevada interferencia positiva ha sido también descrita en peces (ALLENDORF *et al.* 1986; KAUFFMAN *et al.* 1995; LINDNER *et al.* 2000; MATSUOKA *et al.* 2004; NOMURA *et al.* 2006), habiéndose observado un valor de 0.78 en trucha arcoiris para un tramo cromosómico en el que se realizó un análisis detallado del patrón de entrecruzamientos (THORGAARD *et al.* 1983). En peces se ha observado también una elevada proporción de marcadores en progenies ginogenéticas con frecuencias de heterocigotos superiores a 0.667 y una fuerte asimetría en su distribución hacia valores elevados, con frecuencias superiores a 0.9, e incluso iguales a 1 (LINDNER *et al.* 2000; MATSUOKA *et al.* 2004). Estas observaciones ponen de manifiesto la complejidad de la relación entre distancias genéticas y físicas.

Para estimar la distancia gen-centrómero a partir de la proporción de heterocigotos se pueden aplicar funciones de mapa similares a las descritas en apartados previos para la elaboración de mapas genéticos. En esencia, estas funciones parten de diferentes asunciones respecto del grado de interferencia existente durante la formación de los entrecruzamientos. En peces se ha observado una elevada interferencia, tal como se comentó anteriormente, lo que ha llevado a aplicar la interferencia completa como función de mapeo para el cálculo de distancias entre marcadores y centrómero. Según esto la distancia entre un marcador y el centrómero sería la mitad de la frecuencia de heterocigotos observada. El pequeño tamaño de los cromosomas de peces y en consecuencia el limitado espacio físico para la formación de más de un entrecruzamiento, ha sido la explicación que se ha dado a este fenómeno, observado también en cromosomas o brazos de pequeño tamaño en otras especies de plantas y animales (MENDELSON *et al.* 1973; HULTEN 1974; THORGAARD *et al.* 1983; IHGSC 2001). Esta aproximación debe sin embargo, tomarse con cautela, ya que por un lado, el hecho de que haya elevada interferencia, no implica que ésta sea completa, es decir, que no existan entrecruzamientos múltiples en algunos cromosomas. De hecho mediante el análisis de segregación conjunta a partir de mapas genéticos (ver apartado 5.4), ha sido posible detectar



la existencia de entrecruzamientos múltiples en distintos grupos de ligamiento en peces (THORGAARD *et al.* 1983; SAKAMOTO *et al.* 2000). Asimismo, lo que puede ser una tendencia general, no tiene porque ser aplicable para todos los grupos de ligamiento. De hecho, MARTÍNEZ *et al.* (datos no publicados) han podido observar que mientras la interferencia completa es la función que mejor se ajusta a los datos de ginogenéticos diploides en *S. maximus*, esta relación no es general. Existen grupos de ligamiento específicos en esta especie, en los que las funciones de Kosambi o incluso la de Haldane (ausencia de interferencia) se ajustan mejor al patrón de entrecruzamientos.

Estas observaciones, y la ausencia de estudios detallados sobre los patrones de entrecruzamiento para los diferentes grupos de ligamiento en la mayor parte de los peces, han llevado a utilizar únicamente los loci más próximos a los centrómeros para su posicionamiento (Tabla 4). Una cierta proporción de marcadores no muestran heterocigotos en progenies ginogenéticas (KAUFFMAN *et al.* 1995; MOHIDEEN *et al.* 2000) y son los que proporcionan mayor confianza para estimar la posición de los centrómeros. Cuando se dispone de un cierto número de marcadores por grupo de ligamiento, disponemos de varias estimaciones simultáneas de la posición de los centrómeros, una por marcador. A partir de las posiciones en el mapa genético de estos marcadores, sería posible obtener la posición del centrómero como media de las diferentes estimaciones dentro de cada grupo de ligamiento. El mayor problema se presenta con los marcadores que estén más alejados del centrómero, en los que es más compleja la relación con la distancia como se comentó en apartados anteriores. MARTÍNEZ *et al.* (datos no publicados) han demostrado que por debajo de 30 cM la interferencia completa se ajusta bien al patrón de entrecruzamientos en *S. maximus*, sugiriendo este límite para la utilización de marcadores a la hora de estimar la posición de los centrómeros en esta especie.

5.2. Distorsión de la segregación en ginogenéticos diploides

Las desviaciones de la segregación mendeliana cuando se estiman distancias gen-centrómero o se trata de localizar la posición de estos, darían lugar a estimas incorrectas de distancia. Estas desviaciones



podrían ocurrir con cierta frecuencia en ginogenéticos diploides debido a la presencia de genes deletéreos ligados a los marcadores (ALLEN-DORF *et al.* 1986; LIU *et al.* 1992; NICHOLS *et al.* 2003). La existencia de alelos deletéreos recesivos es una situación común en la mayor parte de los genomas estudiados. Se han descrito entre 0,5 y 3 letales por individuo en una amplia revisión realizada por HALLIGAN y KEIGHTLEY (2003), y entre 1 y 5 letales equivalentes (grupo de genes mutantes que causarían como promedio la muerte en un individuo) en humanos (JORDE 2001) y pez cebra (McCUNE *et al.* 2004). Los valores en invertebrados son muy similares a lo observado en vertebrados (HAAG *et al.* 2002; KRISTENSEN *et al.* 2003). La menor viabilidad observada habitualmente en ginogenéticos diploides respecto de peces control, en algunos casos muy acusada (PIFERRER *et al.* 2004), confirma la existencia de genes deletéreos recesivos en peces (ver capítulo 10). En consecuencia, sería esperable una distorsión de la segregación en una cierta proporción de los marcadores utilizados en estos estudios. Para detectar estas desviaciones y evaluar su significación suele aplicarse un test de chi-cuadrado o un test exacto. Por otro lado, suele emplearse una corrección para múltiples test, para evitar errores de tipo I. Cuando se detecta una desviación significativa, la corrección aplicada habitualmente supone contar dos veces la frecuencia del homocigoto más común para estimar la frecuencia de los homocigotos. A partir de ésta, se recalcula la frecuencia de heterocigotos, y con esta frecuencia se obtiene la distancia según la función de mapa que consideremos más apropiada (THORGAARD *et al.* 1983).

La capacidad de detectar una distorsión de la segregación, y en consecuencia de ajustar correctamente las distancias de mapa, dependerá en cualquier caso del grado de letalidad, del tamaño de la progenie analizada y de la potencia del test aplicado. Asimismo, es de esperar que estas desviaciones tengan lugar en la mayoría de los marcadores que se encuentren en el mismo grupo de ligamiento donde hay un deletéreo, y que tenga además una intensidad similar, dependiente del grado de letalidad del gen asociado (DANZMANN y GHARBI 2001; NICHOLS *et al.* 2003; MARTÍNEZ *et al.* datos no publicados). También sería de esperar que la desviación se detectara con mayor probabilidad en marcadores próximos al centrómero al disponer de



mayor proporción de homocigotos y en consecuencia mayor tamaño muestral. Sin embargo, estas distorsiones han sido observadas en un número limitado de casos en peces (Tabla 4), siendo numerosos los estudios en los que no se han detectado (ALLENDORF *et al.* 1986; LIU *et al.* 1992; LINDNER *et al.* 2000; MATSUOKA *et al.* 2004; LI y KIJIMA 2005). La incapacidad para detectar distorsiones en la segregación estarían relacionadas: i) con el escaso número de marcadores usado, que podrían no estar asociados a los grupos de ligamiento portadores de genes deletéreos; ii) con la aplicación mecánica de la corrección para múltiples test, excesivamente conservativa y que estaría asumiendo como ajustadas a la hipótesis nula desviaciones ligeras debidas a deletéreos de pequeño o moderado efecto; iii) también con el hecho de que se hayan utilizado larvas de primeros estadíos, que podrían expresar los deletéreos tardíamente (MATSUOKA *et al.* 2004; MARTÍNEZ *et al.* datos no publicados); o finalmente, iv) con la existencia de genes duplicados en especies de origen tetraploide como los salmónidos, que evitaría igualmente la manifestación de letales, como han sugerido ALLENDORF *et al.* (1986). En trucha arcoiris (NICHOLS *et al.* 2003) se han observado desviaciones de la segregación consistentes, tanto por la existencia de varios loci con segregación distorsionada en el mismo cromosoma, como por la intensidad similar de la desviación en todos ellos.

5.3. Diferencias de segregación interindividuales o interfamiliares

Otra dificultad que se puede plantear durante la construcción de un mapa es la posible existencia de diferencias interindividuales en el posicionamiento de los marcadores, y consecuentemente la existencia de más de un mapa en la especie. En general, estas diferencias representarían pequeñas variaciones de lo que sería el mapa consenso de la especie, pero que es necesario tener en consideración, pues podrían explicar resultados anómalos durante la aplicación del mapa. Por esta razón, es relativamente usual la utilización de más de una familia de referencia cuando se estiman distancias gen-centrómero (Tabla 4). Diferencias en la segregación entre familias han sido observadas por varios autores, especialmente en el caso de los salmónidos (SAKAMOTO *et al.* 2000; MATSUOKA *et al.* 2004), aunque no en todas las especies y



únicamente para una pequeña proporción de marcadores (THORGAARD *et al.* 1983; ALLENDORF *et al.* 1986; LINDNER *et al.* 2000). Varias son las causas que pueden determinar diferencias en la segregación entre familias, que a su vez justificarían la necesidad de este análisis. El diferente grado de homología existente en salmónidos relacionado con su origen tetraploide y con los fenómenos de pseudoligamiento en machos, podría dar cuenta de las diferencias observadas entre familias en este grupo de peces (SAKAMOTO *et al.* 2000). Cuanto mayor es la homología para un segmento cromosómico, mayor será la probabilidad de entrecruzamiento y viceversa. Asimismo, estas diferencias podrían deberse a variaciones en la tasa de recombinación en determinados segmentos del genoma entre individuos, diferencias en el grado de interferencia para regiones específicas, presencia de reordenamientos cromosómicos, diferencias de viabilidad o sencillamente errores de muestreo (ALLENDORF *et al.* 1986). Esta variación en la segregación entre familias, apenas se han observado en otras especies de organismos acuáticos (LIU *et al.* 1992; MORISHIMA *et al.* 2001). La utilización de varias familias para la estimación de distancias gen-centrómero tiene en realidad, la misma relevancia que cuando se construye un mapa genético en el que usualmente se utiliza una o dos familias de referencia. En este caso, la utilización de más de una familia tiene que ver más con la detección de una mayor cantidad de marcadores segregantes, que con el estudio de diferencias interindividuales, aunque en estudios recientes se ha empezado a evaluar también las diferencias interfamiliares (HUBERT y HEDGECOCK 2004; GHARBI *et al.*, 2006; SEKINO y HARA 2007). A pesar de existir una cierta probabilidad de diferencias regionales en la frecuencia de recombinación entre distintos individuos, parece más importante poner el énfasis en la utilización de un número superior de marcadores en una primera fase de la construcción del mapa, que en utilizar varias familias para su construcción.

5.4. Análisis de segregación conjunto («Joint segregation analysis»)

El análisis de medias tétradas («half tetrad analysis») utilizando progenies de ginogenéticos diploides, permite afinar algunas de las cuestiones descritas en apartados anteriores mediante el análisis de



segregación conjunta. Así, es posible establecer si existe ligamiento entre pares de marcadores alejados con un grado de confianza superior a la obtenida usualmente durante la construcción de un mapa genético; se puede estudiar la posición relativa de dos o varios marcadores respecto de los centrómeros; y finalmente, podemos abordar un análisis fino del patrón de entrecruzamientos a lo largo del eje cromosómico (JOHNSON *et al.* 1996; DANZMANN y GHARBI 2001). Este análisis parte de una metodología similar al análisis de tétradas descrito fundamentalmente en hongos (FINCHAM *et al.* 1979; SUZUKI *et al.* 1992), y para desarrollarlo se estudian simultáneamente los datos obtenidos en ginogenéticos diploides en dos o más marcadores. En la Figura 5 se

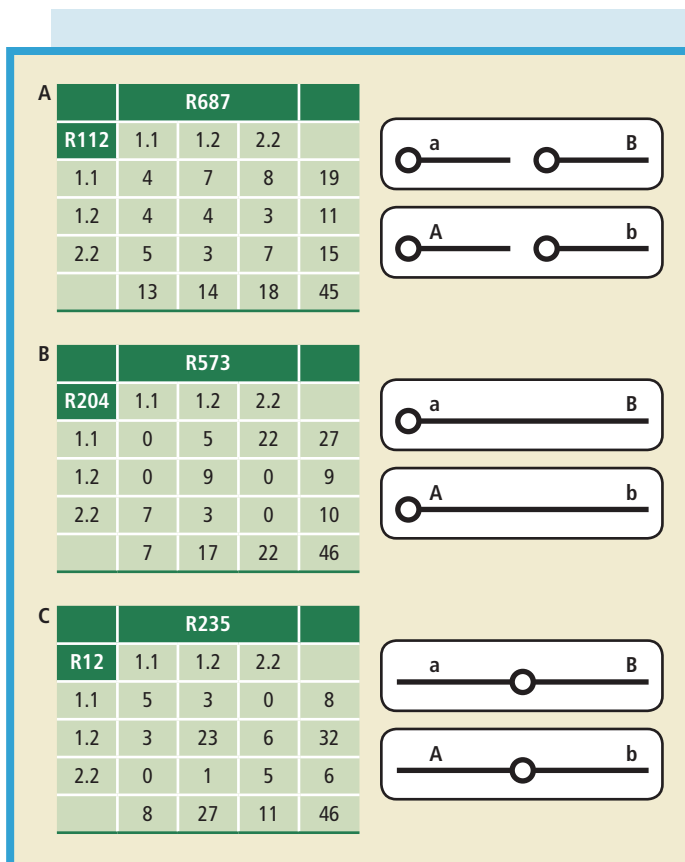


FIGURA 5.

Análisis de segregación conjunta («Joint segregation analysis») para tres pares de loci microsatélite en rodaballo. Se presentan los tres casos posibles según la localización de los marcadores: A) marcadores localizados en cromosomas distintos; B) en el mismo brazo del mismo cromosoma; C) en distinto brazo del mismo cromosoma. En las tablas de contingencia se han designado de la misma manera los dos alelos para todos los loci segregantes (1 y 2). Estos dan lugar a los tres genotipos (11, 12, 22). Datos tomados de MARTÍNEZ *et al.* (datos no publicados).



muestran las tablas de contingencia resultado de la segregación simultánea entre pares de marcadores en tres supuestos distintos tomados del estudio de MARTÍNEZ *et al.* en *S. maximus* (datos no publicados). Estos tres casos nos servirán de referencia para ilustrar las posibilidades de este tipo de análisis.

5.4.1. Estudio de ligamiento entre pares de marcadores

En general podemos asumir, que los descendientes homocigóticos para cualquier marcador segregante, son el resultado de la ausencia de entrecruzamientos entre dicho marcador y el centrómero. Debemos reseñar, sin embargo, que los dobles entrecruzamientos entre dos cromátidas producirían este mismo resultado, aunque a una frecuencia muy baja. El análisis de los individuos dobles homocigóticos (presentes en las cuatro esquinas en las tablas de contingencia de la Figura 5), permitirá deducir si los loci están ligados o no. Para el análisis de ligamiento definiremos los ditipos paternos (DP), como aquellos pares alélicos que son heredados de un mismo abuelo/a por la madre de la progenie ginogenética. Los ditipos no paternos (DNP) representarán una nueva combinación surgida de la combinatoria meiótica, fruto del entrecruzamiento si están ligados en el mismo cromosoma, y se localizan en la otra diagonal de la tabla. Podemos conocer la fase de ligamiento de los genes si disponemos de información de los abuelos, o también, cuando carecemos de esta información, considerando como DP las dos clases más frecuentes en una de las dos diagonales (ALLENDORF *et al.* 1986). Mediante un test de contingencia es posible entonces establecer si hay asociación significativa (ligamiento) entre los marcadores ($DP \gg DNP$; Figura 5B y 5C) o si segregan independientemente ($DP = DNP$; Figura 5A). La capacidad para detectar el ligamiento dependerá de la distancia entre los genes, y del tamaño muestral que limitará la potencia del test. Los marcadores más alejados de los centrómeros presentarán una proporción de homocigotos baja, por lo que será necesario incrementar el tamaño muestral para adquirir la potencia necesaria para detectar la existencia de ligamiento. Son necesarios al menos 12 homocigotos e idealmente en torno a 20 para detectar asociaciones significativas, asumiendo ausencia de DNP (JOHN-



SON *et al.* 1995). Este tipo de análisis suministra una potencia superior al análisis clásico de ligamiento, pudiendo detectarse asociaciones no reveladas previamente.

Un caso particular de este análisis es su aplicación para el mapeo de mutantes o genes de interés que sirva para su posterior aislamiento mediante clonaje posicional o genes candidatos (Tabla 4). La existencia de mutantes morfológicos o de desarrollo con herencia mendeliana sencilla, ofrece la posibilidad de localizar el gen responsable de los mismos mediante el uso del mapa, cuestión que ha sido abordada especialmente en *D. rerio* (JOHNSON *et al.* 1995; KAUFFMAN *et al.* 1995; MOHIDEEN *et al.* 2000). En una primera aproximación se trata de localizar el grupo de ligamiento y la posición en el mapa para posteriormente intentar su identificación. La existencia de una elevada interferencia en peces, facilita que se pueda asociar cualquier marcador o mutante a su grupo de ligamiento mediante el análisis de segregación conjunto, siempre que se disponga de marcadores próximos al centrómero. Para ello, lo más sencillo es realizar un análisis de segregación en masa («bulk segregation analysis») a partir de la acumulación del ADN de la progenie de cruzamientos apropiados (normalmente retrocruzamientos de heterocigotos para el mutante). A partir de este ADN se realiza la amplificación por PCR de los marcadores de todos los grupos de ligamiento próximos al centrómero, y después de clasificar la descendencia fenotípicamente, se investiga la posible asociación con cada marcador. Idealmente se encontraría que los mutantes aparecerían esencialmente asociados con un único alelo del locus correspondiente al grupo de ligamiento en el que se encontraría el mutante, y los salvajes con otro (DP), mientras que apenas aparecerían las otras dos combinaciones (DNP). La distancia entre el mutante y el centrómero puede obtenerse restando 100 menos el doble de los homocigotos del mutante y dividiendo entre 2, asumiendo interferencia completa (STREISINGER *et al.* 1986).

5.4.2. Posicionamiento de marcadores respecto al centrómero

El posicionamiento correcto de marcadores cercanos en un mapa genético siempre es una tarea compleja, ya que los errores de muestreo en las progenies durante la construcción del mapa pueden ser



superiores a la distancia que exista entre ellos. Los casos B) y C) de la Figura 5 nos sirven para ilustrar como se puede establecer el orden correcto de dos marcadores próximos al centrómero utilizando el análisis de segregación conjunto. Para ello, debemos tener en cuenta las asociaciones entre los heterocigotos de un locus y los homocigotos del otro. A partir de la Figura 5 es sencillo entender, que cuando ambos marcadores se encuentran en el mismo brazo cromosómico (Figura 5B), no aparecerán heterocigotos del locus A (situado en el centro) con homocigotos del locus B (en el extremo), a menos que se produzca un doble entrecruzamiento que afecte a las mismas cromátidas. Por el contrario, serán mucho más frecuentes los heterocigotos del locus B asociados con homocigotos del locus A, ya que se originan mediante un entrecruzamiento sencillo entre ambos marcadores. Si el centrómero está entre los dos marcadores el resultado será distinto (Figura 5C), observándose en este caso independencia en la asociación entre los homocigotos y heterocigotos de ambos marcadores, aunque existirá asociación entre ambos tipos de homocigotos ($DP \gg DNP$), ya que ambos marcadores están ligados.

5.4.3. Análisis del patrón de entrecruzamiento a lo largo del eje cromosómico

Los mapas genéticos tienen, además de un interés aplicado, un enorme valor para interpretar aspectos básicos relacionados con el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis o para analizar fenómenos de transmisión relacionados con determinadas regiones del genoma (THORGAARD *et al.* 1983; DANZMANN y GHARBI 2001). Un aspecto esencial para establecer la relación entre mapa físico y mapa genético, es el conocimiento en detalle del patrón de entrecruzamiento dentro de cada grupo de ligamiento, y entre diferentes grupos. Disponiendo de un conjunto de marcadores mapeados a lo largo del eje cromosómico, y utilizando el análisis de segregación conjunto, es posible estimar la distancia entre ellos de forma precisa y conocer dicho patrón de entrecruzamiento. Tomando como referencia la Tabla 5, podemos observar que ha habido 16 entrecruzamientos (15+1) entre el locus A y el centrómero, que son los heterocigotos observados para el locus más próximo al centrómero (Figura 6).



TABLA 5.

Análisis de segregación conjunta en ginogenéticos diploides de rodaballo para dos loci microsatélite situados en el mismo brazo cromosómico tal como se indica en el esquema de la Figura 6 (MARTÍNEZ *et al.* datos no publicados).

	BB	Bb	bb
AA	11	8	0
	NE	SE II	DE 4c II
Aa	1	15	0
	DE 2c I, II	SE I	DE 2c I, II
	DE 4c I, II	DE 3c I, II	DE 4c I, II
aa	0	6	6
	DE 4c II	SE II	NE

En la tabla de contingencia se presentan los valores absolutos observados en la progenie para cada genotipo.

Debajo de cada valor se indica el patrón/es de entrecruzamientos posible que los ha originado: SE: entrecruzamiento sencillo; DE: doble entrecruzamiento; NE: no entrecruzamiento; 2c, 3c y 4c indican el número de cromátidas involucradas en los dobles entrecruzamientos.

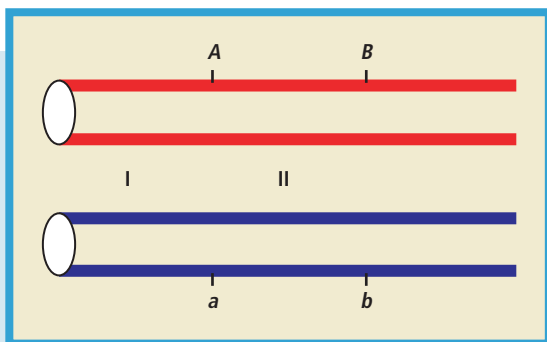
Los números romanos (I, II) hacen referencia a las regiones mostradas en la Figura 6.

Dobles entrecruzamientos que impliquen a tres cromátidas serían indistinguibles de los entrecruzamientos sencillos entre el locus A y el centrómero, aunque mucho menos frecuentes. Éstos, al mismo tiempo, aparecerán con la misma frecuencia que los dobles entrecruzamientos que afecten a dos cromátidas, más los que afectan a cuatro cromátidas (PERKINS 1962), siempre que la interferencia sea independiente de las cromátidas involucradas en los entrecruzamientos (DANZMANN y GHARBI 2001). Dado que en nuestro caso se ha detectado un solo doble entrecruzamiento que implica a las regiones I y II, debemos considerar que han ocurrido 16 entrecruzamientos en la región II ($8 + 6 + 1 + 1$). En consecuencia, la distancia entre el locus A y el centrómero sería de 17.0 cM asumiendo interferencia completa, y la misma 17.0 cM entre el locus A y el locus B. A partir de las distancias obtenidas, y teniendo en cuenta los 2 dobles entrecruzamientos observados ($1 + 1$), se puede calcular fácilmente la interferencia como $1 - (2/(0.34 \times 0.34 \times 47))=0.63$, un valor próximo al obtenido por THORGAARD *et al.* (1983) en *O. mykiss*, y que denota la elevada interferencia existente en *S. maximus*. Este tipo de aproximación permite, una vez que tengamos un conjunto de marcadores apropiado para



FIGURA 6.

Localización de dos loci microsatélite de rodaballo situados en el mismo brazo cromosómico en los que se definen las regiones I y II para el estudio del patrón de entrecruzamiento (MARTÍNEZ *et al.* datos no publicados).



cada grupo de ligamiento en una especie particular, el analizar la función de mapa que mejor se ajusta al patrón de entrecruzamiento, y tratar de aproximarse de una forma más eficaz al conocimiento de la relación entre mapa físico y mapa genético.

6. IMPORTANCIA BÁSICA Y APLICADA DE LOS MAPAS GENÉTICOS

6.1. Integración de mapas genéticos y físicos

El análisis estructural del genoma puede ser explorado a diferentes niveles, desde los mapas de ligamiento correlacionados con cromosomas, a la cartografía física de secuencias genómicas (BROWN 1999).

6.1.1. Asignación cromosómica de grupos de ligamiento

La correspondencia entre los grupos de ligamiento de un mapa genético y cromosomas específicos constituye un primer nivel de posicionamiento o mapeo físico de genes y marcadores. Sin embargo, la práctica totalidad de los mapas genéticos en especies de interés en acuicultura continúan pendientes de asignación física a cromosomas. Entre las estrategias utilizadas para este fin se encuentran los mapas de híbridos de radiación (HR) y la hibridación *in situ* (FISH), herramientas prometedoras para el futuro desarrollo de mapas cromosómicos de alta resolución en distintas especies.



La hibridación *in situ* con sondas marcadas de secuencias conocidas, permite asignar directa y rápidamente marcadores y genes a cromosomas, pero también establecer la organización cromosómica de secuencias genómicas repetidas de interés estructural y funcional, como ADN satélite, secuencias teloméricas o familias génicas (WANG *et al.* 2007; FORTES *et al.* 2007). La asignación de grupos de ligamiento a cromosomas específicos mediante FISH ha sido desarrollada en unas pocas especies de peces, con aportaciones relevantes a los estudios de evolución cromosómica en telósteos desde un proto-cariotipo ancestral de vertebrados (PHILLIPS *et al.* 2006a, b).

La tecnología de híbridos celulares interespecíficos irradiados para la cartografía cromosómica ha trascendido el ámbito humano y de otros mamíferos, comenzando a hacerse extensiva a peces modelo como *D. rerio* y más recientemente en especies de interés en acuicultura como *S. aurata* (SARROPOULOU *et al.* 2007). La ausencia de co-localización para un par de marcadores dados se toma como evidencia de posición de dichos marcadores en diferentes fragmentos cromosómicos. Por el contrario, marcadores que sí colocalizan en la misma línea celular híbrida se situarían en el mismo cromosoma. Las distancias de mapa utilizadas (cR, centirad) denotan el porcentaje de líneas celulares en las que colocalizan pares de marcadores. Aunque pueden presentar limitaciones de precisión respecto a los mapas clásicos de ligamiento (DANZMANN y GHARBI 2001), los mapas HR permiten asignar grupos de ligamiento a cromosomas y acceder físicamente a segmentos concretos del genoma (SARROPOULOU *et al.* 2007).

6.1.2. Cartografía genómica integrada

El análisis genómico se ha basado en avances tecnológicos y bioinformáticos importantes que han permitido el análisis masivo de secuencias y el almacenamiento y manejo de ingentes cantidades de datos genómicos. La clonación de fragmentos largos de ADN en vectores de gran capacidad (cromosomas artificiales bacterianos o de levadura, como BACs o YACs, respectivamente) y el ensamblaje de clones contiguos solapados pertenecientes a secuencias únicas (contigs) han contribuido al desarrollo de mapas físicos cada vez más resolutivos en un amplio rango de organismos (BROWN 1999).



La utilización de diferentes tipos de marcadores moleculares posibilita el alineamiento e integración de los distintos niveles de mapeo genético, cromosómico y físico (Fig. 3). Entre ellos, los marcadores STSs («sequence-tagged sites») representan un tipo de marcador específico de secuencia <500 pb que pueden ser fácilmente identificados por PCR en mapas físicos. Los clones de gran capacidad que contengan marcadores STSs previamente localizados en mapas genéticos pueden utilizarse como sondas en experimentos de hibridación *in situ* para asignar grupos de ligamiento a cromosomas específicos (PHILLIPS *et al.* 2006a, b). Muchos de estos marcadores STSs pueden corresponderse con secuencias diseñadas a partir de genes expresados (ESTs), permitiendo posicionar genes funcionales en los distintos tipos de mapas (Fig. 3).

La integración de mapas genéticos y físicos, con diferente nivel de resolución, ha facilitado el desarrollo de los proyectos genoma encaminados a la secuenciación de genomas completos de eucariotas. La importancia de los mapas genéticos como recursos genómicos valiosos queda patente en aquellos organismos completamente secuenciados en ausencia de mapas genéticos previos, caso del pez modelo *T. rubripes* (APARICIO *et al.* 2002). La construcción *a posteriori* de un mapa de ligamiento basado en microsatélites (KAI *et al.* 2005) ha proporcionado una herramienta útil para completar el ensamblaje de secuencias del genoma, establecer mapeo comparativo entre vertebrados y para el rastreo genómico de diferencias fenotípicas intra e interespecíficas del género *Takifugu*.

El desarrollo de recursos genómicos físicos en especies acuícolas ha sido notablemente inferior al desarrollado en agricultura y ganadería. En los últimos años se han iniciado proyectos de secuenciación masiva en diferentes especies, en paralelo al desarrollo bioinformático de bases de datos para su almacén y análisis. Entre los recursos genómicos disponibles destaca la construcción de librerías genómicas de alta capacidad (BACs) en distintas especies de peces y moluscos, como *O. mykiss*, *Cyprinus carpio*, *Oreochromis* spp., *Salmo salar* y *Cassostrea* spp. (KATAGARI *et al.* 2001; MIYAKE y AMEMIYA 2004; THORSEN *et al.* 2005; CUNNINGHAM *et al.* 2006). Se añaden también colecciones cada vez más amplias de ESTs procedentes de genotecas de ADNc en



distintas especies, caso de los teleósteos *I. punctatus* y *Dicentrarchus labrax* (NONNEMAN y WALDBIESER 2005; CHINI *et al.* 2006) o del crustáceo *Penaeus monodon* (TASSANAKAJON *et al.* 2006), asociadas a proyectos de genómica funcional (Capítulo 13).

6. 2. Mapeo comparativo y genómica evolutiva

Dos genes o marcadores son sinténicos si están ligados al mismo cromosoma en dos especies distintas. El análisis comparado entre mapas genéticos de distintos organismos para elementos genómicos comunes permite investigar la evolución genómica a través del análisis de conservación de la sintenia así como del orden de ligamiento entre genes, que estará relacionado con la proximidad taxonómica entre las especies analizadas. Desde el punto de vista aplicado, la existencia de una sintenia en una especie con pocos recursos respecto de otra más estudiada, permite obtener información adicional de los posibles genes existentes en esa región para la identificación de genes candidatos relacionados con caracteres productivos.

El importante desarrollo del análisis genómico en especies modelo de peces, incluyendo mapas de ligamiento y mapas físicos encaminados a la secuenciación completa de sus genomas ofrece una oportunidad única para el mapeo comparativo en este grupo de organismos. El mapa físico parcial del teleósteo modelo *Tetraodon nigroviridis* ha sido generado anclando >60% del genoma en los 21 grupos de ligamiento de la especie (JAILLON *et al.* 2004). Dadas las estrechas relaciones filogenéticas entre peces, los mapas genéticos de especies comerciales acoplados con las secuencias completas de peces modelo depositadas en bases de datos públicas proporcionarán acceso a los genomas de literalmente miles de especies de peces (LEE *et al.* 2005). El mapeo genético comparativo será, por tanto, de gran utilidad en estudios evolutivos en teleósteos y vertebrados. El mapeo genético comparativo de peces modelo como *O. latipes* y *T. nigroviridis* respecto a humanos ha ayudado a inferir el número y contenido cromosómico en el ancestro común de teleósteos y mamíferos (JAILLON *et al.* 2004; NARUSE *et al.* 2004). Los datos comparativos sugieren relaciones sinténicas más conservadas en el linaje de teleósteos que en el linaje de mamíferos (KAI *et al.* 2005), con repercusión importante de cara al aprovecha-



miento entre especies de peces de la información sobre identificación de genes de interés en mapas genéticos más avanzados.

Recientemente, las secuencias únicas flanqueantes de microsatélites mapeados en distintas especies de peces de interés en acuicultura se han empezado a utilizar para la búsqueda de homologías respecto a secuencias genómicas de organismos modelo depositados en bases de datos públicas. Los resultados obtenidos a partir de los microsatélites mapeados en *Oreochromis* spp. (LEE *et al.* 2005) *S. aurata* (FRANCH *et al.* 2006), *L. calcarifer* (WANG *et al.* 2007) revelan un importante número de regiones conservadas evolutivamente (ERCs). En el caso de *T. nigroviridis*, las secuencias ancladas a los 21 cromosomas en dotación haploide de la especie, han permitido establecer relaciones sinténicas respecto a los grupos de ligamiento de distintas especies de peces. La presencia de numerosos ERC no codificantes representa uno de los aspectos más interesantes de la genómica comparada y funcional en vertebrados (ALONI y LANCET 2005). Además proporciona una oportunidad única para anclar los genomas de peces totalmente secuenciados en los mapas genéticos de especies peor caracterizadas, siendo extremadamente útil para la identificación de loci responsables de QTLs u otros fenotipos de interés (FRANCH *et al.* 2006).

Hasta el momento, el mapeo comparativo en invertebrados marinos de interés está muy escasamente desarrollado. Entre los ejemplos recientes se encuentra el mapa genético basado en microsatélites en *Daphnia* spp. que se propone como crustáceo modelo útil para el análisis comparado entre especies de este grupo, así como respecto a otros modelos de invertebrados (*Drosophila*; CRISTESCU *et al.* 2006).

6.3. Identificación de regiones génicas de interés: Selección asistida por marcadores

Los mapas genéticos son esenciales para diseccionar caracteres fenotípicos complejos, permitiendo la identificación y seguimiento de genes o regiones genómicas de interés económico («Quantitative Trait Loci», QTLs). Esto proporciona la base para programas de selección asistida por marcadores, y en última instancia para la localización mediante clonaje posicional de genes candidatos relacionados con la salud y el crecimiento de animales domésticos (véase capítulo 9;



DANZMANN y GHARBI 2001). El desarrollo logrado en este campo en organismos de interés en acuicultura, principalmente en peces, ha sido hasta el momento muy inferior al de otras especies domésticas, en gran parte debido a la limitación en el número necesario de marcadores moleculares y de mapas genéticos de la densidad apropiada. La complejidad y dificultad del proceso dependerá del nivel de resolución de los mapas genéticos disponibles, pero también de la relación entre distancia genética y física a nivel local en los genomas de interés.

6.4. Selección de marcadores genéticos para el análisis poblacional y de parentesco

Finalmente, entre los recursos disponibles relacionados directamente con los mapas genéticos de referencia es importante resaltar las colecciones amplias de distintos tipos de marcadores bien caracterizados en distintas especies (anónimos vs. codificantes, relaciones de dominancia, ligamiento y localización cromosómica, nivel de variabilidad intra e interespecífico, modelo de mutación,...). Estos catálogos constituyen herramientas valiosas para la selección de marcadores atendiendo a los objetivos y necesidades del estudio genético o genómico propuesto en una especie dada (*S. maximus*; PARDO *et al.* 2007). Entre ellos podemos destacar los siguientes: i) marcadores de referencia homogéneamente distribuidos para construir mapas genéticos consenso integrando los análisis de ligamiento previos en nuevas familias segregantes (SEWELL *et al.* 1999; NICHOLS *et al.* 2003), ii) marcadores neutros con segregación independiente y alto polimorfismo para realizar análisis de estructura genética poblacional y de parentesco (Capítulo 7) y iii) marcadores que permitan el rastreo genómico para detectar huellas de la selección natural o artificial durante la domesticación, así como la evaluación de caracteres adaptativos en poblaciones salvajes y cultivadas (LUIKART *et al.* 2003).

BIBLIOGRAFÍA

- ALLENDORF, F. W., K. E. SEEB, K. L. KNUDSEN, G. H. THORGAARD y R. F. LEARY, 1986
Gene-centromere mapping of 25 loci in rainbow trout. *J. Hered.* **77**: 307-321.



- ALLENDORF, F. W. y R. G. DANZMANN, 1997 Secondary tetrasomic segregation of MDH-B and preferential pairing of homeologs in rainbow trout. *Genetics* **145**: 1083-1092.
- ALONI, R., y D. LANCET, 2005 Conservation anchors in the vertebrate genome. *Genome Biol.* **6**: 115.
- ANDERSON, L., y M. GEORGES, 2004 Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 202-212.
- APARICIO, S., J. CHAPMAN, E. STUPKA, *et al.* 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* **297**: 1301-1310.
- BROWN, T.A., 1999 *Genomes*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- CHINI, V., S. RIMOLDI, G. TEROVA, M. SAROGLIA, F. ROSSI, G. BERNARDINI y R. GORNATI, 2006 EST-based identification of genes expressed in the liver of adult sea-bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene* **376**: 102-106.
- CHISTIakov, D.A., B. HELLEMANS, C. S. HALEY, A. S. LAW, C. S. TSIGENOPOULOS, G. KOToulas, D. BERTOTTO, A. LIBERTINI y F.A.M. VOLCKAERT, 2005 A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Genetics* **170**: 1821-1826.
- CHISTIakov, D.A., B. HELLEMANS y F.A.M. VOLCKAERT, 2005 Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* **255**: 1-29.
- CHOO, K. H. A., 1998. Why is the centromere so cold? *Genome Res.* **8**: 81-82.
- COIMBRA, M.R.M., K. KOBAYASHI, S. KORETSUGU, O. HASEGAWA, E. OHARA, A. OZAKI, T. SAKAMOTO, K. NARUSE y N. OKAMOTO, 2003 A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **220**: 203-218.
- CRISTESCU, M.E.A., J.K. COLBOURNE, J. RADIVOJC y M. LYNCH, 2006 A micro satellite-based genetic linkage map of the waterflea, *Daphnia pulex*: On the prospect of crustacean genomics. *Genomics* **88**: 415-430.
- CUNNINGHAM, C., J. HIKIMA, M.J. JENNY, R.W. CHAPMAN, *et al.* 2006 New resources for marine genomics: bacterial artificial chromosome libraries for the Eastern and Pacific oysters (*Crassostrea virginica* and *C. gigas*). *Mar. Biotechnol.* **8**: 521-533.
- DA Y., V. L. JARELL, T. WANG, R. L. FERNANDO, M. B. WHEELER y H. A. LEWIN, 1995 Multilocus analysis for gene-centromere mapping using first polar bodies and secondary oocytes. *Genetics* **139**: 1091-1097.
- DANZMANN, R.G., 2001 LINKMFEX: Linkage analysis package for outcrossed mapping families with male or female exchange of the mapping parent. <http://www.uoguelph.ca/~rdanzman/software>.



- DANZMANN, R. G. y K. GHARBI, 2001 Gene mapping in fishes: a means to an end. *Genetica* **111**: 3-23.
- FINCHAM, J. R. S., P. R. DAY y A. RADFORD, 1979 *Fungal Genetics*. 3.^a ed. Blackwell. Londres.
- FORTES, G. C., A. BOUZA, P. VIÑAS, P. MARTÍNEZ y L. SÁNCHEZ, 2007 Diversity in isochore structure and chromosome Banding in fish. En: *Fish Cytogenetics* (Eds.: Pisano E., Ozouf-Costaz C., Foresti F. y Kapoor B.G.), pp. 405-421. Science Publishers, Enfield (USA).
- FRANCH, R., B. LOURO, M. TSALAVOUTA, D. CHATZIPLIS, C.S. TSIGENOPOULOS, *et al.*, 2006 A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Genetics* **174**: 851-861.
- GHARBI, K., A. GAUTIER, R.G. DANZMANN, S. GHARBI, *et al.*, 2006 A linkage map for brown trout (*Salmo trutta*): chromosome homeologies and comparative genome organization with other Salmonid fish. *Genetics* **172**: 2405-2419.
- GJEDREM, T., 2005 *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*. Springer.
- GREEN, P., K. FALLS y S. CROOKS, 1990 *Documentation for CRIMAP, Version 2.4*. Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA.
- GRIFFITHS, A.J.F., J.H. MILLER, D.T. SUZUKI, R.C. LEWONTIN y W.M. GELBART, 2002 *Genética*. (7.^a ed.). McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid.
- HAAG, C. R., J. W. HOTTINGER, M. RIEK y D. EBERT, 2002 Strong inbreeding depression in a *Daphnia* metapopulation. *Evolution* **56**: 518-526.
- HALLIGAN, D.L., y P.D. KEGHTLEY, 2003 How many lethal alleles?. *TREE* **19**: 57-59.
- HARTL, D. L. y E. W. JONES, 1998 *Genetics. Principles and Analysis*. (4.^a Ed.). Jones and Barlett Publishers. Sudbury, Massachusetts.
- HUBERT, S., y D. HEDGECOCK, 2004 Linkage maps of microsatellite DNA markers for the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* **168**: 351-362.
- HULTEN, M., 1974 Chiasma distribution at diakinesis in the normal human male. *Hereditas* **76**: 55-78.
- JAILLON, O., J.M. AURY, F. BRUNET, J.L. PETIT, STANGE-THOMANN, *et al.*, 2004 Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**: 946-957.
- JOHNSON, S. L., D. AFRICA, S. HORNE y J. H. POSTLETHWAIT, 1995 Half-tetrad analysis in zebrafish: mapping the *ros* mutation and the centromere of linkage group I. *Genetics* **139**: 1727-1735.
- JOHNSON, S. L., M. A. GATES, M. JOHNSON, W. S. TALBOT, S. HORNE, K. BAIK, S. RUDE, J. R. WONG y J. H. POSTLEWAIT, 1996 Centromere-linkage analysis and confirmation of the zebrafish genetic map. *Genetics* **142**: 1277-1288.



- JORDE, L. B. 2001 Consanguinity and prereproductive mortality in the Utah Mormon population. *Hum. Heredity* **52**: 61-65.
- KABACK, D. B., H. Y. STEENSMA y P. DEJONGE, 1989 Enhanced meiotic recombination on the smallest chromosome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3694-3698.
- KAI, W., K. KIKUCHI, M. FUJITA, H. SUETAKE, A. FUJIWARA, *et al.*, 2005 A genetic linkage map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics* **171**: 227-238.
- KATAGIRI, T., S. ASAKAWA, S. MINAGAWA, N. SHIMIZU, I. HIRONO y T. AOKI, 2001 Construction and characterization of BAC libraries for three fish species; rainbow trout, carp and tilapia. *Anim. Genet.* **32**: 200-204.
- KAUFFMAN, E. J., E. E. GESTL, D. J. KIM, C. WALKER, J. M. HITE, G. YAN, P. K. ROGAN, S. L. JOHNSON y K. C. CHENG, 1995 Microsatellite-centromere mapping in the zebrafish (*Danio rerio*). *Genomics* **30**: 337-341.
- KELLY, P.D., F. CHU, I.G. WOODS, P. NGO-HAZELETT, T. CARDOZO, *et al.*, 2000 Genetic linkage mapping of zebrafish genes and ESTs. *Genome Res.* **10**: 558-567.
- KOCHER T.D., W.J. LEE, H. SOBOLEWSKA, D. PENMAN y B. McANDREW, 1998 A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* **148**: 1225-1232.
- KOSAMBI, D.D., 1944 The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics* **12**: 172-175.
- KRISTENSEN, T. N., J. DAHLGAARD y V. LOESCHKE, 2003 Effects of inbreeding and environmental stress on fitness: using *Drosophila buzzatii* as a model organism. *Conserv. Genet.* **4**: 453-465.
- LANDER E.S., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M.J. DALY, S.E. LINCOLN y L. NEWBURG, 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174-181.
- LEE, B.Y., W.L. LEE, J.T. STREELMAN, K.L. CARLETON y E.H. AIMEE, 2005 A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics* **170**: 237-244.
- LI, Q. y A. KIJIMA, 2005 Segregation of microsatellite alleles in gynogenetic diploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Mar. Biotechnol.* **7**: 669-676.
- LINDNER, K. R., J. SEEB, C. HABICHT, K. L. KNUDSEN, E. KRETSCHMER, D. J. REEDY, P. SPRUELL y F. W. ALLENDORF, 2000 Gene-centromere mapping of 312 loci in pink salmon by half-tetrad analysis. *Genome* **45**: 538-549.
- LIU, Q., C. A. GOUDIE, B. A. SIMCO, K. B. DAVIS y D. C. MORIZOT, 1992 Gene-centromere mapping of six enzyme loci in gynogenetic channel catfish. *J. Hered.* **83**: 245-248.



- LIU, Z.J., y J.F. CORDES, 2004 DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**: 1-37.
- LUIKART, G., P.R. ENGLAN, D. TALLMAN, S. JORDAN y P. TARLET, 2003 The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nat. Rev. Genet.* **4**: 981-993.
- MANEERUTTANARUNGOJ, C., S. P-ONGSOMBOON, S. WUTHISUTHIMETHAVEE, S. KLINBUNGA, *et al.*, 2006 Development of polymorphic expressed sequence tag-derived microsatellites for the extension of the genetic linkage map of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Anim. Genet.* **37**: 363-368.
- MANLY, K.F., y J.M. OLSON, 1999 Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mamm. Genome* **10**: 327-334.
- MARTÍNEZ, P., M. HERMIDA, C. BOUZA, B. G. PARDO, J. CASTRO y R. M. CAL, 2007 Centromere-linkage analysis and consolidation of genetic map in the turbot (*Scophthalmus maximus*) using diploid gynogenetics. *Genetics* (Enviado para publicación).
- MATSUOKA, M. P., A. J. GHARRETT, R. L. WILMOT y W. W. SMOKER, 2004 Gene-centromere distances of allozyme loci in even- and odd-year pink salmon, (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Genetica* **121**: 1-11.
- MCCUNE, A. R., D. HOULE, K. McMILLAN, R. ANNABLE y A. S. KONDRASHOV, 2004 Two classes of deleterious recessive alleles in a natural population of zebrafish, *Danio rerio*. *Proc. R. Soc. Lond. B* **271**: 2025-2033.
- MENDELSON, M. L., B. H. MAYALL, E. BOGART, D. H. II MOORE y B. H. PERRY, 1973 DNA content and DNA-based centromeric index of the 24 human chromosomes. *Science* **179**: 1126-1129.
- MIYAKE, T., y C.T. AMEMIYA, 2004 BAC libraries and comparative genomics of aquatic chordate species. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **138**: 233-244.
- MOEN, T., K. T. FJALESTAD, H. MUNCK y L. GÓMEZ-RAYA, 2004 A multistage testing strategy for detection of quantitative trait loci affecting disease resistance in Atlantic salmon. *Genetics* **167**: 851-858.
- MOHIDEEN, M. A. P. K., J. L. MOORE y K. C. CHENG, 2000 Centromere-linked microsatellite markers for linkage groups 3, 4, 6, 7, 13, and 20 of zebrafish (*Danio rerio*). *Genomics* **67**: 102-106.
- MOORE, S.S., V. WHAN, G.P. DAVIS, K. BYRNE y D.J.S. HETZEL, 1999 The development and application of genetic markers for the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* **173**: 19-32.
- MORISHIMA, K., I. NAKAYAMA y K. ARAI, 2001 Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Genetica* **111**: 59-69.
- MORTON, N.E., 1995 LODs past and present. *Genetics* **140**: 7-12.



- NARUSE, K., S. FUKAMACHI, H. MITANI, M. KONDO, *et al.*, 2000 A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics* **157**: 1773–1784.
- NARUSE, K., H. HORI, N. SHIMIZU, Y. KOHARA y H. TAKEDA, 2004 Medaka genomics: a bridge between mutant phenotype and gene function. *Mech. Develop.* **121**: 619–628.
- NICHOLS, K., M., W. P. YOUNG, R. G. DANZMANN, *et al.* 2003 A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Genet.* **34**: 102–115.
- NOMURA, K., K. MORISHIMA, H. TANAKA, T. UNUMA, K. OKUZAWA, H. OHTA y K. ARAI, 2006 Microsatellite-centromere mapping in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) by half-tetrad analysis using induced triploid families. *Aquaculture* **257**: 53–67.
- NONNEMAN, D., y G.D. WALDBIESER, 2005 Isolation and enrichment of abundant microsatellites from a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) brain cDNA library. *Anim. Biotechnol.* **16**: 103–116.
- NUEZ, F., 2000 Introducción al análisis del ligamiento y cartografía de marcadores simples. En: *Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal.* (Nuez, F., y J.M. Carrillo, Eds). Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. pp: 153–293.
- NUEZ, F., y J.M. CARRILLO, 2000 *Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal.* (Editores). Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.
- O'MALLEY, K. G., T. SAKAMOTO, R. G. DANZMANN y M. M. FERGUSON, 2002 Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes. *J. Hered.* **94**: 273–284.
- OHARA, E., T. NISHIMURA, Y. NAGAKURA, T. SAKAMOTO, K. MUSHIAKE y N. OKAMOTO, 2005 Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). *Aquaculture* **244**: 41–48.
- OTT, J. 1999 *Analysis of Human Genetic Linkage*. (3.^a ed) Johns Hopkins Press, Baltimore, MD.
- PARDO, B., C. FERNÁNDEZ, M. HERMIDA, A. VÁZQUEZ, M. PÉREZ, P. PRESA, M. CALAZA, J.A. ALVAREZ-DIOS, A.S. COMESAÑA, J. RAPOSO-GUILLÁN, C. BOUZA y P. MARTÍNEZ, 2007 Development and characterization of 248 novel microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genome* **50**: 329–332.
- PEREZ, F., C. ERAZO, M. SHINAULA, F. VOLCKAERT y J. CALDERON, 2004 A sex-specific linkage map of the white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* based on AFLP markers. *Aquaculture* **242**: 105–118.
- PERKINS, D. D. 1962 Crossing-over and interference in a multiply marked chromosome arm of *Neurospora*. *Genetics* **47**: 1253–1274.



- PHILLIPS, R.B., A. AMORES, M.R. MORASCH, C. WILSON Y J.H. POSTLETHWAIT, 2006a Assignment of zebrafish genetic linkage groups to chromosome. *Cytogenet. Genome Res.* **114**: 155-162.
- PHILLIPS, R.B., K.M. NICHOLS, J.J. DEKONING, M.R. MORASH, *et al.*, 2006b Assignment of rainbow trout linkage groups to specific chromosomes. *Genetics* **174**: 1661-1670.
- PIFERRER, F., R. M. CAL, C. GÓMEZ, B. ALVAREZ-BLÁZQUEZ, J. CASTRO y P. MARTÍNEZ, 2004 Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture* **238**: 403-419.
- POSTLETHWAIT, J.H., S.L. JOHNSON, C.N. MIDSON, W.S. TALBOT, M. GATES, E. BALLINGER, D. AFRICA, R. ANDREWS, T. CARL, J.S. EISEN, S. HORNE, C.B. KIMMEL, M. HUTCHINSON, M. JOHNSON y A. RODRÍGUEZ, 1994 A genetic linkage map for the zebrafish. *Science* **264**: 699-703.
- SAKAMOTO, T., R. G. DANZMANN, K. GHARBI, P. HOWARD, A. OZAKI, *et al.* 2000 A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* **155**: 1331-1345.
- SARROPOULOU, E., R. FRANCH, B. LOURO, D.M. POWER, *et al.* 2007 A gene-based radiation hybrid map of the gilthead sea bream *Sparus aurata* refines and exploits conserved synteny with Tetraodon nigroviridis. *BMC Genomics* (DOI 10.1186/1471-2164-8-44)
- SEKINO, M., y M. HARA, 2007 Linkage maps for the Pacific abalone (Genus *Haliotis*) based on microsatellite DNA markers. *Genetics* **175**: 945-958.
- SEWELL, M.M., B.K. SHERMAN y D.B. NEALE, 1999 A consensus map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. Construction and integration of individual linkage maps from two outbred three-generation pedigrees. *Genetics* **151**: 321-330.
- SHIMODA, N., E.W. KNAPIK, J. ZINITI, C. SIM, E. YAMADA, S. KAPLAN, D. JACKSON, F. DE SAUVAGE, H. JACOB y M.C. FISHMAN, 1999 Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics* **58**: 219-232.
- SINGER, A., H. PERLMAN, Y. YAN, C. WALKER, G. CORLEY-SMITH, *et al.*, 2002 Sex-specific recombination rates in zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics* **160**: 649-657.
- STRACHAN, T. y A. READ, 1999 *Human Molecular Genetics*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- STREISINGER, G., F. SINGER, C. WALKER, D. KNAUBER y N. DOWER, 1986 Segregation analysis and gene-centromere distance in zebrafish. *Genetics* **112**: 311-319.
- STURTEVANT, A.H., 1913 The linear arrangement of sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J. Exp. Zool.* **14**: 43-59.



- SUZUKI, D. T., A. J. F. GRIFFITHS, J. H. MILLER y R. C. LEWONTIN, 1992 *Genética. Introducción al Análisis Genético*. 4.º ed. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid.
- TASSANAKAJON, A., S. KLINBUNGA, N. PAUNGLARP, V. RIMPHANITCHAYAKIT, *et al.* 2006 *Penaeus monodon* gene discovery project: the generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene* **384**: 104-112.
- THORGAARD, G. H., F. W. ALLENDORF y K. L. KNUDSEN, 1983 Gene-centromere mapping in rainbow trout: high interference over long map distances. *Genetics* **103**: 771-783.
- THORSEN, J., B. ZHU, E. FRENGEN, K. OSOEGAWA, P.J. DE JONG, B.F. KOOP, W.S. DAVIDSON y B. HOYHEIM, 2005 A highly redundant BAC library of Atlantic salmon (*Salmo salar*): an important tool for salmon projects. *BMC Genomics* **6**: 50.
- WALDBIESER, G.C., B.G. BOSWORTH, D.J. NONNEMAN y W.R. WOLTERS, 2001 A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Genetics* **158**: 727-734.
- WANG, C.M., Z.Y. ZHY, L.C. LO, F. FENG, G. LIN, W.T. YANG, J. LI y G.H. YUE, 2007 A microsatellite linkage map of barramundi, *Lates calcarifer*. *Genetics* **175**: 907-915.
- WEIR, B.S., 1996 *Genetic Data Analysis*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- WILSON, K., Y. LI, V. WHAN, S. LEHNERT, K. BYRNE, *et al.*, 2002 Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. *Aquaculture* **204**: 297-309.
- WINDEMUTH, C., H. SIMIANER y S. LIEN, 1998 Fitting genetic mapping functions based on sperm typing: results for three chromosomal segments in cattle. *Anim. Genet.* **29**: 425-434.
- WORAM, R.A., C. MCGOWAN, J.A. STOUT, K. GHARBI, M.M. FERGUSON, *et al.* 2004 A genetic linkage map for Arctic char (*Salvelinus alpinus*): evidence for higher recombination rates and segregation distortion in hybrid versus pure strain mapping parents. *Genome* **47**: 304-315.
- YOUNG, W.P., P.A. WHEELER, V.H. CORYELL, P. KEIM y G.H. THORGAARD, 1998 A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics* **148**: 839-850.
- YU, Z.N., y X.M. GUO, 2003 Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Biol. Bull.* **204**: 327-338.
- ZANE, L., L. BARGELLONI y T. PATARNELLO, 2002 Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* **11**: 1-16.
- ZHANG, L., C. YANG, Y. ZHANG, L. LI, X. ZHANG, Q. ZHANG y J. XIANG, 2006 A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-



linked microsatellite markers and high recombination rates. *Genetica* (DOI 10.1007/s10709-006-9111-8).

ZHAO, H., y T.P. SPEED, 1996 On genetic map funtions. *Genetics* **142**: 1369-1377.

ZICKLER, D. y N. KLECKNER, 1999 Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* **33**: 603-754.

9

LOCALIZACIÓN DE GENES Y SELECCIÓN MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

LOCALIZACIÓN DE GENES Y SELECCIÓN MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

M. Pérez-Enciso

ICREA-Universitat Autònoma de Barcelona

M. Á. Toro

CIT-INIA

Resumen

Se repasan los principales métodos para la identificación de genes con un efecto sobre caracteres complejos o cuantitativos (QTL) en acuicultura. Se detallan los dos principales enfoques que se emplean en la actualidad basados, respectivamente, en estudios de ligamiento y de asociación. A continuación, estudiamos dos nuevos enfoques, que se basan en la utilización de microarrays de expresión como ayuda para la detección de QTL y en la identificación de la selección a partir de su efecto en la variabilidad nucleotídica. También se repasan las diversas estrategias posibles para la utilización de marcadores como ayuda en un programa de selección. Finalmente, mencionamos brevemente los principales resultados de QTL que hay hasta el momento en peces, así como el software disponible.

Abstract

We summarize the two main methods for quantitative trait loci (QTL) detection in aquaculture that are based, respectively, in linkage and in association analyses. Next, we study two new emerging approaches. The first



one (genetical genomics) uses data from expression microarrays to improve knowledge on QTL. The second one tries to infer the effect of selection on the genome from the pattern of nucleotide variability. We also mention what are the different possibilities to improve selection using molecular markers. Finally, the main experiments for QTL in fishes are discussed, as well as software available.

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que la carpa se domesticó en China hace 3000 – 4000 años, la acuicultura es una actividad ganadera muy reciente, sobre todo si se compara con la cría del resto de animales y plantas domésticos, que comenzó en el Neolítico hace aproximadamente 7000 – 10000 años. Por tanto, las razas y líneas de animales domésticos tradicionales terrestres están mucho más diferenciadas entre sí y con respecto al ancestro salvaje de lo que puedan estar las poblaciones acuícolas. Por un lado, todavía no podemos hablar propiamente en términos de *razas* y, por otro, no es de esperar muchas diferencias entre las poblaciones cultivadas y las silvestres. A menudo hay, además, intercambio genético entre las poblaciones en cautividad y las silvestres, lo que no suele ocurrir en las especies ganaderas tradicionales.

Estas consideraciones son importantes porque gran parte de las estrategias utilizadas en animales y plantas domésticos para la identificación de genes de interés económico (los llamados QTL, del inglés *quantitative trait loci*) presuponen la existencia de líneas muy divergentes para el carácter o caracteres de interés. Por ejemplo, en porcino es posible encontrar razas muy prolíficas, como algunas asiáticas, y muy poco prolíficas, como el cerdo Ibérico; en aves existe una extrema disparidad entre las razas ponedoras y las de carne. Con todo, el perro es seguramente la especie que presenta una mayor variabilidad fenotípica; es también la que primero se domesticó. Otro aspecto importante es que las herramientas genéticas y genómicas disponibles (mapas genéticos, marcadores moleculares, *microarrays*, etc) son más escasas en especies acuícolas que en las ganaderas tradicionales (capítulos 8. y 12). A ello también contribuye el hecho de que sólo hay cinco especies



ganaderas principales, mientras que el número de especies acuícolas de interés económico es muchísimo mayor. Una dispersión de recursos científicos y económicos en acuicultura es, por tanto, inevitable.

De todas formas, la identificación de loci con interés económico en peces va a aumentar exponencialmente en los próximos años. Por un lado, nos podemos beneficiar del gran número de desarrollos teóricos y de los programas informáticos que hay disponibles y que se han aplicado con éxito en otras especies. Por otro, la aplicación de técnicas genómicas a gran escala (secuenciación 454, *microarrays*, etc) permite que la disponibilidad de recursos tales como secuencias del genoma completo y mapas de polimorfismo sean una realidad en un futuro no muy lejano. No hay que olvidar que el genoma de muchas especies acuícolas es mucho más pequeño y menos repetitivo que el de la mayoría de animales domésticos. Finalmente, el genoma de los peces es a menudo mucho más plástico que el de mamíferos y aves y nos permite obtener sin dificultad poliploides o líneas dihaploides.

En este capítulo repasamos las principales técnicas que se han utilizado para la detección de QTL y para ir más allá, esto es, para identificar las mutaciones causales. Las dos primeras, análisis de ligamiento y análisis de asociación, son muy populares y de gran tradición en la literatura especializada. La siguiente, genética genómica, es mucho más reciente y su coste mucho más elevado que los métodos tradicionales. La última, la huella de la selección o de la domesticación, requiere de un conocimiento detallado de la secuencia de ADN. A continuación, repasamos cómo podemos utilizar los marcadores para asistir en la selección. Ésta, sin duda, podría ser una de las aplicaciones industriales más importantes de los marcadores. Finalizamos el capítulo con una revisión de algunos resultados experimentales publicados.

2. CONCEPTOS BÁSICOS

Tal como se ha comentado en el capítulo 4 la mayoría, si no todos, los caracteres de interés económico son cuantitativos (en genética humana, a dichos caracteres se les denomina a menudo 'complejos'). Un carácter cuantitativo o complejo es aquél cuya expresión se ve afectada por más de un gen (poligénico) y por el ambiente. Estas



dos características tiene dos consecuencias importantes: primera, el carácter presenta una distribución continua y no en clases; segunda, no hay una relación unívoca entre genotipo y fenotipo, un mismo fenotipo puede estar causado por distintos genotipos, y un mismo genotipo resultar en diferentes fenotipos. Según esta definición, está claro que la mayoría de los caracteres de interés son complejos, hay muy pocos casos en los que el ambiente no influya en el fenotipo y de que toda la variabilidad esté explicada por un solo gen. La relación entre fenotipo y genotipo se establece, en consecuencia, mediante leyes probabilísticas y no con la mera observación del fenotipo y de la variabilidad a nivel molecular. Ello quiere decir que el estudio e identificación de genes con efecto cuantitativo requiere un tratamiento matemático, más o menos sofisticado, pero ineludible. Uno de los objetivos de este capítulo es hacer accesible los conceptos estadísticos necesarios a un lector interesado pero sin una formación matemática especializada.

Como hemos dicho anteriormente, el fenotipo se ve afectado tanto por factores ambientales como genéticos. En la nomenclatura habitual estadística, este concepto se expresa así:

$$y_i = \mu_i + g_i + e_i \quad (1)$$

donde y_i se refiere al fenotipo del i -ésimo individuo, μ_i representa los efectos ambientales por los que se corrige el fenotipo (sexo, alimentación, temperatura del agua, etc), g_i es el genotipo del individuo y e_i , el residuo. Todos los modelos estadísticos deben incluir un residuo ya que, tal como comentamos, la relación entre fenotipo y genotipo no es nunca perfecta y unívoca; el residuo cuantifica la divergencia entre lo esperado (la predicción del modelo) y lo observado (los fenotipos, y). Es muy fácil extender este modelo sencillo al caso en que tengamos varios loci:

$$y_i = \mu_i + \sum_j g_{ij} + e_i \quad (2)$$

donde el sumatorio j es desde el locus 1 al número de loci que afectan al carácter. De forma similar, es muy fácil en esta fórmula incluir posibles efectos de epistasia (interacción) entre loci. Una vez que conocemos los genotipos y los fenotipos, podríamos estimar los efectos de los genotipos, así como de sus interacciones. También se pueden



realizar los diversos tests estadísticos para probar la significación de los efectos genéticos.

Pero las ecuaciones (1) y (2) son difíciles de establecer. ¿Cómo podemos conocer los genotipos de los individuos? ¿Cómo podemos saber cuántos loci hay en la ecuación 2? ¿Cómo podemos saber cuántos alelos hay en cada locus? Si tuviéramos toda esa información sería fácil, en principio, estimar e identificar los efectos genéticos. Pero no la tenemos.

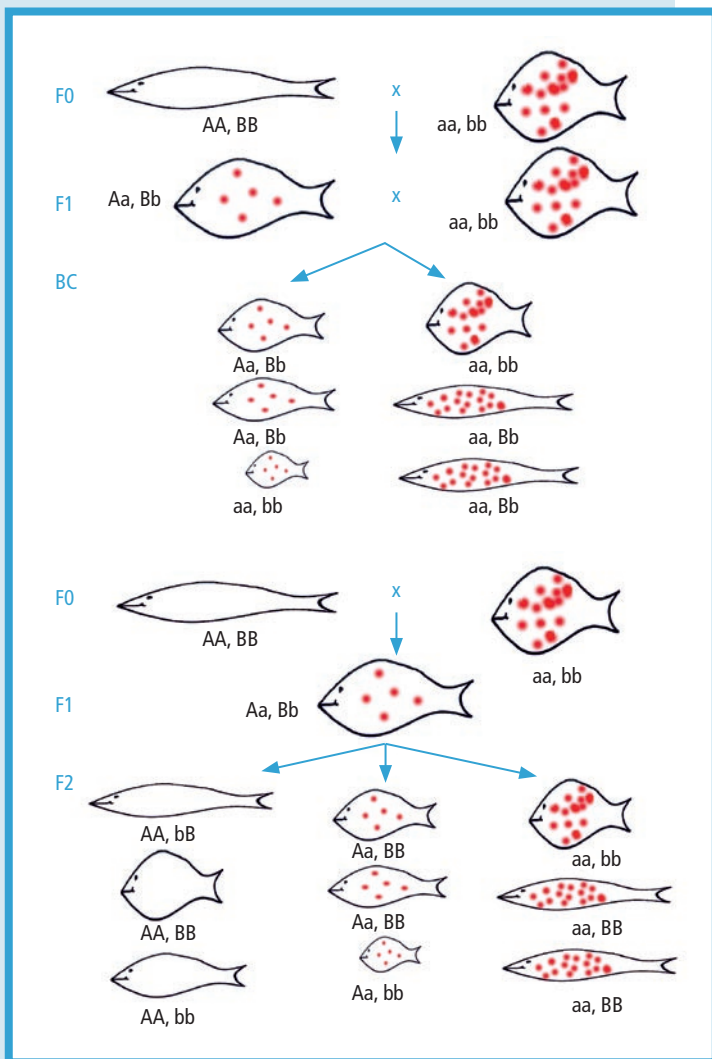
3. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

Tenemos que comenzar, por tanto, con objetivos menos ambiciosos. Supongamos que, inicialmente, nos contentamos con acotar de forma aproximada la posición de los loci más importantes que afectan al carácter de interés. Para ello, el análisis de QTL mediante ligamiento es una herramienta muy poderosa y, sobre todo, muy robusta. Funciona razonablemente bien en la mayoría de las situaciones. Además, hoy en día, su coste es moderado. Requiere del conocimiento de marcadores moleculares (microsatélites o polimorfismos de un solo nucleótido, SNPs, principalmente) y de un pedigrí cuyos individuos se han genotipado y fenotipado. Existen dos tipos de diseño experimental: un cruce entre líneas divergentes y un análisis de familias, de hermanos o medios hermanos. Ambos diseños están esquematizados en las Figuras 1 y 2.

El principio subyacente al análisis de ligamiento es muy sencillo: se trata de comparar los fenotipos de individuos que hayan recibido uno u otro alelo de los padres. El caso más sencillo es el de un cruce entre dos líneas completamente consanguíneas (Fig. 1), en peces se podría tratar de dos líneas clonales. Supongamos que tenemos un retrocruzamiento (BC) entre dos líneas y que las tres generaciones del pedigrí se han genotipado para una serie de marcadores, se dispone además de registros fenotípicos en la última generación, BC. Consideremos inicialmente el efecto de un solo marcador (Tabla 1) con dos alelos distintos en cada una de las líneas fundadoras, A y a . La diferencia fenotípica esperada entre los individuos de la generación BC homocigotos A y a es $\Delta = \bar{y}_A - \bar{y}_a = 2\alpha(1 - 2r_1)$ (3) donde r_1 es la fracción de recombinación entre el marcador y el locus causal, y α es el efecto aditivo del gen, suponiendo que el QTL tiene también dos alelos y que

**FIGURA 1.**

Esquema de un retrocruzamiento (BC) y de un cruce F2. Se muestra un cruce entre dos poblaciones divergentes, en este caso una es alargada y lisa y la otra, ancha y moteada. Se genotipan dos marcadores, *A* y *B*, con alelos distintos en cada una de las poblaciones. Si los caracteres se comportan de forma aditiva, el híbrido F1 será intermedio fenotípicamente. En la BC y F2 se produce la segregación y esperamos peces de todas las combinaciones posibles. En la figura se ve que el marcador *A* está asociado al moteado, pero no a la forma del animal. El marcador *B* no se asocia con ninguno de los dos caracteres.



alelos alternativos están fijados en cada una de las líneas. La varianza de Δ es $2 [\sigma^2 + 4 \alpha^2 r_1 (1 - r_1)] / n$, donde n es el número de individuos BC y σ^2 , la varianza fenotípica intra genotipo. Podemos testar si hay algún efecto asociado a cada uno de los marcadores haciendo una simple prueba t.



TABLA 1.

Estima del efecto asociado a un marcador en un retrocruzamiento. Arriba, asociación con un solo marcador A; abajo, cartografía por intervalos con dos marcadores, A y B separados por una fracción de recombinación r , r_1 y r_2 son las tasas de recombinación entre el QTL y los marcadores A y B, respectivamente.

Subyacentes			Observados		
Genotipo	Frecuencia	Valor fenotípico	Genotipo	Frecuencia	Valor fenotípico
AQ	$(1 - r_1)/2$	α	A—	1/2	$(1 - 2r_1)\alpha$
Aq	$r_1 / 2$	$-\alpha$			
aQ	$r_1/2$	α	a—	1/2	$(2r_1 - 1)\alpha$
aq	$(1 - r_1)/2$	$-\alpha$			

Subyacentes			Observados		
Genotipo	Frecuencia	Valor fenotípico	Genotipo	Frecuencia	Valor fenotípico
AQB	$(1 - r_1)(1 - r_2)/2$	α	AB	$(1 - r)/2$	$\sim \alpha$
AqB	$r_1 r_2/2 \sim 0$	$-\alpha$			
AQb	$(1 - r_1) r_2/2$	α	Ab	$r/2$	$\sim (r_1 - r_2) \alpha / r$
Aqb	$r_1 (1 - r_2)/2$	$-\alpha$			
aQB	$r_1 (1 - r_2)/2$	α	Ab	$r/2$	$\sim (r_2 - r_1) \alpha / r$
aqB	$(1 - r_1) r_2/2$	$-\alpha$			
aQb	$r_1 r_2/2 \sim 0$	α	Ab	$(1 - r)/2$	$\sim -\alpha$
aqb	$(1 - r_1)(1 - r_2)/2$	$-\alpha$			

Pero consideremos con más detalle la ecuación (3): el efecto aditivo (α) y la fracción de recombinación (r_1) están confundidos. En otras palabras, esto quiere decir que podemos encontrar un marcador muy asociado al fenotipo, bien porque el efecto del QTL (α) sea muy grande, bien porque el marcador y el QTL estén muy próximos ($r_1 \sim 0$). Esto es fácil de ver: si Δ , pongamos, vale 10, hay infinitas combinaciones de α y r que dan este valor, por ejemplo $\alpha = 5$ y $r_1 = 0$, $\alpha = 50$ y $r_1 = 0.45$, etc. Este resultado tiene consecuencias muy importantes: quiere decir que no podemos estimar simultáneamente la posición y el efecto del QTL con un solo marcador: hay una incertidumbre *irresoluble* en el sistema. Por tanto, para estimar ambos parámetros, posición y efecto, necesitamos considerar parejas de marcadores, lo que se ha venido a llamar cartografía por intervalos (*interval mapping*).



La Tabla 1 ilustra el principio de la cartografía por intervalos. Supongamos dos marcadores separados por una fracción de recombinación r conocida o estimada previamente. Para una determinada posición del QTL entre ambos marcadores, digamos que el QTL esté a una fracción de recombinación r_1 del primer marcador y r_2 del segundo, podemos obtener los valores fenotípicos esperados para cada uno de los individuos con genotipos AB , BB , Ab y ab (Tabla 1). Es decir, suponiendo un QTL con alelos Q y q , donde los genotipos de las líneas parentales son AQB y aqb , podemos calcular la probabilidad del genotipo para el QTL de un individuo cualquiera dado su genotipo para los marcadores. Por tanto, hay que modificar las ecuaciones (1) y (2) para que tengan en cuenta la incertidumbre en el conocimiento de cada genotipo:

$$y_i = \mu_i + \sum_j \sum_k p_{ijk} g_{jk} + e_{ir} \quad (3)$$

donde p_{ijk} es la probabilidad de que el individuo i tenga el genotipo k en el locus j . Lógicamente, si conociéramos con absoluta precisión el genotipo del QTL para todos los individuos, las probabilidades p son sólo por ceros y unos y recuperamos la ecuación (2). Como no los conocemos, necesitamos inferirlos a partir de los marcadores adyacentes. El proceso para la búsqueda de QTL es entonces sencillo. Consiste en calcular la verosimilitud del modelo (3) para cada una de las posiciones en las que buscamos el QTL, elegir aquella posición que corresponde a una máxima verosimilitud y testar a continuación si el modelo en la posición máximo verosímil es significativo. Si el modelo fuera significativo, querría decir que hemos localizado

TABLA 2.
Ventaja relativa esperada de la respuesta a la selección fenotípica asistida con marcadores respecto a la selección fenotípica en presencia de desequilibrio de ligamiento poblacional, en función de la heredabilidad del carácter (h^2) y de la fracción de varianza genética explicada por los marcadores (q_m).

	q_m		
h^2	0,10	0,30	0,50
0,10	1,35	1,87	2,29
0,25	1,11	1,31	1,51
0,50	1,03	1,08	1,15



un QTL para el carácter en cuestión en esa zona del genoma. Una medida habitual para cuantificar la evidencia a favor de un QTL es el LOD-score, que se define como el logaritmo en base 10 de la probabilidad de haber obtenido los datos observados con y sin el QTL en el modelo.

Un punto muy importante y debatido es cómo elegir el umbral por encima del cual declaramos que un QTL es significativo. La mayoría de científicos están acostumbrados a utilizar el nivel de significación del 5% que está tabulado para la mayoría de tests estadísticos. En el caso de búsqueda de QTL, encontrar el nivel de significación adecuado es más difícil por dos motivos: 1) no conocemos la distribución del estadístico bajo la hipótesis nula, es decir, los valores no están tabulados en este caso, y 2) estamos realizando un gran número de tests no independientes para llegar a la estima máximo verosímil de la posición del QTL. En la actualidad, una de las estrategias más populares es la permutación. Su principio es muy sencillo y consiste en permutar los datos respecto de los marcadores un número suficientemente grande de veces, más de 100 veces, 1000 es un número adecuado. Para cada uno de las réplicas permutadas se realiza un análisis de QTL, que lógicamente será «falso», y se guarda el valor de estadístico (valor F, cociente de verosimilitudes, etc) obtenido en cada réplica. Finalmente, se ordenan los estadísticos de mayor a menor y el nivel de significación del x% será el obtenido en la réplica x%-ésima. Por ejemplo, el nivel del 5% corresponderá al quinto mayor estadístico si se han realizado 100 réplicas, o al 50 si hay 1000 réplicas.

Los diseños de cruzamientos son bastante potentes y LYNCH y WALSH (1998) dan fórmulas aproximadas para calcular esta potencia. Por ejemplo para detectar un QTL aditivo que explica un 10% de la varianza de una F2 entre líneas consanguíneas con una potencia del 90% y un error de tipo I de 0,05 se requieren tan sólo 101 individuos si el marcador está completamente ligado y 281 si está a una distancia de 20 centimorgans. El número si duplicaría si el diseño fuera de retrocruzamiento.

Uno de los principales inconvenientes de los cruces entre poblaciones divergentes es, como ya apuntamos antes, que la diferenciación entre las poblaciones de peces es mucho menor que la existente en las especies ganaderas tradicionales. Como veremos más adelante, sin embargo, se han utilizado a veces líneas clonales divergentes como en



el caso de la trucha. Si no podemos asegurar que las líneas parentales tengan alelos diferentes para los QTL y que estén fijados, este diseño pierde bastante potencia.

Una alternativa es realizar un análisis dentro de familias. Este diseño es popular en especies cuyo intervalo generacional es muy largo y donde es difícil y gravoso económicamente realizar cruces, tal como es el caso del vacuno. El esquema de un diseño de familias está en la Figura 2. Normal-

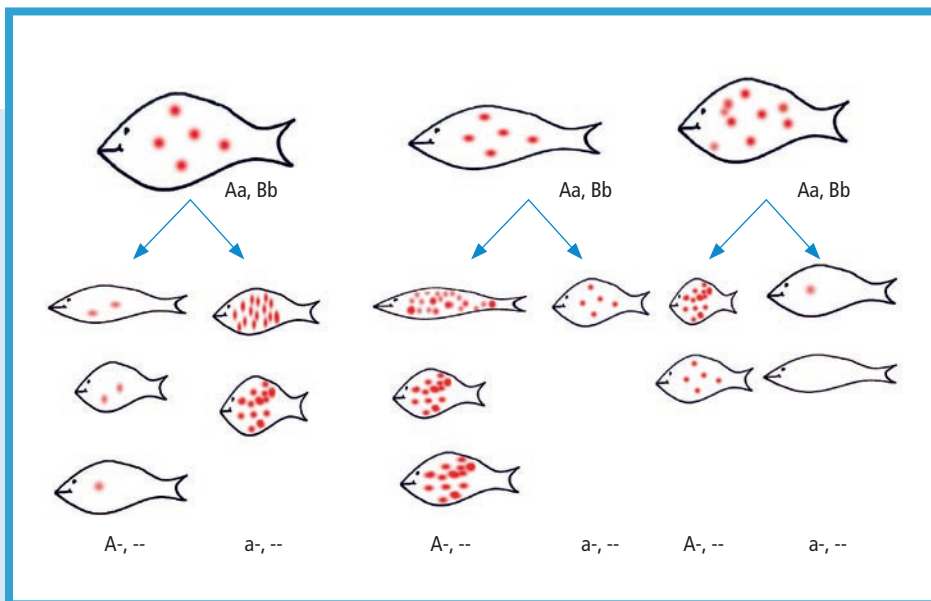


FIGURA 2.

Esquema de un análisis de ligamiento en familias (diseño de medios hermanos). Se muestran tres individuos heterocigotos para los marcadores analizados, A y B. Debajo, se muestra la progenie clasificada de acuerdo al alelo recibido del progenitor en el primer marcador (A), una barra (-) indica que no nos interesa el alelo recibido.

Podemos apreciar que el marcador A está asociado con el grado de moteado. Sin embargo, también vemos que el nivel de moteado varía incluso entre individuos con el mismo marcador y, lo que es más importante, que no se puede inferir que un alelo concreto esté asociado a aumento o disminución del moteado. Por ejemplo, en la primera familia el alelo 'A' está asociado a un menor moteado, pero ocurre lo contrario en el resto de familias. Esto quiere decir que las fases entre los alelos del QTL y del marcador varían entre familias. También observamos que el número de descendientes por familia puede variar.



mente, se usan familias de medios hermanos donde el padre es común a todos los individuos de una familia pero la madre puede ser distinta en cada caso. En peces o moluscos, donde la fertilidad de la hembra puede ser tan elevada como la del macho, la distinción entre familias de medios hermanos o hermanos completos no es tan relevante. Matemáticamente, el análisis de familias de hermanos es muy similar al de cruces entre poblaciones consanguíneas con una excepción: en el caso de familias estimamos un efecto del QTL para cada familia, y hay tantas estimas de efectos y de posiciones como familias. Esto es así porque no se puede garantizar que el QTL esté segregando en todas las familias y porque un alelo del marcador puede estar asociado a efectos del QTL distintos en cada familia. Tampoco podemos conocer *a priori* el número de alelos del QTL. Al estimar más parámetros, esto es, más efectos y posiciones del QTL, el test estadístico tiene menos potencia en el caso de familias que en un cruce entre líneas consanguíneas, a igual tamaño poblacional, igual efecto del QTL y mismo número de marcadores, lógicamente. En MARTINEZ *et al.* (2002) puede encontrarse una comparación de los diseños doble-haploide, hermanos y jerárquicos (en los que la descendencia es el resultado varios padres apareados cada uno de ellos con distintas madres). En general, los diseños doble haploide son más potentes, mientras que los diseños jerárquicos tienen un valor más limitado que en las especies ganaderas ya que en peces es relativamente fácil obtener familias muy grandes de hermanos. En cualquier caso la potencia es menor que la de los diseños de cruzamientos. Por ejemplo incluso utilizando 1000 individuos repartidos en una estructura de familias de hermanos óptima la potencia para detectar un gen con efecto α de 0.2 es 0.51 y 0.36 si la varianza residual es 0 y 1 respectivamente. La potencia en el diseño doble-haploide es mayor pero también baja: 0,73 y 0,51 si la varianza residual es 0 y 1 respectivamente.

4. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN

El análisis de ligamiento es una herramienta muy robusta pero que también presenta inconvenientes. La principal limitación es que la precisión con la que estimamos la posición del QTL es muy baja, los intervalos de confianza son del orden de 20 o más centimorgans. Esta baja precisión **no** se puede remediar indefinidamente aumentando el



número de marcadores ni el de individuos, ya que el aumento de individuos o de marcadores sigue una ley de rendimientos decrecientes. Existe un número de marcadores y un tamaño de población máximo por encima del cual los aumentos en precisión son despreciables. Para la mayor parte de situaciones, *grosso modo*, no merece la pena genotipar con densidades inferiores a los 5 cM entre marcadores o aumentar el tamaño de población por encima de un millar de individuos. Esto ocurre porque la precisión en la estima de la posición del QTL depende del número de recombinantes observados. A su vez, como el número de generaciones es sólo de una o dos en los diseños típicos de análisis de ligamiento, la probabilidad de observar recombinantes en una región cada vez más pequeña disminuye muy rápidamente. Esta observación nos lleva a la siguiente paradoja: si queremos identificar la presencia de un QTL, nos interesa minimizar el número de recombinantes para maximizar la probabilidad de cosegregación entre marcador y QTL. Si el objetivo es localizar el gen causal y, por tanto, refinar al máximo la posición del QTL, debemos incluir el máximo posible de recombinantes. En resumen, es muy difícil que la misma población o recurso experimental nos sirva para todos los estadíos, desde la localización inicial del QTL hasta la identificación de la mutación causal.

Para remediar este problema, por tanto, debemos incrementar el número de meiosis en el pedigrí. Esto es difícil, puesto que el acceso a pedigrís de muchas generaciones es casi imposible en la mayoría de especies y aún más en las acuícolas. Además, sólo aumentaríamos el pedigrí en unas pocas generaciones, y no en miles como sería deseable. Por ello, la estrategia adoptada para la cartografía fina de QTL es el estudio de asociación, también llamado de desequilibrio de ligamiento. *Desequilibrio de ligamiento* es uno de los términos más desafortunados en la literatura genética, ya que es bien sabido que puede existir desequilibrio de ligamiento sin ligamiento y que ligamiento no implica desequilibrio de ligamiento. La justificación de este enfoque es que el desequilibrio de ligamiento entre dos marcadores disminuye continuamente debido a la recombinación, *ergo*, si encontramos dos marcadores en desequilibrio de ligamiento a nivel de toda la población, deberían estar muy próximos, más próximos cuanto mayor sea el desequilibrio de ligamiento. Este punto se ilustra en la Figura 3.



Aplicando este principio a la búsqueda de QTL, el objetivo sería encontrar marcadores con algún o algunos alelos en fuerte desequilibrio de ligamiento con el carácter de interés.

Desde el punto de vista estadístico, la presencia de desequilibrio es equivalente a decir que dos variables aleatorias (los dos marcadores) no son independientes. Por tanto, la distribución multivariada (el haplotipo) no se puede predecir exactamente conociendo sólo las distribuciones marginales univariadas (cada uno de los marcadores). Una cuantificación del desequilibrio viene dado por $D = p_{AB} - p_A p_B$, donde p_{AB} es la frecuencia del haplotipo AB y p_A y p_B son las frecuencias de

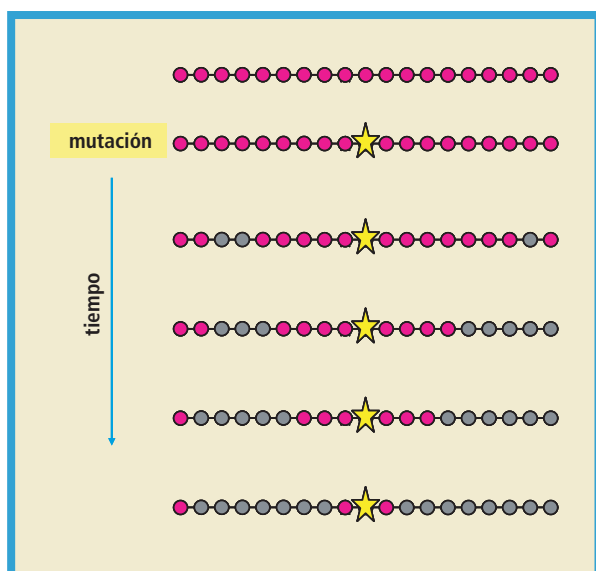


FIGURA 3.

Esquema de la justificación del análisis de desequilibrio de ligamiento. Inicialmente, la mutación (simbolizada por una estrella amarilla) aparece en un solo haplotipo representado por bolas (los polimorfismos) de color malva. En ese momento, el desequilibrio es completo a lo largo de todo el haplotipo

porque la mutación es única (D' sería 1 a lo largo de todo el cromosoma).

En el transcurso de las siguientes generaciones, la recombinación va erosionando el desequilibrio, con lo que la mutación se extiende por la población y aparece en nuevos haplotipos que se representan con bolas grises. Si la mutación es suficientemente antigua, sólo los SNPs más próximos quedan en desequilibrio. Uno de los riesgos de la aplicación del desequilibrio de ligamiento radica en que mutaciones relativamente lejanas también estén asociadas. Esto se representa por la bola de color malva en el extremo izquierdo del haplotipo. esto puede ser debido a doble recombinación, a que un alelo es muy frecuente, retromutación o aparición de nuevas mutaciones.



los alelos A y B de cada marcador. Si hay desequilibrio, $D \neq 0$. Existen numerosas medidas de desequilibrio de ligamiento, la mayoría basadas en la cantidad D . Las dos más utilizadas son la D' de Lewontin y r^2 . El estadístico D' viene dado por $D' = D/D_{\text{MAX}}$, donde

$$D_{\text{MAX}} = \min(p_A p_b, p_B p_a) \text{ si } D > 0$$

$$D_{\text{MAX}} = \min(p_A p_B, p_a p_b) \text{ si } D < 0$$

$$\text{El estadístico } r^2 \text{ se calcula como } r^2 = \frac{D^2}{p_A p_a p_B p_b}.$$

Se puede comprobar fácilmente que r^2 es igual a la raíz cuadrada del coeficiente de correlación de Pearson entre los alelos de cada locus (codificados como 0 y 1). Los comportamientos de D' y r^2 son distintos y hay que tener cuidado en su interpretación. En este sentido, es muy ilustrativo el artículo de ARDLIE *et al.* (2002). D' mide si al menos ha ocurrido una recombinación entre ambos loci, es 1 si sólo se encuentran tres o menos de los cuatro haplotipos posibles, y un número entre 0 y 1 en caso contrario. Un valor $D' = 1$ indica una ausencia de recombinación y, por tanto, esperaríamos que los loci estén próximos. Sin embargo, cualquier otro valor $D' < 1$ no está relacionado con la distancia física, es decir, un valor próximo a cero no indica necesariamente una mayor distancia física que un valor próximo a 1. El criterio r^2 es más estricto que el D' : para que sea 1 requiere, no sólo que no haya habido recombinación, también que las frecuencias alélicas sean idénticas en ambos marcadores. El estadístico r^2 es más adecuado para la cartografía fina que el D' , ya que está más relacionado con la distancia. Ambos estadísticos, D' y r^2 presuponen que los polimorfismos son bialélicos. Cuando los marcadores son multialélicos, la opción recomendada es hacer una tabla de contingencia y usar el valor del nivel de significación de un test chi-cuadrado como medida de asociación.

El principal riesgo de los estudios de asociación es que cualquier fuerza evolutiva afecta al desequilibrio. La mutación es la causa inicial del desequilibrio. Cuando surge una mutación, está en desequilibrio completo con el resto de los polimorfismos, ya que hay una sola copia en la población. Posteriormente, si no desaparece, que es lo más probable, la recombinación va erosionando el desequilibrio inicial (Fig. 4). Pero también la deriva y la selección actúan sobre el desequilibrio. La

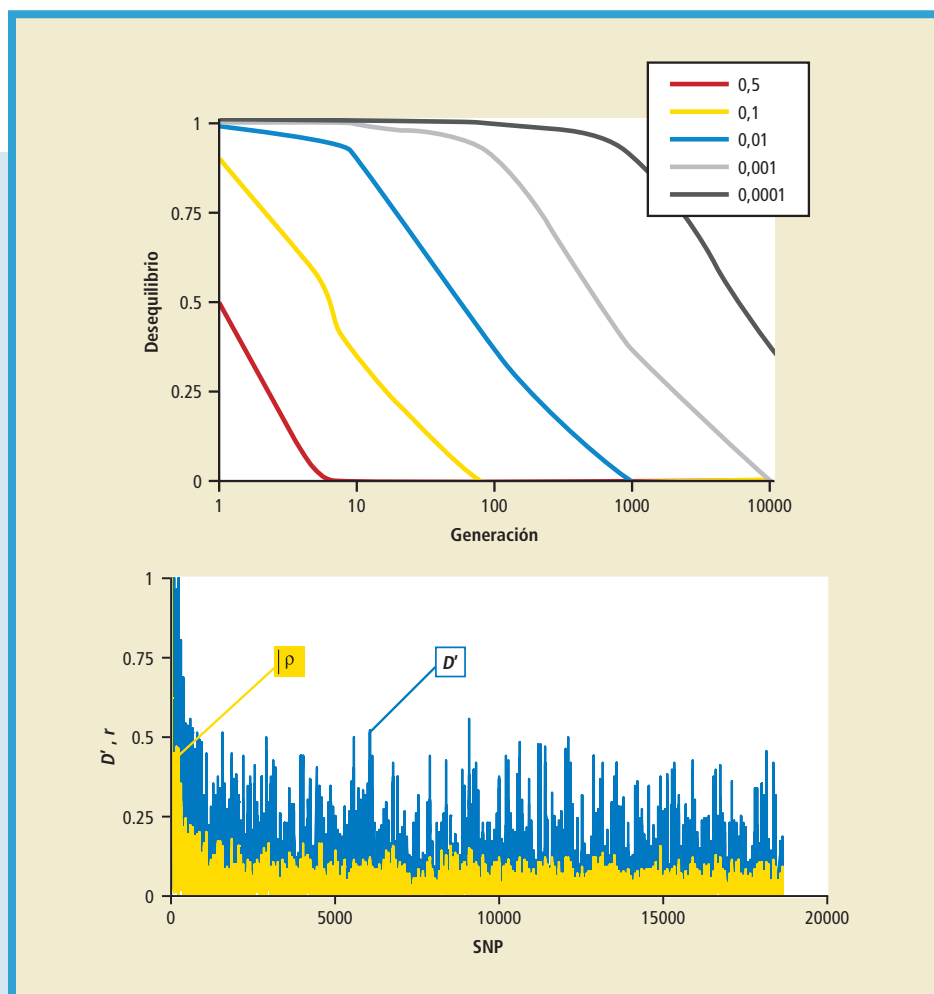


Figura 4.

Arriba, disminución del disequilibrio esperada entre dos marcadores situados a distintas tasas de recombinación en función del número de generaciones transcurridas.

Abajo, comportamiento de dos medidas de disequilibrio de ligamiento, D' y r , en una población simulada sin selección y censo efectivo constante. La figura muestra el disequilibrio entre el primer SNP y 18000 siguientes en un cromosoma de un Morgan de longitud. Se aprecia claramente el perfil errático de ambas medidas a lo largo del cromosoma, a pesar de que los valores máximos están en la proximidad del primer SNP.

En general, el valor de r es menos errático que D' y más fiable, ya que el valor decrece muy rápidamente cuando nos alejamos del primer SNP.



deriva produce una oscilación estocástica en las frecuencias de los distintos haplotipos causada por el censo finito de la población. Un caso particular donde la deriva juega un papel importante es un cuello de botella, que consiste en una reducción drástica del censo efectivo. Este efecto es particularmente importante en poblaciones que se hayan fundado con muy pocos parentales. El cuello de botella puede producir asociaciones espúreas entre loci que estén muy separados en el genoma. Por tanto, debemos prestar especial cuidado en la interpretación de resultados obtenidos en poblaciones pequeñas. Otra situación que puede llevar a asociaciones espúreas es el cruce entre poblaciones (*admixture*, en inglés). También se habla de *estratificación* en este caso. Cuando la población que se analiza es, en realidad, una población híbrida donde hay tanto individuos «nativos» como «foráneos», se puede producir una asociación entre marcadores que es resultado de frecuencias distintas en cada una de las poblaciones «puras» y no de la proximidad entre marcadores. Otra posibilidad es que se esté analizando la base genética de una enfermedad cuya frecuencia es distinta en diferentes razas. Si no corregimos por este fenómeno, los resultados serán equívocos y difíciles de interpretar.

Por último, la selección también actúa sobre el desequilibrio de ligamiento. La teoría de la genética de poblaciones establece que, en ausencia de selección, un alelo que está a frecuencia elevada debe ser antiguo en términos evolutivos. Dicho de otro modo, ante dos alelos, es esperable que el alelo a mayor frecuencia haya aparecido antes en la evolución que el alelo a menor frecuencia. Cuanto más antiguo es un alelo, mayor número de recombinaciones habrán ocurrido y, por tanto, menor es el desequilibrio esperado alrededor del polimorfismo. En cambio, si un determinado alelo es favorecido por la selección, su frecuencia aumentará más rápidamente que un alelo neutro, así como el de los alelos de marcadores que estén en la proximidad, lo que se ha llamado efecto de auto – stop o *hitchhiking*. Las consecuencias de la selección son, por tanto, un aumento en la frecuencia del alelo favorecido, un aumento del desequilibrio de ligamiento alrededor de la posición seleccionada y una disminución de la variabilidad en esa zona. Diversos estudios en la especie humana han utilizado el desequilibrio de ligamiento para inferir selección (SABETI *et al.* 2002; VOIGHT *et al.* 2006).



En la práctica, los perfiles típicos obtenidos con desequilibrio de ligamiento son radicalmente distintos de los observados en estudios de ligamiento. Estos últimos tienden a ser relativamente estables y continuos; los primeros, mucho más erráticos (Figura 4). La razón es que el desequilibrio está muy influido por las frecuencias alélicas, por el muestreo de la población y por la historia demográfica, así como por las tasas de recombinación, de mutación y de conversión génica locales.

De lo anterior podemos concluir que, si bien el desequilibrio de ligamiento es una herramienta que nos puede permitir localizar con precisión las mutaciones causales, también nos puede llevar a falsos positivos. Esta técnica es, por tanto, mucho menos robusta que un análisis de ligamiento. Una de las principales causas de falsos positivos es la estratificación o mezcla de poblaciones. Un diseño que evita las posibles asociaciones espúreas debidas a la estratificación y que presenta la ventaja adicional de que solo requiere genotipar la descendencia enferma y sus progenitores es el denominado TDT (*Transmission Disequilibrium Test*). El TDT compara el número de veces que un alelo, presente en un padre heterocigoto, se transmite o no a la descendencia enferma. Como se detalla en la sección de Resultados experimentales, se ha aplicado para detectar QTLs para resistencia a enfermedades en salmón.

Para sacar el máximo partido de las técnicas basadas en desequilibrio, es importante incidir en dos aspectos: 1) el diseño experimental y 2) el análisis estadístico. Desde el punto de vista del diseño, lo más deseable es muestrear el mismo número de individuos enfermos y sanos (si nos interesamos por una enfermedad), y que la población sea lo más homogénea posible o que estén representados en la misma proporción en ambas categorías (sano / enfermo) todos los factores que pueden influir en dicha enfermedad. Por ejemplo, si hay diferencias de incidencia entre poblaciones, que la proporción de sanos de una población sea la misma que la de otra población. Este diseño es lo que se denomina estudio caso / control. Lógicamente, este diseño se puede aplicar sólo a un carácter binario; en el caso de caracteres cuantitativos, debemos simplemente muestrear de forma que la población estudiada sea lo más homogénea posible desde el punto de vista genético, lo que no siempre es fácil.



En lo que respecta al análisis estadístico, la estrategia más sencilla es realizar una tabla de contingencia en la que se mida asociación entre los alelos del marcador y el carácter mediante una chi cuadrado. Pero esta técnica, que puede ser suficiente en los casos más sencillos, adolece de serios inconvenientes: no permite tener en cuenta caracteres cuantitativos, no permite corregir por efectos ambientales, disminuye su potencia con marcadores multialélicos y considera un solo locus a la vez. Se han desarrollado muchas alternativas al simple test Chi-2. La regresión logística y sus variantes es una de ellas. Esta regresión es un enfoque muy popular para analizar variables discretas, por ejemplo, en una enfermedad hay individuos sanos y enfermos. Mediante la regresión logística, se modeliza la probabilidad de que un individuo sufra la enfermedad dado su genotipo (g_i) y otros efectos ambientales (μ_i):

$$P(y_i = \text{enfermo} \mid \mu_i, g_i) = 1 / [1 + \exp(\mu_i + g_i)] \quad (4)$$

Hay una gran cantidad de software especializado que nos permite obtener estimas de los distintos parámetros, μ_i y g_i , y que, por tanto, nos permite hacer tests de significación e inferir si un determinado alelo o alelos tienen un efecto sobre el carácter. Una forma tradicional de expresar este efecto es el llamado *odds-ratio*, definido como $P / (1-P)$, y que mide la probabilidad de que el evento ocurra vs. que no ocurra. El *odds-ratio* de un determinado efecto viene dado por su coeficiente de regresión en la escala logarítmica, es decir, $\exp(g)$ mediría la diferente probabilidad de enfermar que tendrían los individuos con cada uno de los genotipos. Uno de los aspectos más interesantes de la regresión logística es que permite una modelización muy flexible del carácter, esto es, podemos considerar todo tipo de efectos ambientales o genéticos, análisis de varios caracteres simultáneamente, etc. También se han desarrollado aplicaciones para varios loci simultáneamente. Si se trata de analizar caracteres cuantitativos, podemos emplear el modelo (1) o su extensión (2), excepto que en este caso las variables en g son los polimorfismos cuyo efecto deseamos estimar y que no son, necesariamente, las mutaciones o genes causales.

Notemos, finalmente, una diferencia clave entre el análisis de ligamiento y el de asociación. En el caso de análisis de ligamiento, el alelo del marcador se utiliza sólo y exclusivamente para trazar el origen del



alelo recibido, sea del padre o de la madre. Por ejemplo, el efecto que estimamos en un análisis de ligamiento en familias se basa en la diferencia fenotípica entre los individuos que han recibido un alelo *versus* los que han recibido el otro alelo, y este efecto se estima de forma separada para cada familia. Por tanto, es imposible estimar un efecto si el padre es homocigoto para el marcador ya que toda la progenie habrá recibido el mismo alelo del macho. En un análisis de asociación, estimamos un efecto asignado a cada alelo del marcador. Este efecto se supone constante en toda la población, por tanto, las familias cuyo padre es homocigoto también contribuyen a la estima del efecto de cada alelo.

5. GENÉTICA GENÓMICA

En estos momentos, disponemos de herramientas (*microarrays*) que nos permiten cuantificar el nivel de expresión de prácticamente todos los genes en un gran número de especies ganaderas y de laboratorio. En peces, se han desarrollado *microarrays* en *Fugu*, pez gato, medaka, trucha arcoiris y común, pez cebra, salmón, carpa, lubina asiática, lenguado y rodaballo, entre otras. La lista de especies seguramente aumentará exponencialmente en los próximos años. En diversos capítulos de este libro se habla *in extenso* de la tecnología de *microarrays* (capítulos 12 a 19). Aquí nos interesa la utilización de los *microarrays* para la identificación de QTL. Existen diversas estrategias que repasamos brevemente.

La opción más sencilla es comparar los niveles de expresión entre dos poblaciones que difieran para el carácter de interés. Los genes expresados diferencialmente podrían ser considerados como genes candidatos responsables de las diferencias fenotípicas entre poblaciones. Esta conjetura es peligrosa porque una expresión diferencial no implica causalidad, puede ser un efecto indirecto de cambios en otro gen. Y viceversa, un gen causal no tiene porqué presentar expresión diferencial, su efecto puede haber sido puntual y haber desaparecido cuando se midan los niveles de expresión, o puede ocurrir en un tejido que no se ha analizado. Una aplicación más prometedora es buscar genes expresados diferencialmente y que se localicen en la región del QTL. Esta opción permite minimizar el



riesgo de falsos positivos, pero requiere un conocimiento detallado del genoma de la especie, que falta en la mayoría de las especies acuáticas.

Finalmente, otra estrategia es la llamada genética genómica JANSSEN y NAP (2001). Se trata aquí de combinar ambas herramientas, las de genotipado y las de genómica funcional, para identificar los polimorfismos responsables de la variabilidad en los niveles de expresión. El fundamento de este enfoque es que los niveles de expresión de cada gen son fenotipos, pero más 'sencillos' que caracteres clásicos como el crecimiento o la resistencia a enfermedades debido a su 'proximidad' al genotipo. Por tanto, debería ser más fácil identificar los polimorfismos causales en este caso; en una segunda etapa, correlacionaríamos los genes cuya expresión varía con los QTL obtenidos de forma clásica para entender mejor la base genética de los caracteres complejos. Si bien en peces todavía no hay resultados de este enfoque, sí se ha aplicado esta técnica a diversas especies modelo como levadura, ratón o rata. También hay estudios en la especie humana. De estos trabajos se han podido extraer algunas conclusiones generales. La mayoría de niveles de expresión son poligénicos, se ven afectados por más de un QTL. En algunos casos, la epistasia es importante. Se han identificado algunos *hotspots* de QTL, regiones del genoma que influyen sobre una gran cantidad de niveles de expresión. En estos momentos, no se sabe hasta qué punto esta observación es un artefacto o responde a una región con un regulador muy importante del genoma. Finalmente, en un gran número de casos la posición del polimorfismo regulador coincide con la del gen en sí mismo, llamamos a estos QTL como *cis* QTL (Figura 5).

Los estudios con *microarrays* presentan una serie de dificultades para su aplicación a la identificación de genes causales. Primeramente, es todavía una tecnología muy cara, que genera una gran cantidad de datos cuya fiabilidad no está siempre contrastada. El simple hecho de elegir una técnica de normalización u otra da lugar a resultados que a veces pueden ser muy diferentes. En segundo lugar, la expresión genética es un proceso muy dinámico, tanto espacial como temporalmente. Por tanto, la elección del momento y del tejido en el que se hará el muestreo influirá en los resultados. La existencia de expresión diferencial para un determinado gen no quiere decir que ése sea el gen responsable, la causa de esta expresión diferen-

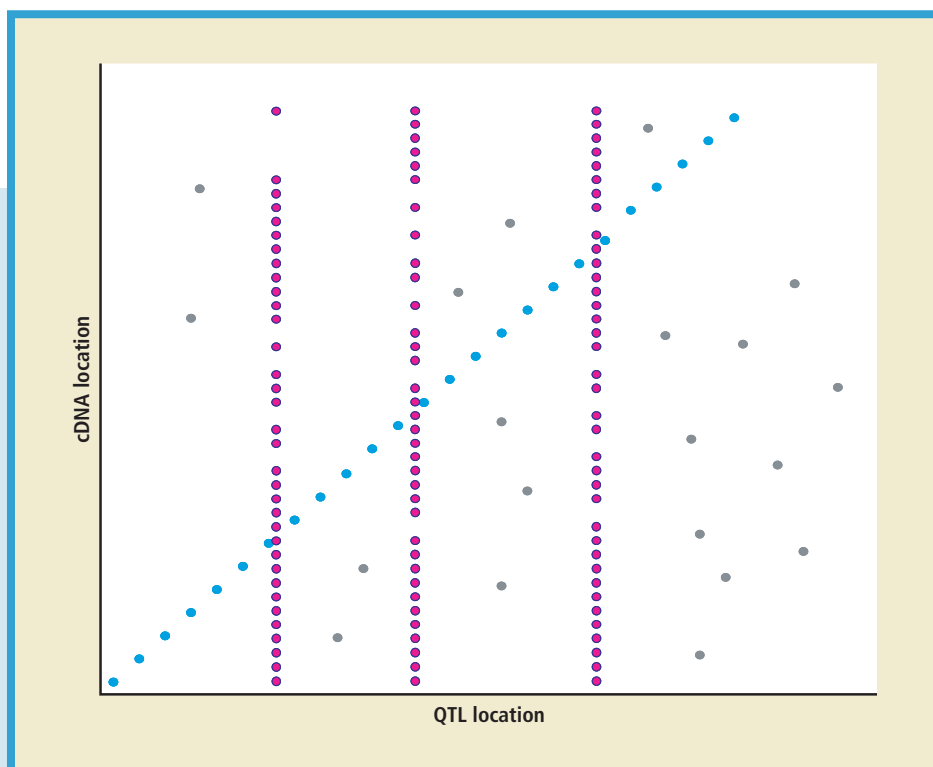


FIGURA 5.

Representación de un estudio de genética genómica. Este tipo de estudios consiste en un análisis de QTL para cada uno de los niveles de cDNA del organismo. La figura muestra con un círculo la posición del QTL para cada uno de los cDNAs. Una posibilidad (círculos celestes) es que la posición del cDNA y del QTL coincidan, estos QTL se dice que están en *cis* y formarían una diagonal en esta representación. Otra posibilidad es que una sola zona del genoma controle la expresión de muchos genes. En este caso hablamos de *hotspots* de eQTL y de que el QTL está en *trans*, en la figura están representados tres *hotspots* con círculos malvas. Por último, también es posible que la posición del QTL no tenga ninguna relación aparente con la del cDNA (círculos grises).

cial puede ser debida a otro gen que actúa sobre el observado. Por último, también debemos destacar que todavía quedan por resolver muchos problemas de índole estadística y computacional en esta área: ¿Qué nivel de significación se debe usar? ¿Son los *hotspots*



de QTL artefactos o no? ¿Cómo modelizar los niveles de expresión? ¿Cómo integrar esta información con la de caracteres complejos de interés económico?

6. LA HUELLA DE LA DOMESTICACIÓN Y DE LA SELECCIÓN

Por domesticación se entiende el proceso mediante el que el hombre ha conseguido criar en cautividad diversas especies con el propósito de que le provean alimento, defensa, ayuda en el trabajo o transporte, etc. Desde el punto de vista genético, la domesticación conlleva dos cambios importantes: un cuello de botella y un cambio selectivo. El cuello de botella ocurre porque los reproductores domesticados son sólo un subconjunto reducido de la población silvestre. El cambio selectivo es debido a la selección natural, puesto que el ambiente en el que vive la especie domesticada es diferente del original, y a la artificial, ya que el hombre impone unos criterios de reproducción para modificar las características de la especie domesticada.

El hecho de que la domesticación se esté produciendo en la actualidad para la mayoría de especies acuícolas presenta algunas ventajas con respecto a las especies tradicionales, ya que podremos disponer de material genético de las poblaciones actuales salvajes y de las domésticas, que poco a poco irán divergiendo de las naturales. Sin embargo, también es de esperar que la diferenciación entre poblaciones sea mucho menor que en las especies tradicionales y de que haya contaminación entre poblaciones domésticas y salvajes.

El fundamento de esta estrategia es que, como señalamos anteriormente, la selección afecta a la variabilidad nucleotídica, *ergo*, si encontramos un gen con un patrón de diversidad nucleotídica incompatible con un modelo de deriva, es posible que esa región contenga genes sometidos a selección y, por tanto, genes con un interés económico potencial. Nótese que no se requieren medidas fenotípicas, es un enfoque indirecto en el cual se necesita sólo secuenciar para identificar SNPs y genotipar la población estudiada. El problema es que podemos detectar la presencia de la selección, pero no saber con certeza el carácter sometido a selección y que afecta al gen en cuestión.



Hay numerosísimos tests para identificar selección, y hay diversas revisiones al respecto, sobre todo aplicadas a la especie humana. Uno de los tests más populares es el estadístico D de Tajima:

$$D_T = (\pi - S/a_n)/\sigma_D,$$

donde π es el número promedio de diferencias nucleotídicas entre parejas de un conjunto de n secuencias, S es el número de polimorfismos, $a_n = \sum_i 1/i$ es una constante que depende sólo del número de secuencias, y σ_D es la desviación típica del estadístico. Bajo la hipótesis nula (apareamiento aleatorio, población constante, esto es, el modelo de Wright – Fisher) este estadístico se distribuye con media cero y varianza 1. Diversos programas, como DnaSP (www.ub.es/dnasp) permiten calcularlo fácilmente. El valor S depende sólo del número de sitios variables, mientras que π es función, además, de las frecuencias alélicas de estos polimorfismos (Figura 6). Un valor de D_T negativo indica un exceso de polimorfismos a baja frecuencia, mientras que un valor positivo está causado por un exceso de polimorfismos a frecuencias intermedias (Figura 6). Un fenómeno selectivo en el que un determinado alelo se ver favorecido produce un D_T negativo: los haplotipos que contienen el alelo favorecido aumentan de frecuencia, como éstos serán un subconjunto pequeño de todos los haplotipos y la recombinación no tendrá tiempo suficiente para erosionar el desequilibrio de ligamiento, se disminuirá la variabilidad y aumentará el número de *singletons* (mutaciones de copia única). Todo ello resulta en un D_T negativo. Por el contrario, un fenómeno de selección equilibradora (*balancing selection*) permite mantener durante largo tiempo varios haplotipos y aumentar el porcentaje de alelos a frecuencias intermedias. Por consiguiente, el D_T será positivo. Pero la interpretación de datos reales no es necesariamente tan sencilla porque los eventos demográficos también influyen sobre el test de Tajima. Un cuello de botella produce un D_T negativo mientras que la hibridación de poblaciones, un D_T positivo. La diferencia es que los factores demográficos afectan a todo el genoma, mientras que los selectivos sólo a los genes seleccionados. Por tanto, se deben comparar al menos dos regiones del genoma. Es deseable que una de ellas sea lo más neutra posible, por ejemplo que no contenga genes ni elementos con otra función estructural o reguladora.

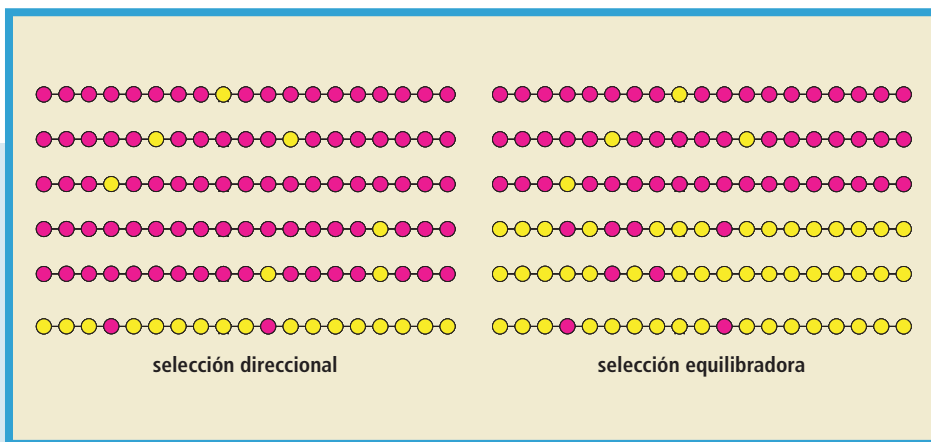


FIGURA 6.

Efecto de la selección sobre la variabilidad nucleotídica.

Cada bola representa un SNP (hay 19 SNPs en total) y cada color, un alelo distinto.

A la izquierda, patrón esperado bajo un barrido selectivo; a la derecha, situación con selección equilibradora. En el primer caso, la mayoría de haplotipos son muy parecidos entre sí y hay pocas diferencias en promedio (π bajo y $D_T = -0.80$, negativo). En el segundo, la selección promueve que haya diversos haplotipos segregando a frecuencias intermedias, por lo que el número de diferencias entre haplotipos es alto (π alto y $D_T = 1.77$, positivo). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la hibridación entre poblaciones produce un D_T positivo y que los cuellos de botella, negativo. Por todo ello, para interpretar correctamente estos estadísticos es necesario un buen muestreo y el conocimiento de la historia de las poblaciones.

Además, cuando un locus muestra una gran diferenciación entre poblaciones (medida por el valor de F_{st} por ejemplo) comparada con la que muestran otros loci cabe interpretarlo como evidencia de que ha habido selección para alguno de los alelos en alguna de las poblaciones. Por ello, comparando la distribución de F_{st} para diferentes loci con la esperada bajo neutralidad se pueden identificar loci *outliers* que pueden estar asociados a la divergencias fenotípicas entre poblaciones. Las poblaciones naturales de salmón (*Salmo salar*) se prestan a este tipo de estudios ya que las hay adaptadas a muy distintos ambientes. Este enfoque se ha utilizado para buscar genes candidatos responsables de estas adaptaciones (v. más abajo).



7. UTILIZACIÓN DE MARCADORES EN SELECCIÓN

La utilización de marcadores moleculares en los programas de selección, la llamada selección asistida con marcadores (MAS), es una de las aplicaciones de los marcadores que, desde el punto de vista industrial, puede ser más relevante. De forma similar a la identificación de QTLs, existen al menos dos formas de implementar MAS, la primera se aprovecha del desequilibrio de ligamiento poblacional entre los marcadores y el fenotipo, la segunda utiliza los marcadores para refinar el parentesco entre los individuos candidatos a la selección y así aumentar la precisión en la evaluación genética.

7.1. MAS en poblaciones en desequilibrio de ligamiento

Este enfoque fue primeramente descrito por LANDE y THOMPSON (1990). En este caso, se trata de cuantificar la varianza fenotípica explicada por una serie de marcadores (m) que se genotipan en la población, incluyendo los candidatos a ser reproductores. Supongamos que disponemos de la información fenotípica de una serie de individuos candidatos a la selección así como del genotipo para una serie de marcadores que se suponen próximos a los QTL. Si σ_m^2 es la parte de la varianza aditiva explicada por los marcadores, y definimos $q_m = \frac{\sigma_m^2}{\sigma_u^2}$, donde σ_u^2 es la varianza aditiva total, la estima conjunta del valor mejorante (\hat{u}) se puede hacer mediante un índice de selección:

$$\hat{u} = \frac{(1 - q_m)h^2}{1 - h^2q_m} y + \frac{1 - h^2}{1 - h^2q_m} \hat{u}_m,$$

donde h^2 es la heredabilidad del carácter y \hat{u}_m , la predicción del mérito genético con los marcadores obtenido mediante regresión múltiple. Aplicando la teoría clásica de la selección por índices, se puede predecir la respuesta a la selección combinando la información molecular y fenotípica:

$$R_{y+m} = ih^2\sigma_p \sqrt{\frac{q_m}{h^2} + \frac{(1 - q_m)^2}{1 - h^2q_m}},$$



donde σ_p es la desviación típica fenotípica. Puesto que la eficiencia de la selección fenotípica es, simplemente, $R_y = ih^2\sigma_p$, se puede calcular la eficiencia de la selección por un índice que combine la información fenotípica y molecular respecto a la selección puramente fenotípica será para distintos valores de h^2 y q_m (Tabla 2). Aunque los datos de la tabla parecen muy prometedores, diversos estudios de simulación indican que las previsiones teóricas son demasiado optimistas. En la práctica, parece difícil encontrar situaciones en las que la ventaja pueda ser superior a un 10-20%.

Más específicamente lo que las simulaciones han puesto de manifiesto puede resumirse de la siguiente forma: a) la eficiencia depende del desequilibrio de ligamiento, de forma que disminuye al considerar generaciones sucesivas; b) la eficiencia relativa de la MAS aumenta con el tamaño de la población; c) aumenta conforme disminuye la heredabilidad, de forma que no parece que tenga interés si la heredabilidad es mayor de 0.50. Sin embargo, si la heredabilidad es muy baja, será más difícil estimar el efecto de los marcadores y aumentará la variabilidad de la respuesta. Probablemente valores de heredabilidad en torno a 0.20 serían los más adecuados; d) la inclusión de demasiados marcadores puede disminuir la respuesta a la selección por un efecto llamado de sobreajuste, ya que se produce una confusión entre las estimas de los efectos de los marcadores; e) el conjunto de marcadores más eficiente tiene que ser reevaluado en cada generación; f) una vez elegidos marcadores igualmente espaciados, la información adicional proporcionada por la posición exacta de los marcadores en el mapa no es importante; g) la selección no pierde eficiencia por el hecho de que exista dominancia en los marcadores (aunque obviamente sólo se aprovecha el valor aditivo aparente); h) En el contexto de MAS, los marcadores más útiles no son necesariamente los más ligados a los QTLs.

7.2. MAS en poblaciones panmícticas

Un problema con el enfoque de MAS que acabamos de describir es que el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores y los QTL disminuye en generaciones sucesivas. Por tanto, es deseable encontrar estrategias que nos permitan explotar la información molecular en



poblaciones *outbred* o panmícticas, en las cuales el desequilibrio de ligamiento puede ser negligible. (FERNANDO y GROSSMAN 1989) estudiaron por primera vez este enfoque.

A estos efectos, es conveniente repasar cuál es la estrategia tradicional para la mejora genética. En la mejora clásica, el modelo utilizado para predecir el mérito genético es:

$$y_i = \mu_i + u_i + e_i$$

donde u_i es el mérito genético obtenido sin marcadores, también llamado infinitesimal. La información de la que disponemos para estimar estos valores genéticos son los fenotipos y el pedigrí. El conocimiento del pedigrí es fundamental y requisito *sine qua non* para poder establecer un programa de selección. En las especies domésticas tradicionales criadas de forma intensiva, obtener el pedigrí es en general sencillo, no así en peces, donde hay que recurrir a un manejo más costoso o a la utilización de marcadores para realizar análisis de paternidades. La teoría de la mejora clásica nos dice que la distribución de los méritos genéticos es normal multivariada:

$$\mathbf{u} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{A} \sigma_u^2),$$

donde \mathbf{A} es la matriz de relaciones genéticas aditivas entre todos los individuos del pedigrí y σ_u^2 es la varianza aditiva total o infinitesimal. La matriz $\mathbf{A} = \{a_{ij}\}$ es muy importante en la mejora de cualquier especie: contiene los porcentajes (a_{ij}) del genoma compartido esperado entre dos individuos cualesquiera. Por ejemplo, es 1 entre un individuo consigo mismo, 0.5 entre hermanos completos, o 0.25 entre medios hermanos. (Estos números son simplificados, se aplican sólo si no hay consanguinidad). La heredabilidad de un carácter se define como $h^2 = \sigma_u^2 / (\sigma_u^2 + \sigma_e^2)$, donde σ_e^2 es la varianza de los residuos o varianza ambiental. Si no se conoce la heredabilidad, ésta se puede estimar a partir de los datos y del pedigrí mediante programas especializados. El mérito genético predicho $\hat{\mathbf{u}}$ es, para cada individuo, una función de los fenotipos de los parientes ponderado por el parecido esperado (los a_{ij}) y la heredabilidad.

En este tipo de poblaciones, la utilidad de los marcadores radica en el cálculo de la matriz \mathbf{A} . En ausencia de información molecular, podemos predecir que dos hermanos comparten la mitad del genoma.



Sin embargo, para una determinada posición, dos hermanos pueden compartir ambos alelos o ninguno y, por consiguiente, su coeficiente de parentesco puede variar entre 0 y 1. Si tenemos un padre heterocigoto para un marcador, los hijos que hayan recibido el mismo alelo del marcador tendrán un mayor coeficiente de parentesco alrededor de ese marcador que los hermanos que hayan recibido distintos alelos. Este principio tan sencillo es en el que se basa esta implementación de la selección asistida por marcadores. Consiste en calcular tantas matrices \mathbf{A}_q como posiciones del genoma estemos interesados; en principio, calcularíamos las matrices \mathbf{A}_q en las regiones en las que se han identificado QTL. Como resultado, en vez de una sola heredabilidad, tendríamos una heredabilidad estimada para cada una de las regiones. Estas heredabilidades locales miden la importancia de una región del genoma en la determinación del carácter de interés. A continuación, estimaríamos el mérito genético para cada individuo y para cada región, pudiendo también obtener una estima del mérito genético global. Este enfoque, hoy por hoy, presenta algunas dificultades que son básicamente de tipo algorítmico, y es que es muy difícil calcular los coeficientes de parentesco a_{ij} cuando hay una gran cantidad de marcadores faltantes. También existe un límite al número de individuos que se puede incluir en el pedigrí por limitaciones computacionales, unos pocos miles sería hoy el máximo. Una posibilidad es calcular una matriz global \mathbf{A} que corresponda a todo el genoma pero calculada con la información molecular. La ventaja es que la estima del mérito genético sería más sencilla; la desventaja, menos precisión.

Una simplificación posible es utilizar el desequilibrio dentro de familias, ya que éste siempre existe (OLLIVIER 1998). En este caso, la selección es menos efectiva que cuando hay desequilibrio poblacional porque básicamente se trata de practicar selección intrafamiliar. La precisión de la selección en la que la información molecular se combina con la información fenotípica se puede comparar con la selección clásica que sólo incluye información fenotípica para distintos valores de h^2 , q_m y *tamaño familiar* (Tabla 3). En esta situación, la respuesta a la selección asistida con marcadores es, como era de esperar, siempre superior a la selección fenotípica pero se requiere de tamaños familiares grandes y que una parte importante de la varianza genética esté controlada



por los marcadores (q_m elevado). En cualquier caso, la ventaja nunca excede del 30% (cuando $q_m = 0.5$, $h^2 = 0, 1$, $n = 1$ y $m = \infty$). Los resultados de simulación también indican que en esta situación los valores teóricos son demasiado optimistas y que difícilmente lleguen al 10% en la práctica,

TABLA 3.

Ventaja relativa esperada de la respuesta a la selección combinada asistida con marcadores respecto a la selección combinada en una población panmíctica como función de la heredabilidad del carácter (h^2), la fracción de varianza genética explicada por los marcadores (q_m), el número de familias (m) y su tamaño (n) (OLLIVIER 1998).

h^2	q_m	$M = 8$			$m = \text{grande}$	
		$n = 1$	$n = 8$	$n = \text{grande}$	$n = 1$	$n = \text{grande}$
0,10	0,50	1,8	1,10	1,21	1,28	1,21
0,50	0,50	1,09	1,05	1,09	1,19	1,13

7.3. MAS en la práctica

Aunque la teoría de la respuesta a la selección con MAS y sus posibles ventajas teóricas están bien establecidas, su aplicación práctica sigue siendo objeto de numerosos debates en la literatura científica desde hace varios años, y no tenemos una respuesta sencilla ya que sólo cabe discutirlo en el contexto de un programa de selección que esté ya siendo implementado. Como indica la propia expresión ‘asistida’, quiere decirse que sólo tiene sentido implementarla si existe ya un esquema de selección al que ‘asistir’. La gran mayoría de estudios de simulación muestran que la ganancia puede ser del 5-50%. Sin embargo, hasta el momento hay pocos ejemplos donde se esté aplicando MAS en esquemas reales de mejora. La principal limitación sigue siendo el coste asociado a estas tecnologías. Otra desventaja es que, hasta el momento, no se conocen demasiadas mutaciones causales en las especies ganaderas y de plantas. Además, algunas de estas mutaciones pueden tener efectos deseables e indeseables al mismo tiempo, por lo que es recomendable realizar un estudio económico previo de las consecuencias de seleccionar por uno u otro criterio.



8. RESULTADOS EXPERIMENTALES EN PECES

8.1. Detección de QTLs

En la Tabla 4 se señalan buena parte de los experimentos de detección de QTLs en peces, crustáceos y moluscos publicados hasta la fecha. Los primeros resultados se obtuvieron en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) que sigue siendo la especie donde se han obtenido la mayoría de los resultados. En prácticamente todos ellos se ha utilizado un diseño de cruzamientos y casi siempre los cruzamientos han sido entre líneas divergentes: para tasa de desarrollo, resistencia a enfermedades, tiempo de la freza o tolerancia a la temperatura. En algunos casos se trataba de líneas clonales (y por tanto análogas a las líneas consanguíneas ampliamente utilizadas en ratones) produciéndose a partir del híbrido F1 descendencia doble haploide. En un estudio reciente, por ejemplo, se genotiparon para 330 marcadores AFLP y 39 microsatélites 54 individuos doble haploides obtenidos a partir de un híbrido de dos líneas clonales divergentes para el número de caecas pilóricas (ZIMMERMAN *et al.* 2005). Se identificaron tres regiones cromosómicas (en los grupos de ligamiento 3, 8 y 23) para el número de caecas pilóricas (asociadas al crecimiento e índice de conversión) y que explicaban el 19.2, 18.6 y 13.5% de la varianza fenotípica de la progenie doble haploide (Figura 7).

En salmón atlántico (*Salmo salar*) se han utilizado familias de poblaciones comerciales para detectar QTLs para resistencia a ISA (anemia infecciosa), peso corporal y porcentaje de lípidos. También en lubina asiática (*Lates calcarifer*) se ha utilizado una única familia de 380 hermanos de una población comercial para realizar un barrido genómico con 97 microsatélites. Se detectaron 5 QTLs significativos para peso y longitud corporal. En la Figura 8 se muestra el perfil de LOD score correspondiente al mapeo de QTLs en el grupo de ligamiento 2 para el peso y la longitud total (WANG *et al.* 2006).

El enfoque del gen candidato ha sido menos utilizado en especies acuícolas. Una excepción es estudio de asociación entre SNPs para cinco genes candidatos relacionados con la hormona del crecimiento en el salvelino (*Salvelinus alpinus*) en el que se encontró asociación

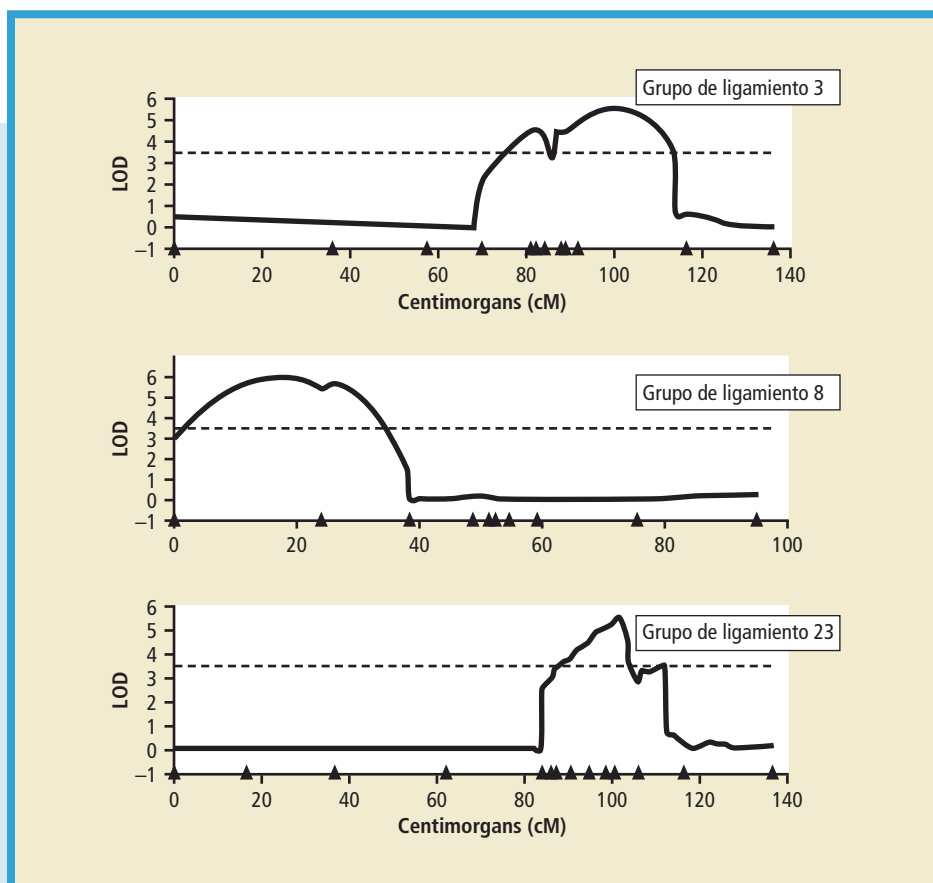


FIGURA 7.

Representación del LOD calculado cada 2 cM en tres grupos de ligamiento.

La línea de puntos indica el valor umbral para una significación de $P < 0.05$ (tomado de Zimmerman et al. 2005, con modificaciones).

entre el crecimiento temprano y un SNP particular del locus GHRH / PACAP2 (TAO y BOULDING 2003). Por último, en salmón atlántico se ha investigado la posible huella de la selección a partir de 95 microsatélites en ocho poblaciones naturales de diferentes hábitats (agua dulce y salada por ejemplo). Se detectaron nueve microsatélites que mostraban desviaciones significativas respecto a lo esperado bajo neutralidad y que, por tanto, marcan regiones candidatas a incluir genes respon-

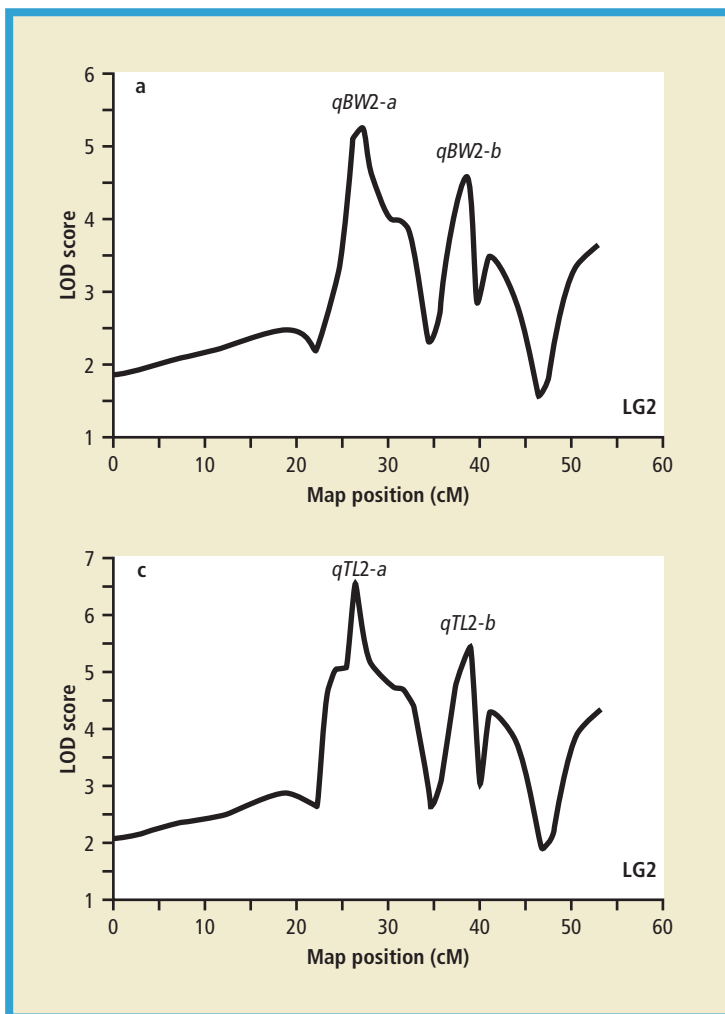


FIGURA 8. Representación del LOD calculado para el grupo de ligamiento dos (tomado de Wang *et al.* 2006).

sables de la adaptación de estas poblaciones a los distintos ambientes (VASEMAGI *et al.* 2005).

8.2. Selección asistida con marcadores

Hasta donde llega nuestro conocimiento, no existe ningún programa de MAS en acuicultura. En principio, los caracteres de calidad de la carne y resistencia a enfermedades serían idóneos para plantearse



TABLA 4.
Detección de QTLs en acuicultura.

Especie	Carácter	Diseño	Referencia
Carpa	Tolerancia temperatura	F2	SUN y LIANG (2004)
Trucha arcoiris	Tolerancia temperatura	Retrocruz.	DANZMANN (1999); JACKSON (1998); PERRY <i>et al.</i> (2001); PERRY <i>et al.</i> (2005)
	Longitud corporal	Retrocruz.s	Perry <i>et al.</i> (2005)
	Tiempo freza	Retrocruz.	O'MALLEY <i>et al.</i> (2003); SAKAMOTO <i>et al.</i> (1999)
	Tiempo freza	Retrocruz.	LEDER <i>et al.</i> (2006)
	Peso corporal	Retrocruz	O'MALLEY <i>et al.</i> (2003)
	Resistencia a CS	Doble Hap.	NICHOLS <i>et al.</i> (2003)
	Resistencia a IPN	Retrocruz	OZAKI <i>et al.</i> (2001)
	Resistencia a IHN	Retrocruz	KHOO <i>et al.</i> (2004)
	Natural killer cell	Doble-hap..	ZIMMERMAN <i>et al.</i> (2004)
	Caeca pilóricas	Doble-hap..	ZIMMERMAN <i>et al.</i> (2005)
	Desarrollo embrionario	Doble-hap..	MARTINEZ <i>et al.</i> (2005); ROBINSON (2001)
	Caracteres merísticos	Doble-hap..	NICHOLS <i>et al.</i> (2004)
Salmón atlántico	Resistencia a ISA	Familias	MOEN <i>et al.</i> (2004a)
	Peso corporal	Familias	REID <i>et al.</i> (2005)
	% grasa corporal	Familias	DERAYAT <i>et al.</i> (2006)
	Resistencia a GS	Retrocruz.	GILBEY <i>et al.</i> (2006)
Salvelino	Tolerancia temperatura	Retrocruz	SOMORJAI <i>et al.</i> (2003)
	Crecimiento	Retrocruz	TAO y BOULDING (2003)
Platija japonesa	Resistencia a LD	Retrocruz.	FUJI <i>et al.</i> (2006)
Tilapia	Tolerancia frío	F2	CNAANI <i>et al.</i> (2003)
	Tamaño corporal	F2	CNAANI <i>et al.</i> (2003); CNAANI <i>et al.</i> (2004)
	Inmunidad innata	F2	CNAANI <i>et al.</i> (2004)
	Respuesta al stress	F2	CNAANI <i>et al.</i> (2004)
	Tolerancia frío	Cruzamiento	MOEN <i>et al.</i> (2004b)
	Determinación sexo	F2	SHIRAK <i>et al.</i> (2006)

(Continúa)



(Continuación)

Especie	Carácter	Diseño	Referencia
Lubina asiática	Peso y longitud corporal	Familias	WANG <i>et al.</i> (2006)
Lubina europea	Longitud y anchura cuerpo	Familias	CHATZIPLIS <i>et al.</i> (2006)
Ostra	Resistencia a Dermo	Cruzamiento	Yu y Guo (2006)
Langostino japonés	Peso y longitud corporal	F2	CASTRO <i>et al.</i> (2006)

IHN = Necrosis hematopoiética infecciosa; CS = Ceratomyxa shasta; IPNV = virus de la necrosis pancreática infecciosa; ISA = anemia infecciosa del salmón; LD = linfocistis; GD = Gyrodactilus salaris.

MAS, especialmente implementando selección para estos caracteres a una edad temprana. De todas formas, como señalamos anteriormente, MAS requiere una adecuada planificación dentro del contexto de un programa de mejora que esté ya implementado, así como una evaluación cuidadosa de los costes y los beneficios.

9. SOFTWARE DISPONIBLE

No hay programas generales que permitan abordar todas las situaciones descritas en este trabajo; en acuicultura, los más utilizados hasta el momento son Mapmaker, Joinmap, QTL express y QTL cartographer. Ni siquiera para el caso de análisis de QTL, el área más desarrollada, encontramos que un mismo programa pueda lidiar con toda la problemática. El usuario deberá elegir dependiendo del diseño y objetivo de la investigación. La Tabla 5 es un resumen de las principales características de algunos paquetes gratuitos. Que sepamos, no hay ningún software pensado para diseños específicos de peces, pero las herramientas disponibles deberían ser suficientes.

El programa QTL express (<http://qtl.cap.ed.ac.uk/>) es probablemente la mejor opción para iniciarse en esta área. El enfoque utilizado es el de regresión y admite varios diseños (F2, BC y familias de hermanos), pero no poblaciones más complejas. Sólo funciona vía web. El programa webQTL (<http://www.genenetwork.org/>) implementa algunos de los enfoques de genética genómica discutidos más arriba y también funciona sólo vía web. Tanto R.qtl (<http://www.rqtl.org/>) como win car-



TABLA 5.
Software seleccionado.

Programa	Calidad de la documentación	Instalación	Facilidad de uso	Flexibilidad modelización	Plataforma	Calidad output	Método estadíst.	Diseño experimental	Limitaciones	Ventajas
QTL express	+	++	++	+	Web	+	LS	F2, BC, Outbred (sib pair, familias)	Web based Poco flexible diseño exp	Útil para empezar
WinQTL cartographer	++	++	+	+	Windows	++	ML	F2, BC	Sin covariadas	Multicarácter Simula cruces
Qxpak	+	++	+	++	Linux	+	ML	Cruces, Outbred	Output simple	Multicácter Modelización flexible
R.qtl	+	+	-	+	R	++	LS/ML	Cruces	R requerido	Buen output
Merlin	++	++	+	-	Linux/Unix	+	NP/LS/ML	Outbred	Genética humana, Simple output	Opciones como detección errores genotipos
TreeLD	++	++	+	-	Windows/Linux	+	ML	Outbred	Modelización limitada, cars binarios	Cartografía fina



tographer (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/>) son buenas opciones si se dispone de cruces entre líneas consanguíneas o muy divergentes. R.qtl está implementado como paquete en R, por lo que es recomendable conocer este lenguaje. Qxpak (<http://www.icrea.es/pag.asp?id=Miguel.Perez>) es un programa pensado para un máximo de flexibilidad en la modelización, permite modelos multicarácter y multi QTL en diseños complejos. No es una opción recomendable si hay muchos marcadores faltantes. En este caso, Merlin (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/Merlin/>) es la opción preferible, pero sólo trata con poblaciones no cruzadas. Solar es un paquete ampliamente utilizado en genética humana y tampoco admite poblaciones cruzadas. También es muy flexible desde el punto de vista de la modelización. Finalmente, TreeLD (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/treeld.html>) implementa las más modernas técnicas de coalescencia y un enfoque bayesiano para la localización fina de mutaciones causales. Es muy costoso computacionalmente y sólo admite caracteres binarios. Uno de los pocos programas disponibles para calcular la matriz de parentesco condicional en la información de marcadores es Loki (<http://loki.homeunix.net/>).

Para el análisis de variabilidad a nivel de ADN, los dos paquetes más populares son DnaSP (<http://loki.homeunix.net/>) y Arlequin (<http://lgb.unige.ch/arlequin/>). Para una revisión de este software v. EXCOFFIER y HECKEL (2006).

10. CONCLUSIÓN

Las herramientas disponibles hoy en día para la localización de mutaciones causales y la selección asistida por marcadores son extremadamente poderosas. Las técnicas de secuenciación masivas (secuenciación 454 y similares) no hacen imposible pensar que en un futuro podamos disponer de la secuencia cuasi completa de muchos individuos de una misma especie. Sin embargo, los retos estadísticos, bioinformáticos y genéticos son grandes y no deberíamos minimizarlos. En el caso concreto de la acuicultura, pensamos que las limitaciones residen más en la disponibilidad de poblaciones adecuadas, tales como poblaciones muy divergentes, y en el fenotipado de los animales que en las herramientas genéticas disponibles.



Con respecto a la utilización práctica de la información molecular, es importante resaltar que sólo será rentable si se inscribe en el marco de un programa de mejora genética clásico. La ausencia o el bajo desarrollo de tales programas de mejora genética en acuicultura es, sin ninguna duda, la limitante principal a la hora de beneficiarse industrialmente de los avances en la genética molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- ARDLIE, K. G., L. KRUGLYAK y M. SEIELSTAD, 2002 Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 299-309.
- CASTRO, T. B., G. GAJARDO, J. M. CASTRO y G. M. CASTRO, 2006 A biometric and ecologic comparison between *Artemia* from Mexico and Chile. *Saline Systems* **2**: 13.
- CHATZIPLIS, D., C. BATARGIAS, C. TSIGENOPOULOS, A. MAGOULAS, S. KOLLIAS *et al.*, 2006 Mapping Quantitative Trait Loci in European Sea Bass: The BASSMAP pilot study pp. in *International Symposium on Genetics in Aquaculture IX*, Montpellier, France.
- CNAANI, A., E. M. HALLERMAN, M. RON, J. I. WELLER, M. INDELMAN *et al.*, 2003 Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F-2 tilapia hybrid. *Aquaculture* **223**: 117-128.
- CNAANI, A., N. ZILBERMAN, S. TINMAN, G. HULATA y M. RON, 2004 Genome-scan analysis for quantitative trait loci in an F-2 tilapia hybrid. *Mol. Genet. Genomics* **272**: 162-172.
- DANZMANN, R. G., JACKSON, T.R. y M.M. FERGUSON, 1999 Epistasis in allelic expression at upper temperature tolerance QTL in rainbow trout. *Aquaculture* **173**: 45-58.
- DERAYAT, A., R. D. HOUSTON, D. R. GUY, A. HAMILTON, J. RALPH *et al.*, 2006 Mapping a QTL affecting body lipid percentage in Atlantic salmon (*Salmo salar*) pp. in *International Symposium on Genetics in Aquaculture IX*, Montpellier, France.
- EXCOFFIER, L., y G. HECKEL, 2006 Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat. Rev. Genet.* **7**: 745-758.
- FERNANDO, R. L., y M. GROSSMAN, 1989 Marker-assisted selection using best linear applied prediction. *Genet. Sel. Evol.* **21**: 467-477.
- FUJI, K., K. KOBAYASHI, O. HASEGAWA, M. R. M. COIMBRA, T. SAKAMOTO *et al.*, 2006 Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* **254**: 203-210.



- GILBEY, J., E. VERSPOOR, T. A. MO, E. STERUD, K. OLSTAD *et al.*, 2006 Identification of genetic markers associated with *Gyrodactylus salaris* resistance in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Organ.* **71**: 119-129.
- JACKSON, T. R., FERGUSON, M.M., DANZMANN, R.G., FISHBACK, A.G., IHSEN, P.E., O'CONNELL, M. y T. J. CREASE, 1998 Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. *Heredity* **80**: 143-151.
- JANSEN, R. C., y J. NAP, 2001 Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends Genet* **17**: 388-391.
- KHOO, S. K., A. OZAKI, F. NAKAMURA, T. ARAKAWA, S. ISHIMOTO *et al.*, 2004 Identification of a novel chromosomal region associated with infectious hematopoietic necrosis (IHN) resistance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.* **39**: 95-101.
- LANDE, R., y R. THOMPSON, 1990 Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* **124**: 743-756.
- LEDER, E. H., R. G. DANZMANN y M. M. FERGUSON, 2006 The candidate gene, Clock, localizes to a strong spawning time quantitative trait locus region in rainbow trout. *J. Hered.* **97**: 74-80.
- LYNCH, M., y B. WALSH, 1998 *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer.
- MARTINEZ, V., W. G. HILL y S. A. KNOTT, 2002 On the use of double haploids for detecting QTL in outbred populations. *Heredity* **88**: 423-431.
- MARTINEZ, V., G. THORGAARD, B. ROBISON y M. J. SILLANPAA, 2005 An application of Bayesian QTL mapping to early development in double haploid lines of rainbow trout including environmental effects. *Genet. Res.* **86**: 209-221.
- MOEN, T., J. J. AGRETI, A. CNAANI, H. MOSES, T. R. FAMULA *et al.*, 2004a 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.* **35**: 893-904.
- MOEN, T., K. T. FJALESTAD, H. MUNCK y L. GOMEZ-RAYA, 2004b A multistage testing strategy for detection of quantitative trait loci affecting disease resistance in Atlantic salmon. *Genetics* **167**: 851-858.
- NICHOLS, K. M., J. BARTHOLOMEW y G. H. THORGAARD, 2003 Mapping multiple genetic loci associated with *Ceratomyxa shasta* resistance in *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.* **56**: 145-154.
- NICHOLS, K. M., P. A. WHEELER y G. H. THORGAARD, 2004 Quantitative trait loci analyses for meristic traits in *Oncorhynchus mykiss*. *Environ. Biol. Fish.* **69**: 317-331.
- O'MALLEY, K. G., T. SAKAMOTO, R. G. DANZMANN y M. M. FERGUSON, 2003 Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: Testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes. *J. Hered.* **94**: 273-284.



- OLLIVIER, L., 1998 The accuracy of marker-assisted selection for quantitative traits within populations in linkage equilibrium. *Genetics* **148**: 1367-1372.
- PERRY, G. M. L., R. G. DANZMANN, M. M. FERGUSON y J. P. GIBSON, 2001 Quantitative trait loci for upper thermal tolerance in outbred strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity* **86**: 333-341.
- PERRY, G. M. L., M. M. FERGUSON, T. SAKAMOTO y R. G. DANZMANN, 2005 Sex-linked quantitative trait loci for thermotolerance and length in the rainbow trout. *J. Hered.* **96**: 97-107.
- REID, D. P., A. SZANTO, B. GLEBE, R. G. DANZMANN y M. M. FERGUSON, 2005 QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Heredity* **94**: 166-172.
- ROBINSON, B. D., P. A. WHEELER, K. SUNDIN, P. SIKKA y G. H. THORGAASRD, 2001 Composite interval mapping reveals a major locus influencing embryonic development rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Hered.* **92**: 16-22.
- SABETI, P. C., D. E. REICH, J. M. HIGGINS, H. Z. LEVINE, D. J. RICHTER *et al.*, 2002 Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* **419**: 832-837.
- SAKAMOTO, T., R. G. DANZMANN, N. OKAMOTO, M. M. FERGUSON y P. E. IHSEN, 1999 Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **173**: 33-43.
- SHIRAK, A., E. SEROUSSI, A. CNAANI, A. E. HOWE, R. DOMOKHOVSKY *et al.*, 2006 Amh and Dmrt2 genes map to tilapia (*Oreochromis* spp.) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination. *Genetics* **174**: 1573-1581.
- SOMORJAI, I. M. L., R. G. DANZMANN y M. M. FERGUSON, 2003 Distribution of temperature tolerance quantitative trait loci in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and inferred homologies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genetics* **165**: 1443-1456.
- SUN, X. W., y L. Q. LIANG, 2004 A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) And mapping of a locus associated with cold tolerance. *Aquaculture* **238**: 165-172.
- TAO, W. J., y E. G. BOULDING, 2003 Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Heredity* **91**: 60-69.
- VASEMAGI, A., J. NILSSON y C. R. PRIMMER, 2005 Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Mol. Biol. Evol.* **22**: 1067-1076.
- VOIGHT, B. F., S. KUDRAVALI, X. WEN y J. K. PRITCHARD, 2006 A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biol* **4**: e72.



- WANG, C. M., L. C. LO, Z. Y. ZHU y G. H. YUE, 2006 A genome scan for quantitative trait loci affecting growth-related traits in an F1 family of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Bmc Genomics* **7**.
- YU, Z. N., y X. M. GUO, 2006 Identification and mapping of disease-resistance QTLs in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture* **254**: 160-170.
- ZIMMERMAN, A. M., J. P. EVENHUIS, G. H. THORGAARD y S. S. RISTOW, 2004 A single major chromosomal region controls natural killer cell-like activity in rainbow trout. *Immunogenetics* **55**: 825-835.
- ZIMMERMAN, A. M., P. A. WHEELER, S. S. RISTOW y G. H. THORGAARD, 2005 Composite interval mapping reveals three QTL associated with pyloric caeca number in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **247**: 85-95.

10

INDUCCIÓN DE LA TRIPLOIDÍA Y LA GINOGENÉISIS PARA LA OBTENCIÓN DE PECES ESTÉRILES Y POBLACIONES MONOSEXO EN ACUICULTURA

INDUCCIÓN DE LA TRIPLOIDÍA Y LA GINOGENÉISIS PARA LA OBTENCIÓN DE PECES ESTÉRILES Y POBLACIONES MONOSEXO EN ACUICULTURA

F. Piferrer

Instituto de Ciencias del Mar

A. Felip

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal

R. M.^a Cal

Centro Oceanográfico de Vigo

Resumen

Durante la fase de engorde del ciclo de producción, los peces presentan dos importantes problemas derivados de su reproducción que afectan negativamente al rendimiento de los cultivos. El primero viene dado por el hecho de que un sexo, normalmente las hembras, crece más que el otro, lo que se traduce en una excesiva dispersión de tallas en los tanques de cultivo, con la consiguiente necesidad de realizar desdoblamientos, y un menor aprovechamiento de las instalaciones. El otro problema consiste en la aparición de la maduración sexual, que va acompañada de una disminución importante del crecimiento, mayor susceptibilidad a enfermedades y cambios en las propiedades



organolépticas de las partes comestibles. Esta revisión trata de las técnicas de manipulación de juegos enteros de cromosomas empleadas en acuicultura para la producción de peces triploides, que no maduran porque son estériles, y ginogenéticos, que contienen sólo hembras en especies en las que el sexo homogamético es el femenino. Con ello, se evita la maduración sexual y se favorece el sexo de mayor crecimiento, respectivamente. Se presentan protocolos de inducción a la triploidía y a la ginogénesis para especies importantes para la acuicultura tanto en la Europa meridional como en Sudamérica, incluyendo a especies de salmónidos, perciformes y pleuronectiformes. Para cada una de las especies más importantes dentro de cada grupo se explica cuál es el estado actual del desarrollo de estas técnicas así como las perspectivas de su aplicación.

Abstract

During the grow-out phase of the production cycle many cultured fish exhibit problems associated with reproduction that negatively affect the profits of commercial farming operations. The first one is the presence of different growth rates between sexes, usually higher in females, which results in excessive size dispersion, with the consequent need for size-gradings, and a sub-optimal use of the production facilities. The other problem is the appearance of sexual maturation, which results in an important reduction of growth, increased susceptibility to diseases and changes in the organoleptic properties of the edible parts. This review deals with chromosome set manipulation techniques used in aquaculture for the production of triploid fish, which are sterile, and gynogenetic fish, which are only females in species with female homogamety, in order to prevent sexual maturation and to favor the sex with higher growth rates, respectively. Protocols for the induction of triploidy and gynogenesis are presented for several species important for both southern European and South American aquaculture. These include species of salmonids, perch-like fishes and flatfishes. For each one of the most important species within each group, the current state-of-the-art as well as future prospects is presented.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemas asociados con la reproducción durante la fase de engorde

En la piscicultura moderna, los mayores costes de producción se dan durante la fase de engorde, tanto por la duración relativa de ésta dentro del total del ciclo de producción, como por los elevados costes en mano de obra y alimento (RIZZO y SPAGNOLO 1996; GASCA-LEYVA *et al.* 2002). Es precisamente durante esta fase cuando se manifiestan un par de problemas asociados con el sexo de los peces que inciden negativamente en los rendimientos de los cultivos. Estos problemas son el crecimiento diferencial de un sexo respecto al otro y la aparición de la primera maduración sexual (ZANUY *et al.* 2001).

Los peces presentan diversas estrategias reproductivas que hacen que las posibilidades de reproducción varíen en función del tamaño y del sexo, lo que se traduce en la existencia de un dimorfismo sexual en cuanto al crecimiento (PARKER 1992; BRANTLEY *et al.* 1993). Este mayor crecimiento puede darse en cualquier sexo, pero salvo algunas notables excepciones, como las tilapias –peces de origen africano actualmente cultivados en muchas partes del mundo, donde los machos crecen más que las hembras–, lo cierto es que, en la mayoría de las especies cultivadas en nuestras aguas, las hembras son las que presentan unas mayores tasas de crecimiento, llegando a alcanzar un tamaño hasta un 50% mayor que el de los machos a la misma edad (IMSLAND *et al.* 1997). La presencia de un crecimiento ligado al sexo resulta en una excesiva dispersión de tallas durante la fase de engorde, con la aparición de peces de un crecimiento significativamente mayor o menor respecto a la media (llamados, respectivamente, «cabezas» y «colas» en el argot de producción). Para evitar episodios de canibalismo, jerarquías asociadas a la talla que afectan a las interacciones sociales y favorecer un mejor aprovechamiento del alimento, ello implica la necesidad de realizar clasificaciones (desdoblamientos), separando en dos tanques los peces que antes ocupaban uno (DOU *et al.* 2004). Esto representa un mayor manejo de los animales y una mayor necesidad de mano de obra, además de un mayor número de unidades de producción para acomodar a los grupos con distinto crecimiento. Ade-



más, asumiendo una proporción de sexos (machos:hembras) de 1:1, el empleo de unidades de producción con aproximadamente la mitad de los animales de un sexo creciendo significativamente más que la otra mitad significa que se están usando las instalaciones de forma subóptima. Por este motivo es deseable la producción de lotes formados por hembras que, como se ha mencionado, son el sexo que crecen más en la práctica totalidad de las especies cultivadas en nuestras aguas.

Por otro lado, los rápidos crecimientos alcanzados durante la fase de engorde hacen que los peces tarden menos tiempo que sus conspecíficos salvajes en alcanzar la talla de primera madurez sexual, es decir, a alcanzar la pubertad y producir por primera vez en su vida gametos -huevos o esperma, según sean hembras o machos- para acometer la reproducción (THORPE 2004). Esta primera madurez se alcanza muchas veces en plena fase de engorde, antes de que los animales lleguen a su talla comercial. El problema desde un punto de vista de la producción acuícola es que la aparición de la maduración trae frecuentemente consigo una drástica reducción del crecimiento, al destinar los animales buena parte de la energía obtenida a través de la alimentación a la maduración de las gónadas y a la formación de gametos (THORPE 2004). Además, durante la maduración sexual, muchas especies de peces se vuelven más susceptibles a contraer enfermedades (SCHRECK *et al.* 2001). En algunas especies, además, la maduración sexual implica también un cambio importante en las propiedades organolépticas de las partes comestibles por la alteración de las reservas de grasa y perfiles lipídicos de las mismas como consecuencia del proceso reproductor (JOHNSTON *et al.* 2000). En los animales en fase de maduración sexual, su menor crecimiento, mayor susceptibilidad a enfermedades y caída del valor de sus partes comestibles, tiene unas consecuencias muy negativas desde el punto de vista de la producción (FELIP *et al.* 2006). En la lubina, por ejemplo, la maduración sexual durante el otoño anterior al segundo invierno de vida del animal implica que los animales no llegan a alcanzar la talla comercial a pesar de que son alimentados durante los meses siguientes, sin que ello llegue a traducirse en un crecimiento apreciable. Esto supone una pérdida de dinero importante en forma de pienso (ZANUY *et al.* 2001). Por otro lado, el rodaballo presenta un aumento de la mortalidad al final de la maduración (CAL *et al.* 2006a)



que, aunque aún no bien estudiado, probablemente sea debido a la depresión del sistema inmune durante dicho proceso. Finalmente, los salmónidos experimentan, además, un cambio apreciable en la calidad de sus partes comestibles como consecuencia de la maduración sexual (JOHNSTON *et al.* 2000).

1.2. Control genético de la proporción de sexos y de la maduración sexual

El control de la proporción de sexos en acuicultura puede conseguirse mediante la aplicación de varias técnicas. La más común y utilizada globalmente es el control endocrino o hormonal del sexo (PIFERRER 2001, 2007) o mediante la inducción a la ginogénesis (este capítulo). Asimismo, el control de la maduración sexual puede ejercerse mediante la manipulación de las condiciones ambientales (CARRILLO *et al.* 2007) o bien mediante la inducción de la triploidía (este capítulo). El control de la proporción de sexos y/o de la maduración sexual y la opción de una u otra técnica, dependerá de la relación coste/beneficio en un programa de producción concreto.

Las técnicas de inducción de la triploidía y de la ginogénesis forman parte de lo que en conjunto se llama control genético del sexo en acuicultura y tienen en común que se basan en la manipulación de juegos enteros de cromosomas (THORGAARD 1983). Esta metodología consiste en determinar cuántos juegos de cromosomas y de qué origen (materno, paterno o de ambos progenitores) van a estar presentes en los cigotos que darán los peces deseados. La bibliografía sobre la inducción, verificación y efectos de la triploidía y ginogénesis en peces y su aplicación a la acuicultura es muy extensa. Aquí se muestra sólo una pequeña fracción, haciendo énfasis fundamentalmente en algunas de las especies más interesantes. Asimismo, se ha intentado en lo posible utilizar sólo referencias de revistas internacionales para facilitar la localización de los trabajos originales a los lectores interesados. Revisiones sobre distintos aspectos de la inducción de la triploidía y ginogénesis y sus aplicaciones en acuicultura incluyen las de PURDOM (1983), THORGAARD (1983; 1986), CHOURROUT (1988), DUNHAM (1990), IHSSEN *et al.* (1990), THORGAARD *et al.* (1992), PANDIAN y KOTEESVARAN (1998), BENFEY (1999), ARAI (2001), FELIP *et al.* (2001a), HULATA (2001), TIWARY *et*



al. (2004) y PIFERRER *et al.* (2007). Al final se da un glosario con una breve descripción de algunos términos usados a lo largo del texto.

Los poliploides se definen como aquellos organismos que poseen uno o más juegos adicionales de cromosomas homólogos respecto al número más frecuentemente observado en la naturaleza para una especie dada. De entre los poliploides, los triploides, animales con tres juegos de cromosomas homólogos en lugar del habitual número diploide o de dos, son, dentro de su escasez, los más comunes. La poliploidía espontánea se da en peces, tanto en especies salvajes como cultivadas, aunque la frecuencia de su aparición es muy baja. La poliploidía natural ha sido descrita en varios órdenes de peces filogenéticamente distantes, existiendo algunas familias completamente poliploides (LE COMBER y SMITH 2004; LEGGATT e IWAMA 2003). Actualmente, se sospecha que la poliploidía ha aparecido de forma independiente en varias ocasiones y ha tenido una importancia considerable en la evolución de los peces, siendo una de las causas principales de su gran diversidad (LE COMBER y SMITH 2004), y parece ser más abundante en especies de peces filogenéticamente más primitivas (LEGGATT e IWAMA 2003).

Por otro lado, la ginogénesis es un caso particular de partenogénesis o reproducción uniparental en la que los individuos poseen una dotación cromosómica exclusivamente de origen materno (SCHULZ 1967; CHOURROUT 1982). En la ginogénesis el esperma activa el desarrollo del huevo sin que contribuya a la dotación cromosómica del futuro cigoto. La reproducción por ginogénesis, así como mediante otros mecanismos inusuales, está presente en algunos grupos (BEUKEBOOM y VRIJENHOEK 1998). Actualmente, no se conoce bien la frecuencia de la aparición de la ginogénesis espontánea en especies de peces habitualmente diploides, aunque se sabe que de entre las aproximadamente 28.000 especies hoy en día conocidas, hay, como mínimo, una media docena que se reproducen exclusivamente por este método (F. PIFERRER, F. MAYNOU, S. MESSEGUER y D. LLORIS, datos no publicados). En estas especies no existen los machos, por lo que todos los individuos son hembras. En las especies ginogenéticas, las hembras producen huevos que conservan la diploidía o bien por la ausencia de meiosis (apomixis) o mediante mecanismos que restablecen la diploidía tras la meiosis,



siendo el más habitual la integración del juego entero de cromosomas del segundo corpúsculo polar (SCHLUPP 2005). Esto es precisamente, como se verá a continuación, lo que se persigue con la inducción artificial de la ginogénesis. Es conveniente señalar aquí que muchas veces se afirma que la ginogénesis es un tipo de reproducción asexual (BEUKEBOOM y VRIJENHOEK 1998). Ésto genera periódicamente debates interesantes en ciertos foros (L. MARGULIS, comunicación personal). Esta afirmación es discutible puesto que los animales ginogenéticos producen gametos por meiosis –aunque, como se ha mencionado, ésta al final del proceso puede verse modificada–, por lo que existe una fuente de variación genética distinta a la originada por mutaciones y que viene dada por la recombinación de cromosomas homólogos durante la profase I. Por tanto, en la ginogénesis los descendientes no son simples copias de los progenitores.

1.3. Triploidía

Inducción

Con la inducción a la triploidía se generan animales viables con tres juegos de cromosomas homólogos en lugar del habitual número de dos. Ello se consigue comúnmente impidiendo la extrusión del segundo corpúsculo polar tras la fertilización. Aquí es conveniente recordar el proceso de gametogénesis (formación de gametos) y fertilización en los peces (Figura 1). La espermatogénesis (formación de gametos masculinos) y oogénesis (formación de gametos femeninos) es el nombre que recibe la gametogénesis en machos y hembras, respectivamente. Al comienzo de la espermatogénesis (Figura 1A), durante la diferenciación sexual de los machos, las células primordiales germinales se convierten en espermatogonias. Las espermatogonias proliferan durante un largo periodo por divisiones mitóticas, que se aceleran cuando el animal alcanza la pubertad y deviene sexualmente maduro. Cuando las espermatogonias entran en meiosis y replican su material genético se convierten en espermatocitos primarios que, tras la división meiótica I, devienen espermatocitos secundarios. A su vez, éstos a través de la división meiótica II, se convierten en espermátidas haploides, de igual tamaño entre sí, que seguidamente en un proceso postmeiótico llamado espermiogénesis se diferencian en espermato-



FIGURA 1

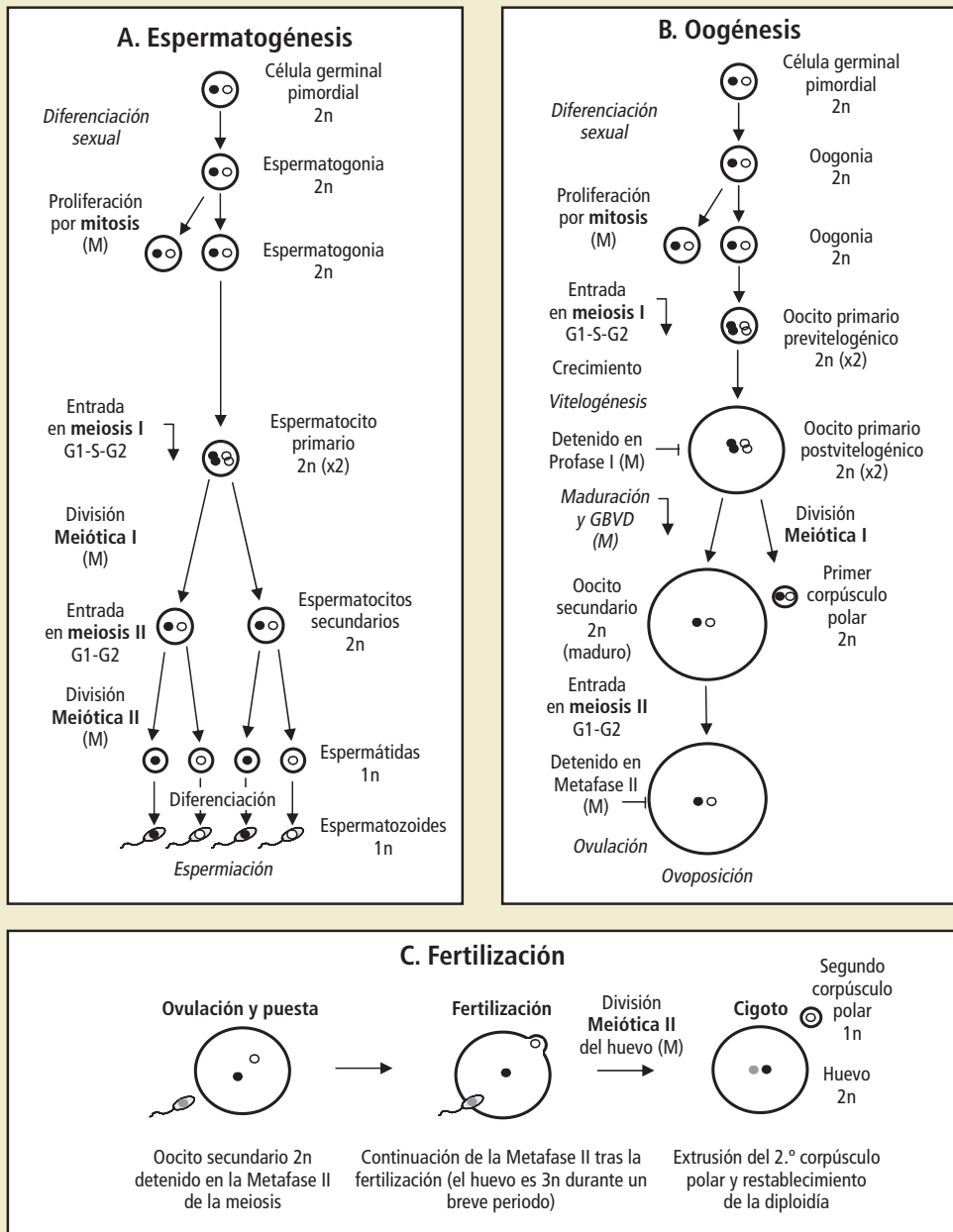




FIGURA 1.

Gametogénesis, fertilización en los peces y principio por el que se puede inducir la triploidía. Tras la diferenciación sexual, las células primordiales germinales se convierten en espermatogonias en los machos o en oogonias en las hembras. A) Espermatogénesis.

Las espermatogonias proliferan por divisiones mitóticas y con la entrada en meiosis I se convierten en espermatoцитos primarios que, tras la división meiótica I, devienen espermatoцитos secundarios. A su vez, éstos a través de la división meiótica II, se convierten en espermátidas haploides, que seguidamente se diferencian en espermatozoides. B) Oogénesis. Las oogonias entran en meiosis I, convirtiéndose en oocitos primarios y se detienen en la Profase I. Éstos crecen de tamaño durante la vitelogénesis. Cuando llega la pubertad, se restablece la meiosis y el oocito madura. La primera división meiótica da como resultado dos células muy desiguales: un oocito secundario, que acumula todo el citoplasma, y el primer corpúsculo polar.

El oocito secundario entra rápidamente en la meiosis II y detiene su progreso en la metafase II. En este estadio ocurre más tarde la ovulación, la ovoposición (puesta) y la fertilización. Tras la puesta el oocito recibe el nombre de huevo. C) Fertilización. La fertilización implica la continuación con la segunda división meiótica, que da como resultado el huevo fertilizado (cigoto) y el segundo corpúsculo polar. Tras la penetración del espermatozoides y antes de la extrusión de dicho corpúsculo, el huevo es triploide por unos momentos. La extrusión del segundo corpúsculo polar restablece la diploidía pero impidiéndola se puede inducir la triploidía. En cursiva se indican los procesos fisiológicos relacionados con la gametogénesis. Por simplicidad, cada punto blanco, gris o negro representa un juego entero de cromosomas y el resultado del proceso de recombinación entre cromosomas homólogos durante la profase I no se muestra. Se indica también el nivel de ploidía en cada estadio: $2n$ y $1n$, indican dos y un juego de cromosomas homólogos, respectivamente, y $2n(x2)$ indica que el material genético se ha duplicado. G1 (intervalo 1), S (replicación del material genético), G2 (intervalo 2) y M (división celular) corresponden a las distintas fases del ciclo celular. Nótese que la meiosis II no tiene fase S. El diagrama ilustra que, tras el inicio de la meiosis, en los machos cada espermatogonia da lugar a cuatro espermatozoides de igual tamaño, mientras que en las hembras cada oogonia da un solo huevo.

zoides. Por otro lado, al comienzo de la oogénesis (Figura 1B), durante la diferenciación sexual de las hembras, las células primordiales germinales se convierten en oogonias. Tras un breve periodo de proliferación por mitosis, las oogonias entran en la primera división meiótica, convirtiéndose en oocitos primarios con el material genético replicado (fases $G1 \rightarrow S \rightarrow G2$ del ciclo celular), y se detienen en la Profase I ($G2 \rightarrow M$). Éstos crecen de tamaño por síntesis de RNA y acumulación



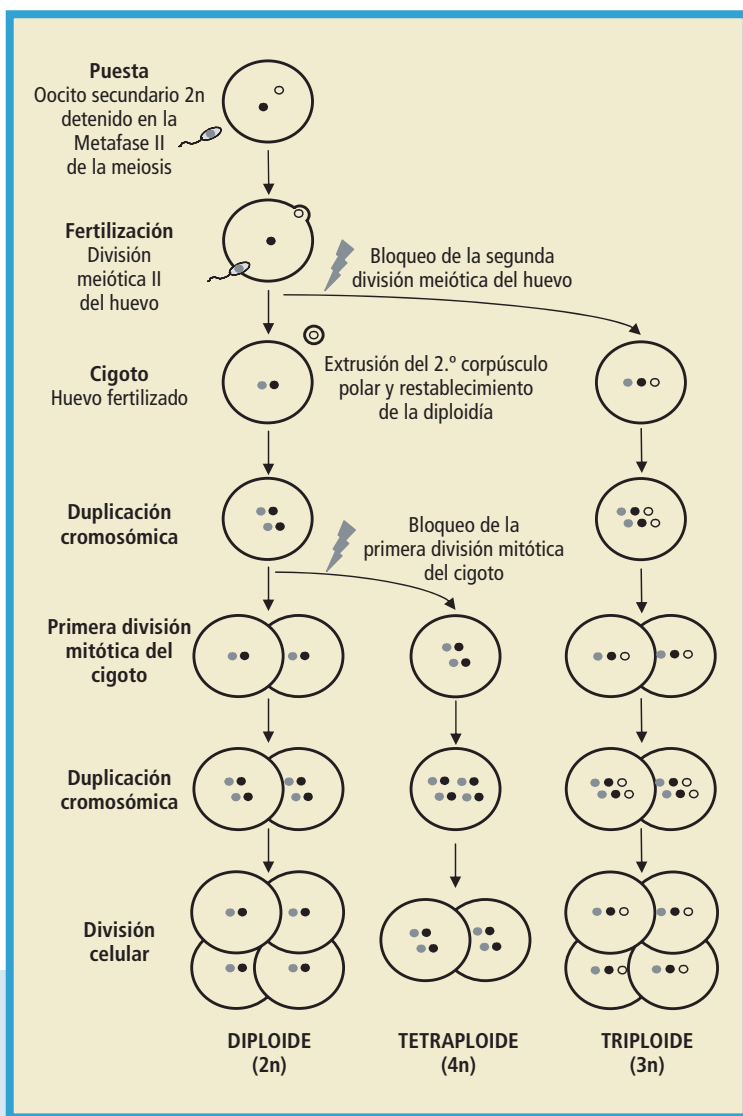
de reservas durante la vitelogénesis. Cuando llega la pubertad con sus cambios hormonales asociados se restablece la meiosis, el oocito madura y se rompe la membrana nuclear (GVBD, de «germinal vesicle breakdown», según la notación comúnmente usada). La primera división meiótica da como resultado dos células muy desiguales: un oocito secundario, que acumula todo el citoplasma, y el primer corpúsculo polar que, con o sin una división adicional, seguidamente degenera. El oocito secundario entra rápidamente en la segunda división meiótica, esta vez sin replicación del material genético ($G1 \rightarrow G2 \rightarrow M$) y vuelve a detener su progreso, esta vez en la metafase II (fase M). En este estadio ocurre la ovulación (salida del oocito secundario del folículo ovárico, normalmente hacia la cavidad ovárica o, en algunas especies que no la poseen, como los salmónidos, hacia la cavidad visceral), la ovoposición (liberación de los oocitos) y la fertilización (entrada del esperma en el citoplasma del oocito). Así, en los peces, al igual que ocurre en el resto de vertebrados, los huevos antes de ser fertilizados se encuentran parados en la metafase II de la meiosis (ALBERTS *et al.* 1989). Con la entrada del esperma durante la fertilización (Figura 1C) se activan los mecanismos celulares que reprenden la meiosis. La fertilización implica la continuación con la segunda división meiótica. Ésta da como resultado, por un lado, el huevo fertilizado (cigoto), con un juego entero de cromosomas llamado pronúcleo femenino que se fusiona con el juego de cromosomas aportado por el espermatozoide, el cual una vez dentro del huevo recibe el nombre de pronúcleo masculino (GILBERT 1991). Por otro lado, la segunda división meiótica da como resultado un juego entero de cromosomas que recibe el nombre de segundo corpúsculo polar, que se extruye pasados unos minutos. Así, tras la penetración del esperma y antes de la extrusión de dicho corpúsculo, el huevo es, estrictamente hablando, triploide por unos momentos. La extrusión del segundo corpúsculo polar finaliza la segunda división meiótica y se restablece la diploidía del cigoto ($M \rightarrow G2$). Por lo tanto, si tras la fertilización se impide la extrusión del citado segundo corpúsculo polar mediante, por ejemplo, un cambio brusco en la tasa de desarrollo del incipiente cigoto –lo que se consigue por una variación abrupta de la temperatura en forma de choque térmico– o por un aumento importante de la presión hidrostática a la que



está expuesto el huevo, entonces se genera un cigoto con tres juegos de cromosomas ($3n$), dos de origen materno y uno de origen paterno (Figura 2). Por razones que aún no se comprenden bien, la inducción a la triploidía resulta en animales viables en peces y anfibios, pero su inducción es en general muy difícil o imposible en el resto de los vertebrados. En este sentido, las distintas hipótesis elaboradas para explicar la razón por la cual la poliploidía es más frecuente en plantas que en animales, así como la validez de esta misma afirmación, han sido recientemente revisadas por MABLE (2004). Además, como muestra de que en biología siempre se encuentran excepciones que confirman la regla, se tiene el descubrimiento de una especie de sapo gonocorista y triploide (STÖCK *et al.* 2002) y de un mamífero que es tetraploide (GALLARDO *et al.* 1999).

En los choques térmicos e hidrostáticos existen tres variables fundamentales que condicionan su eficiencia y que son, de mayor a menor importancia: el momento de aplicación del choque, su intensidad y su duración (FELIP *et al.* 1997). Los valores óptimos de cada una de estas tres variables varían según la especie y es fundamental conocerlos para obtener el mayor número de triploides posible acompañados de una alta supervivencia. Igualmente, para la comparación de distintos tratamientos aplicados con intención de inducir la triploidía, más que el porcentaje de triploides obtenidos, se tiene en cuenta el rendimiento del procedimiento. Éste se calcula como el producto de las frecuencias relativas del número de peces triploides y supervivientes (normalmente tras la eclosión de los huevos), y se expresa como porcentaje (IHSEN *et al.* 1990). La Tabla 1 muestra los protocolos de inducción de la triploidía en varias especies de interés comercial. Con el fin de facilitar la comparación entre distintos tratamientos, las magnitudes de las variables de los mismos se expresan usando las unidades del Sistema Internacional, habiéndose calculado sus valores en aquellos casos en los que se utilizaron otras unidades distintas en las publicaciones originales.

La aplicación de las técnicas de manipulación cromosómica en cualquier especie requiere experiencia previa en el manejo de los reproductores, la obtención de los gametos y la fertilización artificial. Asimismo, conocer el tiempo después de la fertilización de los huevos en el que

**FIGURA 2.**

Esquema de
la obtención
de individuos

triploides mediante la aplicación de un choque físico (térmico o hidrostático). Los puntos de distinto color representan cada uno un juego entero de cromosomas de origen materno (negro, blanco) y paterno (gris). La inhibición de la extrusión del segundo corpúsculo polar da lugar a un individuo triploide, mientras que la inhibición de la primera división mitótica del cigoto da lugar a un individuo tetraploide. Modificado de BENFEY y DONALDSON (1987).



aplicar el tratamiento con el fin de manipular los juegos enteros de cromosomas es crucial para la práctica con éxito de estas metodologías. Idealmente, el uso de estas técnicas exige la disponibilidad de lotes de reproductores que respondan a los tratamientos de inducción ambiental y/u hormonal a la puesta y produzcan gametos de buena calidad de forma predecible. En general, los choques térmicos (fríos o calientes) son adecuados para especies con huevos pequeños, mientras que para especies con huevos grandes como los de los salmónidos, algunos prefieren los choques hidrostáticos (BENFEY *et al.* 1988), al considerar que los térmicos pueden generar demasiada variabilidad en especies con dicho tipo de huevos (JOHNSON *et al.* 2004). Para las especies marinas cultivadas en nuestras aguas, los choques fríos han sido los más utilizados (Tabla 1).

La triploidía puede también obtenerse mediante la fertilización de un huevo normal con el esperma de un tetraploide, que es $2n$. A su vez, los tetraploides pueden conseguirse mediante la inhibición de la primera división mitótica mediante choque térmico o hidrostático una vez se ha duplicado el número de cromosomas del cigoto (Figura 2). Aunque los tetraploides pueden usarse para la generación de triploides, su estabilización es difícil, probablemente debido a la presencia de mosaicos y otros factores (ARAI 2000).

Identificación

La validación y puesta a punto de los métodos de determinación del nivel de ploidía son también necesarios para conocer el porcentaje de triploides producidos. Entre los procedimientos más utilizados en la determinación de la triploidía cabe destacar: 1) técnicas citogenéticas, basadas en el conteo del número de cromosomas o de las regiones activas responsables de la organización del nucleolo (regiones-NOR); 2) técnicas fluorimétricas, tales como la citometría de flujo, basadas en la tinción celular con un fluorocromo y la estimación posterior de la cantidad de DNA en función de la cantidad de fluorescencia detectada y 3) estima del tamaño celular, principalmente de los eritrocitos, debido a que el aumento extra de DNA en los individuos triploides obliga a éstos a incrementar el tamaño y el volumen de sus células (Figura 3). En el caso de los eritrocitos, que son nucleados en peces, particularmente la medición del tama-



TABLA 1

Protocolos de inducción de la triploidía (3n) en algunas especies de interés comercial.

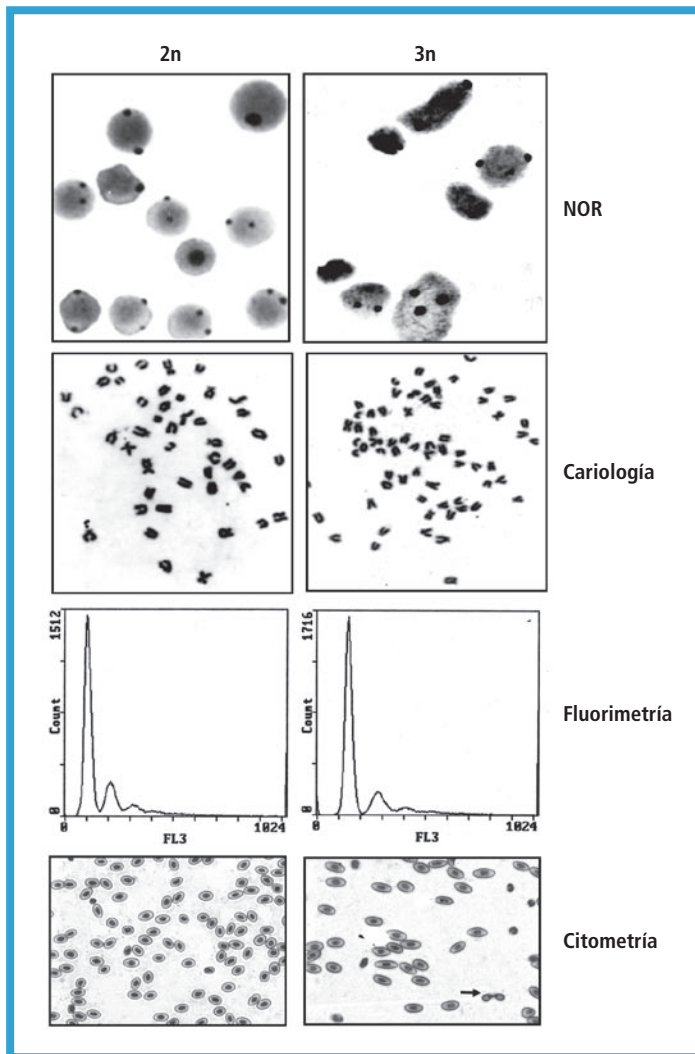
Especie	Condiciones de choque ¹	Resultados ²	Referencias
1. Salmónidos			
<i>Salmo salar</i> (salmón atlántico)	70 MPa, 6 min, 20 min 32 °C, 5 min, 15 min	100% 3n, 88.6% 100% 3n, 92.5%	BENFEY y SUTTERLIN (1984a)
<i>Oncorhynchus kisutch</i> (salmón «coho»)	62.1 MPa, 4 min, 20 min	100% 3n, 87.5%	PIFERRER <i>et al.</i> (1994a)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (trucha arco iris)	28 °C, 10 min, 40 min	100% 3n, 57.7%	SOLAR <i>et al.</i> (1984)
2. Perciformes			
<i>Dicentrarchus labrax</i> (lubina)	0-2 °C, 20 min, 5 min	89-90% 3n, 40-50%	COLOMBO <i>et al.</i> (1995)
	0 °C, 10 min, 5 min	95-100% 3n, 80%	FELIP <i>et al.</i> (1997)
	0-1 °C, 15-20 min, 5 min	100% 3n, 56%	PERUZZI y CHATAIN (2000)
	59 MPa, 2 min, 6 min	100% 3n, 71%	PERUZZI y CHATAIN (2000)
<i>Sparus aurata</i> (dorada)	34 °C, 10 min, 0 min	100% 3n, 40%	GARRIDO-RAMOS <i>et al.</i> (1996)
	37 °C, 2,5 min, 3 min	100% 3n, 40%	GORSHKOV <i>et al.</i> (1998)
	~37 °C, 3 min, 2,5 min ^a		GORSHKOV <i>et al.</i> (2002)
3. Peces planos			
<i>Scophthalmus maximus</i> (rodaballo)	0 °C, 20 min, 5 min	90% 3n, 80%	PIFERRER <i>et al.</i> (2000)
	-1-0 °C, 25 min, 6.5 min	95-100% 3n, 60%	PIFERRER <i>et al.</i> (2003)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (fletán)	24 °C, 15-30 min, 15 min	84% 3n, 20%	HOLMEFJORD y REFSTIE (1997)
	-1 °C, 2-3 h, 15 min	92-95% 3n, 50-82%	HOLMEFJORD y REFSTIE (1997)

¹ Indica, en este orden, la intensidad del choque, su duración y el intervalo de comienzo tras la fertilización.

² Indica el porcentaje de triploides y el porcentaje de supervivencia tras la eclosión en relación a la de los diploides.

^a Producción de híbridos triploides usando esperma de una especie heteróloga (*Pagrus major*).

ño de su eje mayor es un método sencillo para la identificación de peces triploides en la mayoría de aplicaciones (BENFEY 1999). De hecho, la determinación del nivel de ploidía midiendo la longitud del eje mayor de los eritrocitos en una muestra de sangre ha sido descrita habitualmente en las especies en las que se ha inducido la triploidía (BENFEY 1999; PIFERRER *et al.* 2003; LUCKENBACH *et al.* 2004), siendo un método fiable y el más usual. Sin embargo, aunque esta

**FIGURA 3.**

Métodos comúnmente empleados para la determinación de la ploidía y la identificación de individuos diploides ($2n$) y triploides ($3n$). De arriba hacia abajo: conteo del número de regiones organizadoras del nucleolo (NOR); cariotipado o conteo del número de cromosomas; cuantificación del contenido de DNA tras tinción con un fluorocromo específico; medida del tamaño de los eritrocitos.

última metodología puede utilizarse como técnica rutinaria en la identificación de triploides las metodologías más precisas son la citometría de flujo y el cariotipo al ser determinaciones directas y no estimaciones. Por ejemplo, en la lubina se ha determinado que su número diploide es $2n = 48$ cromosomas y su número triploide $3n = 72$ (GORSHKOVA *et al.* 1995; COLOMBO *et al.* 1995; FELIP *et al.* 1997),



y en el rodaballo que su número diploide es $2n = 44$ cromosomas y su número triploide $3n = 66$ cromosomas (BOUZA *et al.* 1994; PIFERRER *et al.* 2000). Es posible que la inducción a la triploidía dé como resultado la aparición de individuos mosaicos, en los cuales el nivel de ploidía puede variar según el tejido considerado. En estos casos es importante verificar que las células germinales son triploides, lo que significará que estos animales son efectivamente estériles. La Tabla 2 recopila los métodos empleados para la identificación de triploides en varias especies de peces de interés en acuicultura. Una comparación de las ventajas e inconvenientes de los distintos métodos para verificar la ploidía puede encontrarse en HARRELL y VAN HEUKELEM (1998).

Efectos sobre su biología

Los animales a los que se les ha inducido la triploidía pueden desarrollarse y crecer esencialmente de forma normal, lo que significa que el proceso de división celular por mitosis no se ve afectado por la nueva condición. En dichas divisiones están involucrados un 50% más de cromosomas respecto a la situación en diploides al haber tres juegos enteros de cromosomas en lugar de dos que participan en dicha división. Por el contrario, la meiosis, exclusiva de las células germinales, se ve interrumpida al verse seriamente dificultado el apareamiento de tres cromosomas homólogos durante el zigoteno de la profase I, por lo que los individuos a los que se les ha inducido la triploidía son genéticamente estériles. Sin embargo, los triploides presentan un sistema endocrino funcional capaz de responder a los estímulos externos y hormonales (BENFEY *et al.* 1989).

En especies en las que el sexo homogamético son las hembras, la triploidía debería producir un número igual de machos (XXY) y de hembras (XXX). Además, la ausencia de intersexos en las progenies triploides indicaría la presencia de un sistema de determinación sexual XX/XY con un Y dominante (THORGAARD 1983).

Puesto que en los peces y otros vertebrados la meiosis ocurre muy al principio del desarrollo en las hembras, las hembras triploides sólo desarrollan gónadas muy rudimentarias (Figura 4), sin signos de maduración y esencialmente desprovistas de huevos, aunque en algunas especies puedan observarse algunos oocitos poco desarrollados


TABLA 2.

Métodos usados para la identificación de peces triploides y ginogenéticos.

Especie	Verificación de la triploidía	Referencias	Verificación de la ginogénesis	Referencias
1. Salmónidos				
<i>Salmo salar</i> (salmón atlántico)	Citometría de flujo	BENFEY y SUTTERLIN (1984a)	Microsatélites	JOHNSTONE y STET (1995)
<i>Oncorhynchus kisutch</i> (salmón «coho»)	Citometría de flujo	PIFERRER <i>et al.</i> (1994b)	Proporción de sexos	REFSTIE <i>et al.</i> (1982)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (trucha arco iris)	Citometría de flujo Tamaño celular	SOLAR <i>et al.</i> (1984) LINCOLN y SCOTT (1984)	Proporción de sexos	CHOURROUT y QUILLET (1982)
2. Perciformes				
<i>Dicentrarchus labrax</i> (lubina)	Cariotipo Contaje de NORs	COLOMBO <i>et al.</i> (1995) FELIP <i>et al.</i> (1997)	Cariotipo Contaje de NORs	COLOMBO <i>et al.</i> (1995) FELIP <i>et al.</i> (1997)
	Tamaño celular (eritrocitos y células germinales)	FELIP <i>et al.</i> (1997) FELIP <i>et al.</i> (2001a)	Morfología externa (síndrome haploide)	COLOMBO <i>et al.</i> (1995)
	Citometría de flujo	ZANUY <i>et al.</i> (1994) COLOMBO <i>et al.</i> (1995) PERUZZI y CHATAIN (2000)	AFLPs microsatélites	FELIP <i>et al.</i> (2000) PERUZZI y CHATAIN (2000) FRANCESCON <i>et al.</i> (2005)
<i>Sparus aurata</i> (dorada)	Cariotipo	GARRIDO-RAMOS <i>et al.</i> (1996) GORSHKOV <i>et al.</i> (1998)	Cariotipo	GORSHKOV <i>et al.</i> (1998)
3. Peces planos				
<i>Scophthalmus maximus</i> (rodaballo)	Cariotipo Contaje de NORs	PIFERRER <i>et al.</i> (2000)	Cariotipo Contaje de NORs	PIFERRER <i>et al.</i> (2003)
	Eritrocitos	PIFERRER <i>et al.</i> (2003)	Microsatélites	CASTRO <i>et al.</i> (2003)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (fletán)	Citometría de flujo	HOLMEFJORD y REFSTIE (1997)	Síndrome haploide Microsatélites	TVEDT <i>et al.</i> (2006)
<i>Solea solea</i> (lenguado común)			Síndrome haploide	HOWELL <i>et al.</i> (1995)

Abreviaturas: NORs, regiones organizadoras del nucleolo; AFLPs, «Amplified fragment length polymorphisms».

(Figura 5). En cualquier caso, las hembras triploides son en la práctica totalmente estériles, y no experimentan la maduración sexual. Ello es debido a que en las hembras la meiosis empieza justo después de la diferenciación sexual, cuando los animales son todavía muy jóvenes. Con la inducción de la triploidía el desarrollo folicular y, por tanto, de las células esteroideogénicas, no tiene lugar al estar su desarrollo sincronizado con el del oocito, que no progresa (CARRASCO *et al.* 1998; BENFEY 1999) (Figura 5). En los machos, sin embargo, la meiosis no ocurre hasta el inicio de la pubertad, cuando la gónada ha tenido la

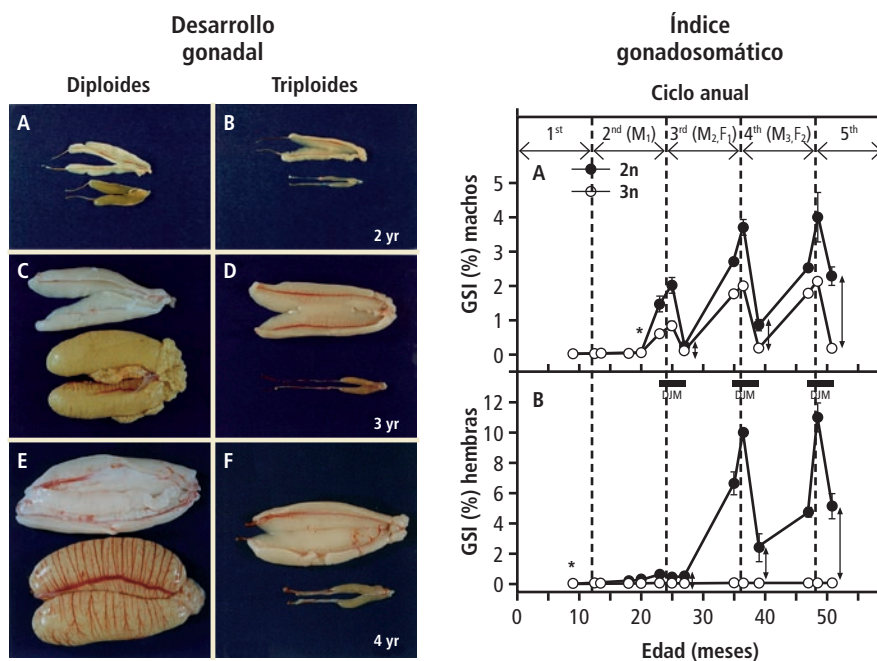
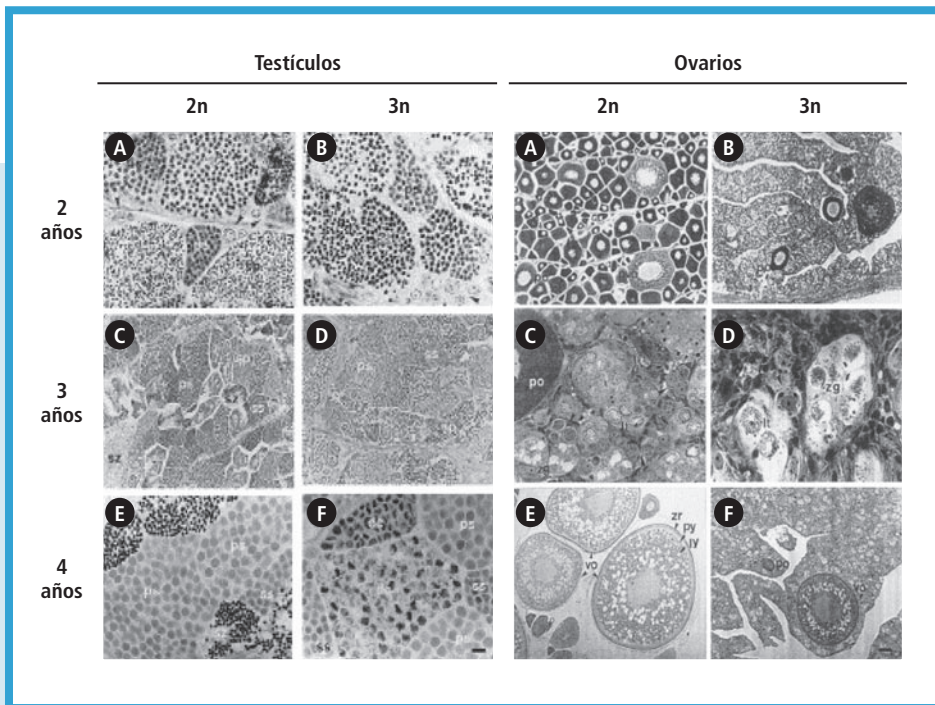


FIGURA 4.

Panel izquierdo: Desarrollo gonadal en lubinas diploides y triploides a los 2 (A, B), 3 (C, D) y 4 (E, F) años de edad. En cada fotografía los testículos ocupan la posición superior y los ovarios la inferior. Panel derecho: Cambios en el índice gonadosomático (GSI) en lubinas diploides (2n) y triploides (3n), desde los 9 hasta los 51 meses de edad, en machos (A) y hembras (B).

Modificado de FELIP *et al.* (2001c).

oportunidad de crecer por divisiones mitóticas, por lo que los testículos de los triploides, aunque más pequeños que los de los diploides (Figura 4), aún son capaces de experimentar los cambios hormonales asociados a la reproducción al poseer un número de células esteroideogénicas similar al de los diploides. Estos efectos se reflejan también en distintos tipos celulares observados en las gónadas de los triploides (Figura 5) así como de los valores del índice gonadosomático (peso de las gónadas / peso del pez) x 100 según la edad y el sexo (Figura 4). En


FIGURA 5.

Fotomicrografías de testículos (panel izquierdo) y ovarios (panel derecho) de lubinas diploides (2n) y triploides (3n) a distintas edades. Panel izquierdo: los testículos de machos 2n (A,C) y 3n (B,D) a los 2 y 3 años de edad mostraron un desarrollo parecido. A los 4 años de edad, los machos 3n mostraron un mayor tamaño de células germinales (F) que los machos 2n (E). En los 3n los espermatocitos primarios mostraron divisiones anómalas (dc). Leyenda: espermatogonia (flechas), espermatocitos primarios (ps), espermatocitos secundarios (ss), espermátidas (sp) y espermatozoides (sz). Barra = 20 μ m en A, B; 50 μ m en C, D y 10 μ m en E, F. Panel derecho: en los ovarios de los 2n de 2 años de edad (A) se observaron oocitos previtelogénicos (pvo) y en estadio perinucleolar (po). A la misma edad, el ovario de los 3n contenía solamente oögonias y células germinales en los primeros estadios de la meiosis, con la presencia de muy pocos oocitos perinucleolares y previtelogénicos. A los 3 años de edad en los 2n se pueden observar células germinales en los estadios tempranos de la meiosis: leptoteno (lt) y zigoteno (zg). La flechas señalan a oögonias. E, oocitos vitelogénicos (vo) de una hembra 2n de 4 ños. Obsérvese la zona radiata (zr), gotas lipídicas (ly) y gránulos de vitelo (py). F, ovario de una hembra 3n de 4 años de edad mostrando sólo algunos oocitos vitelogénicos esporádicos. Barra = 100 μ m en A,B y E,F; 20 μ m en C; y 10 μ m en D. Modificado de FELIP *et al.* (2001c).



algunas especies los machos triploides son capaces incluso de producir pequeñas cantidades de esperma aneuploide que, sin embargo, no es capaz de generar progenies viables si se utiliza para la fertilización. Así pues, para conseguir animales completamente estériles se requiere la inducción a la triploidía junto con la producción de lotes formados exclusivamente por hembras. Ello se puede conseguir triploidizando lotes de peces formados exclusivamente por hembras (LINCOLN y SCOTT 1983) o feminizando a peces a los que se les ha inducido la triploidía (PIFERRER *et al.* 1994a). En resumen, a excepción de algunas pocas especies, en las que preferentemente los machos no presentan una esterilidad gonadal completa (i.e., son capaces de producir esperma, aunque éste sea aneuploide), la inducción de la triploidía en peces produce alteraciones en el proceso de gametogénesis que afectan al desarrollo normal de las gónadas en ambos sexos (PANDIAN y KOTEESEWARAN 1998; BENFEY 1999; FELIP *et al.* 2001a).

El principal objetivo para la producción de triploides es la esperada mejora en el crecimiento de estos animales como consecuencia de su esterilidad gonadal, lo que supuestamente les confiere una mayor ganancia de peso en comparación a los diploides por su falta de inversión energética en reproducción. Sin embargo, esta generalidad no es aplicable a todas las especies (IHSEN *et al.* 1990; BENFEY 1999; FELIP *et al.* 2001a). Así, el crecimiento de los triploides respecto al de los diploides ha generado cierta confusión. Si bien es cierto que por virtud de su mayor heterocigosidad se podría pensar que los triploides deberían poseer una tasa de crecimiento constitutiva mayor que la de los diploides, no hay datos empíricos que prueben tal afirmación. La alta variabilidad encontrada se debe fundamentalmente a las estrategias reproductivas específicas de cada especie y a las condiciones de cultivo experimentales utilizadas en cada caso. Así pues, existen estudios comparativos de crecimiento entre diploides y triploides bajo condiciones de cultivo mixto o separado. Igualmente, hay investigaciones limitadas a periodos concretos del desarrollo, es decir, estudios de crecimiento en juveniles y/o adultos. Sin embargo, a pesar de toda esta información, estimar la rentabilidad de la triploidía debe hacerse para cada especie de forma individualizada. En resumen, los triploides, en general, crecen igual o incluso menos que los diploides por un periodo de tiempo que



comprende desde las primeras fases del desarrollo hasta la fase juvenil, cuando éstos últimos no han alcanzado todavía la maduración sexual. Sin embargo, una vez los diploides experimentan la maduración sexual, en varias, pero no en todas las especies, los triploides alcanzan mayor peso que los diploides (Tabla 3). Ello no es debido a un incremento de su tasa de crecimiento, sino que ésta no disminuye como ocurre en los diploides durante la maduración sexual al ser estériles y no madurar. La fisiología de los peces triploides, incluyendo aspectos de su hematología, consumo de oxígeno, inmunocompetencia, respuesta al estrés, osmoregulación, utilización del alimento, maduración sexual y comportamiento, han sido revisados en profundidad por BENFEY (1999).

TABLA 3.
Comparación del crecimiento de peces diploides (2n) y triploides (3n) en especies de interés comercial.

Especie	Fase de pre-maduración		Fase de post-maduración		Referencias
	Período	Crecimiento	Período	Crecimiento	
1. Salmónidos					
<i>Salmo salar</i> (salmón atlántico)	Juvenil (0-2 años)	2n = 3n	Adultos	3n > 2n	Benfey y Sutterlin (1984b)
<i>Oncorhynchus kisutch</i> (salmón «coho»)	Juvenil (1-2 años)	2n = 3n	Adultos (1-3 años)	3n > 2n	Withler et al. (1995)
	Juvenil (0-2 años)	2n = 3n			Withler et al. (1998)
					3n = 2n
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (trucha arco iris)	Juvenil (0-2 años)	2n = 3n	Adultos	3n > 2n	Lincoln y Scott (1984)
2. Perciformes					
<i>Dicentrarchus labrax</i> (lubina)	Juvenil (0-2 años)	2n = 3n	Adultos (> 2-4 años)	2n > 3n	Felip et al. (1999a) Felip et al. (2001b)
			Adultos (> 2 años)	2n > 3n	Peruzzi et al. (2004)
<i>Sparus aurata</i> (dorada)	Juvenil (169 días)	2n = 3n		2n > 3n	Gorshkov et al. (2002)
	Juvenil (52 días)	2n = 3n			Haffray et al. (2005)
3. Peces planos					
<i>Scophthalmus maximus</i> (rodaballo)	Juvenil (0-2 años)	2n = 3n	Adultos (> 2-4 años)	3n > 2n	Cal et al. (2006a)



La triploidía se ha empleado también para aumentar la supervivencia y crecimiento de híbridos interespecíficos. Ello ha sido particularmente bien estudiado en los salmónidos (QUILLET *et al.* 1988). ARAI (1988) generó cuatro tipos de híbridos distintos partiendo de trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) y dos especies de salmón del Pacífico. Los híbridos triploides (alotriploides) pueden mostrar un mayor vigor híbrido, esterilidad y supervivencia que los híbridos diploides. Además, alotriploides entre trucha arco iris y salmón del Pacífico mostraron una mayor resistencia al virus causante de la necrosis hematopoiética (PARSONS *et al.* 1986).

Conviene aclarar que según la legislación europea vigente (Directiva 90/220/CEE de 23 de Abril de 1990), los animales a los que se ha inducido la triploidía no son considerados animales modificados genéticamente y por tanto están exentos de las regulaciones a las que están sometidos los individuos transgénicos. Por otra parte, un beneficio indudable de la producción de triploides dada su esterilidad, es la restricción que presentan éstos en términos de la interacción reproductiva y de la hibridación con especies nativas en caso de escapes de instalaciones en tierra o, particularmente, de jaulas (DONALDSON *et al.* 1993). Por este motivo su uso ha sido promovido no sólo en acuicultura sino como método de evitar el impacto genético sobre poblaciones naturales (PIFERRER *et al.* 2007), así como en programas de repoblación por varios organismos internacionales (NASCO, FAO, ICES, etc.). Esto supone para el sector acuícola una medida preventiva a favor de la conservación del medio ambiente además de un reto para la búsqueda de una mejor producción y a la vez de un desarrollo sostenible de la acuicultura.

1.4. Ginogénesis

Inducción

La inducción a la ginogénesis permite obtener animales con herencia exclusivamente materna (Figura 6). Ello se consigue fertilizando huevos con esperma al que previamente se ha desnaturado o fragmentado su ADN mediante la aplicación de radiación ultravioleta (UV) o gamma, respectivamente (THORGAARD 1983; PAN-



DIAN y KOTEESEWARAN 1998). En el supuesto de que se utilice luz UV, que es lo más habitual en estos casos debido a los problemas de acceso y manejo de fuentes de radiación gamma, el esperma debe diluirse previamente con un diluyente apropiado, de forma que lo mantenga inmóvil y permita, al mismo tiempo, compensar la poca penetrabilidad de la luz UV en soluciones viscosas. El proceso de irradiación del esperma lleva consigo el control de otros factores, como el tipo de diluyente, la dilución y la dosis de irradiación. El control de todas estas variables persigue, con anterioridad al proceso de fertilización, la inactivación completa del ADN de los espermatozoides, sin que éstos pierdan su movilidad y capacidad para desencadenar el desarrollo del embrión.

Cuando a la mezcla de huevos más esperma irradiado se le añade agua, se inicia la motilidad de los espermatozoides irradiados que entonces activan al huevo. En estos casos no procede hablar de fertilización *sensu stricto*, pues la penetración del esperma irradiado únicamente reactiva la segunda división meiótica del huevo sin contribuir genéticamente a la dotación del cigoto. La activación de un huevo con este procedimiento da lugar a cigotos haploides ($1n$) (Figura 6), que no consiguen desarrollarse más allá de las primeras fases de la embriogénesis o, a lo sumo, hasta el momento de la eclosión, en el cual todos los individuos haploides mueren. La diploidía puede restablecerse de dos formas. Primera, utilizando un choque idéntico al empleado para la obtención de triploides. Con este choque se retiene el segundo corpúsculo polar, lo que genera un cigoto diploide cuyos dos juegos enteros de cromosomas son de origen materno. Este tipo de ginogenéticos son heterocigotos, puesto que cada uno de los dos juegos de cromosomas son muy parecidos, pero no idénticos, ya que durante la meiosis ha habido un cierto grado de recombinación entre los cromosomas homólogos (ARAI 2000). La segunda forma de restablecer la diploidía es mediante un choque idéntico al utilizado para generar tetraploides, es decir, impidiendo la primera división mitótica del cigoto. Con este procedimiento se generan individuos ginogenéticos diploides homocigotos, puesto que los dos juegos de cromosomas son idénticos al haberse originado por replicación del juego de cromosomas del cigoto (Figura 6).

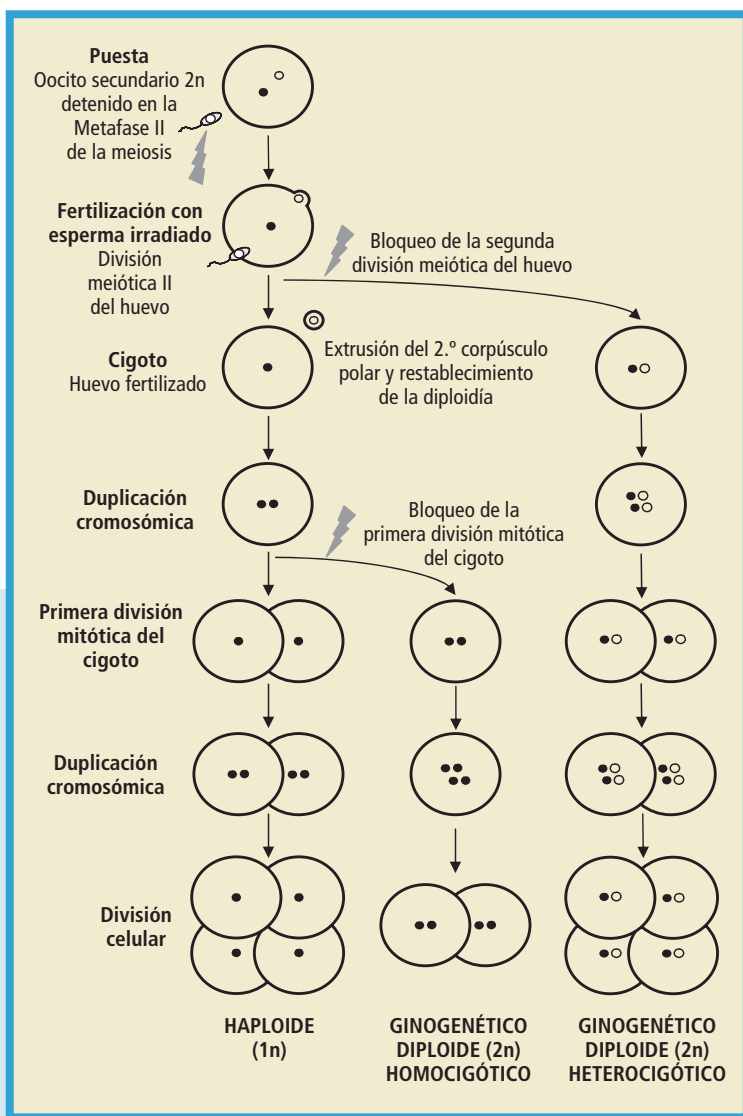


FIGURA 6.

Esquema de la obtención de individuos ginogenéticos mediante la aplicación de un choque físico (térmico o hidrostático). Cada punto representa un juego entero de cromosomas de origen materno. La no contribución del esperma en

el genoma del cigoto se indica por la ausencia de punto dentro del espermatozoide. En este caso, si no se restablece la diploidía se obtiene un individuo haploide. Por el contrario, la inhibición de la extrusión del segundo corpúsculo polar da lugar a un individuo ginogenético diploide heterocigótico, mientras que la inhibición de la primera división mitótica del cigoto da lugar a un individuo ginogenético diploide homocigótico. Modificado de Benfey y Donaldson (1987).



La optimización de la dosis de irradiación se lleva a cabo mediante la generación de lo que en radiobiología se conoce como el efecto Hertwig (THORGAARD 1983; DON y AVTALION 1988; FELIP *et al.* 1999b; PIFERRER *et al.* 2004). Éste consiste en determinar la dosis de radiación que inactiva completamente el ADN de los espermatozoides sin llegar a impedir su motilidad y, por tanto, la capacidad para activar al huevo. La Tabla 4 muestra los protocolos de inducción de la ginogénesis en varias especies de interés comercial.

Identificación

Los ginogenéticos haploides ($1n$) pueden identificarse mediante su cariotipado verificando que poseen sólo la mitad del número de cromosomas de los diploides, pero especialmente por su morfología externa característica durante el desarrollo embrionario (síndrome haploide) (Figura 7) y por su nula viabilidad tras la eclosión. Por otro lado, los ginogenéticos diploides ($G2n$) deben poseer un número de cromosomas idéntico al de los diploides. Ello es condición necesaria pero no suficiente, puesto que para su identificación correcta es preciso demostrar su herencia exclusiva materna. Con este fin actualmente se usan distintos marcadores moleculares tales como polimorfismos del tipo AFLP (amplified fragment length polymorphism) (FELIP *et al.* 2000) o microsatélites (CASTRO *et al.* 2003), que permiten determinar la ausencia de secuencias de DNA específicas de los padres en los animales examinados, y de ahí deducir su condición de ginogenéticos (Figura 8). La combinación del análisis molecular con el cariotipado permite, por tanto, no sólo determinar la existencia de la condición de ginogenéticos sino también su euploidía. En este sentido, estudios en los que se ha investigado en detalle el nivel de ploidía de los ginogenéticos en distintos órganos se ha observado la presencia de mosaicos (TANAKA *et al.* 2003), por lo que es fácil pensar que su presencia pueda ser más común de lo anticipado entre poblaciones de ginogenéticos diploides. En la Tabla 2 se muestran algunos métodos empleados para la identificación de individuos ginogenéticos en especies importantes en acuicultura.

Efectos sobre su biología

Los animales ginogenéticos diploides tienen un alto nivel de homocigosidad (LEARY *et al.* 1985; DON y AVTALION 1988). Esta condición



TABLA 4.

Protocolos de inducción de la ginogénesis (G2n) en especies de interés comercial.

Especie	Inactivación del esperma ¹	Condiciones de choque ²	Resultados ³	Referencias
1. Salmónidos				
<i>Salmo salar</i> (salmón atlántico)	UV, 0.16 J cm ⁻² , 1:40	62 MPa, 5 min, 30 min	100% G2n 64-100%	JOHNSTONE y STET (1995)
<i>Oncorhynchus kisutch</i> (salmón «coho»)	⁶⁰ Co, 100 krad, 1:0	-0.5 °C, 4 h, 10 min	100% G2n 11%	REFSTIE <i>et al.</i> (1982)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (trucha arco iris)	⁶⁰ Co, 150 krad, 1:0	26 °C, 20 min, 25 min	100% G2n 56%	CHOURROUT y QUILLET (1982)
2. Perciformes				
<i>Dicentrarchus labrax</i> (lubina)	UV, ~0.005 J cm ⁻² , 1:100	0-2 °C, 20 min, 5 min	83-100% G2n 17%	COLOMBO <i>et al.</i> (1995)
	UV, 0.35-0.40 J cm ⁻² , 1:10	0 °C, 10 min, 5 min	95-100% G2n 30-35%	FELIP <i>et al.</i> (1999b)
	UV ^{a1} , 0.32 J cm ⁻² , 1:20	0-1 °C, ~17 min, 5 min 59 MPa, 2 min, 6 min	100% G2n 76%	PERUZZI y CHATAIN (2000)
	UV, 0.033 J cm ⁻² , 1:100	~85 MPa, 4 min, ~90 min ^b 0 °C, 20 min, 5 min	100% G2n 18-27%	FRANCESCON <i>et al.</i> (2004, 2005)
<i>Sparus aurata</i> (dorada)	UV ^{a2} , 0.033 J cm ⁻² , 1:30	37 °C, 2.5 min, 3 min	G2n 47%	GORSHKOV <i>et al.</i> (1998)
3. Peces planos				
<i>Scophthalmus maximus</i> (rodaballo)	UV, 0.30 J cm ⁻² , 1:10	-1 a 0 °C, 25 min, 6.5 min	100% G2n 10%, a los 6 meses	PIFERRER <i>et al.</i> (2004)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (fletán)	UV, 65 mJ cm ⁻² , 1:80	58.6 MPa, 5 min, 15 min, 5-6 °C	85% G2n	TVEDT <i>et al.</i> (2006)
<i>Solea solea</i> (lenguado común)	Esperma de fletán no irradiado y no diluido	2 °C, 1 h, 5-10 min, a 12 °C 62 MPa, 10 min, 10-40 min	86% G2n 23% 0%	HOWELL <i>et al.</i> (1995)

¹ Indica, en este orden, el tipo de irradiación usada, la dosis y la dilución del esperma.

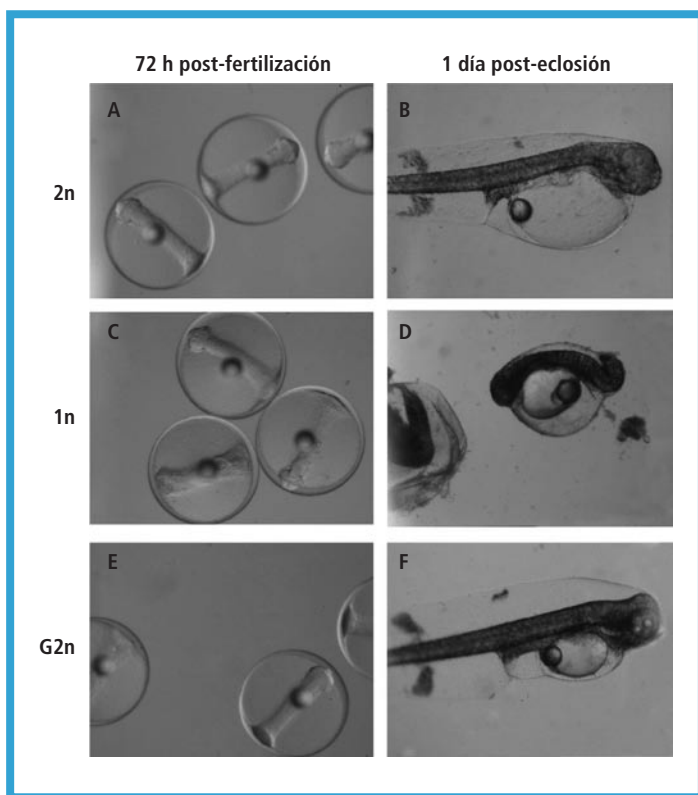
² Indica la intensidad del choque, su duración y el intervalo de comienzo tras la fertilización.

³ Indica el porcentaje de ginogenéticos diploides (G2n) y el porcentaje de supervivencia tras la eclosión en relación a la de los diploides.

^a Uso de esperma heterólogo para la inducción de la ginogénesis (^{a1}dorada, ^{a2}dorada japonesa roja). En el resto de casos el esperma es homólogo.

^b Mitoginogenéticos. Meioginogenéticos en el resto de los casos.

les hace más sensibles a mutaciones recesivas lo que, junto con las manipulaciones necesarias para su generación (obtención de la puesta por masaje abdominal, dilución e irradiación del esperma, fertilización artificial y choque para reestablecer la diploidía), comprometen seria-

**FIGURA 7.**

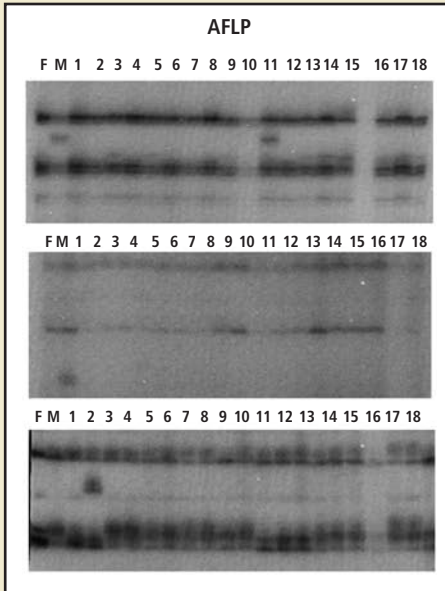
Aspecto externo de embriones de rodaballo a las 72 h tras la fertilización y de larvas 1 día después de la eclosión. A y B: huevos fertilizados con espermatozoides no irradiados (controles diploides, 2n); C y D: huevos fertilizados con espermatozoides irradiados (haploides, 1n); E y F: huevos fertilizados con espermatozoides irradiados y sometidos a choque térmico (ginogenéticos diploides, G2n). Nótese el «síndrome haploide» en D. Modificado de PIFERRER *et al.* (2004).

mente su viabilidad, obteniéndose unos valores de supervivencia que normalmente están por debajo del 10% del valor de los controles no manipulados (FELIP *et al.* 1999b). Entonces, ¿cuál es el objetivo de la producción de ginogenéticos?. En aquellas especies en las que el sexo homogamético corresponde al de las hembras (hembras XX y machos XY), tal y como ocurre, por ejemplo, en la mayoría de salmónidos y muchos peces planos, la obtención de peces homogaméticos es sinónimo de obtención de lotes formados exclusivamente por hembras, al poder heredar sólo cromosomas X de la madre. Esto se ha demostrado en salmónidos y otras especies (THORGAARD 1983; PANDIAN y KOTEESWARAN 1998; IHSEN *et al.* 1990; FELIP *et al.* 2001a) (Tabla 5). Consecuentemente, la obtención de lotes formados exclusivamente por hembras tras la inducción de la ginogénesis ha permitido atribuir o confirmar



FIGURA 8

A. Identificación de lubinas ginogenéticas

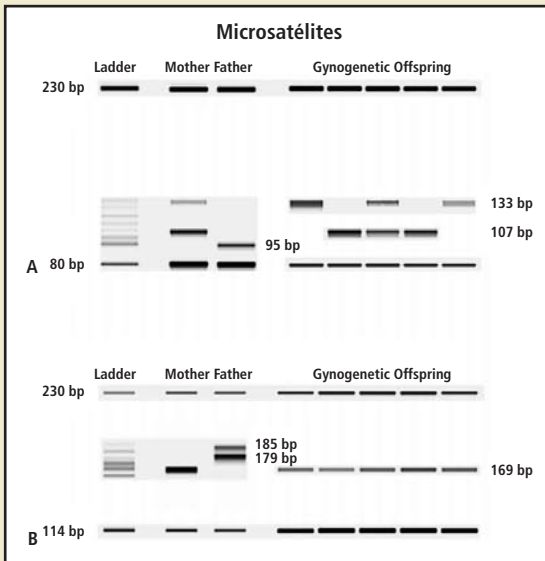


Patrón AFLP utilizando M-AAC/E-CAC como primera combinación de *primers*.

Patrón AFLP utilizando M-AGG/E-CTG como primera combinación de *primers*.

Patrón AFLP utilizando M-ACC/E-CAC como primera combinación de *primers*.

B. Identificación de rodaballos ginogenéticos



Patrones electroforéticos utilizando los loci *Smas-02* (A) y *Smax3-129/NRA* (B) en dos experimentos

Línea 1 (Ladder): marcador estándar externo de tamaño incluyendo un control alélico y 2 internos (A, 80-230 bp, B, 114-230 bp) para precisar el genotipo

Línea 2 y 3 (Mother/Father): progenitores (A, 107/133 para las hembras y 95/95 para los machos; B, 169/169 para las hembras y 179/185 para los machos)

Líneas 4-8 (Gynogenetic offspring): 5 ginogenéticos de la progenie (A, 107/107, 133/133, 107/133, B, todos 169/169)

**FIGURA 8.**

A: Identificación de lubinas ginogenéticas diploides mediante el análisis molecular de polimorfismos de AFLP. Cada panel representa una familia. F y M indican el patrón de bandas de hembras y machos, respectivamente, mientras que 1-18 indica la progenie analizada. El pez 11 del primer panel fue el único no ginogenético al poseer la banda típica del padre. Todos los restantes animales eran ginogenéticos. Modificado de FELIP *et al.* (2000); B: Identificación de rodaballos ginogenéticos diploides mediante el diagnóstico por microsatélites. Cada panel representa una familia. Los 5 individuos analizados en cada familia fueron ginogenéticos. Modificado de CASTRO *et al.* (2003).

el carácter homogamético (XX) a las hembras de muchas especies de interés comercial. Sin embargo, dada la plasticidad y variabilidad asociada al proceso de determinación sexual en peces (BULL 1983; PIFERRER 2001; DEVLIN y NAGAHAMA 2002), no es extraño encontrar especies en las que, a pesar de poseer un sistema del tipo XX/XY responsable del sexo, la inducción de la ginogénesis resulta a veces en la aparición de un porcentaje variable de machos ginogenéticos. Ello parece ser debido a la existencia de genes determinantes del sexo en los autosomas. Además, otros factores como la temperatura (BAROILLER *et al.* 1999) o las interacciones del tipo genotipo-ambiente (SAILLANT *et al.* 2002), además de los factores genéticos, son considerados componentes moduladores clave del sexo fenotípico en muchas de las especies que se cultivan comercialmente, entre ellas la lubina (PIFERRER *et al.* 2005). En especies cuyo sexo homogamético corresponde a los machos (hembras WZ y machos ZZ), la inducción de la ginogénesis puede dar, en teoría, los genotipos ZZ (macho) y WW (hembra). Sin embargo, éste último puede ser inviable, por lo que en estas especies la ginogénesis podría dar sólo machos (DEVLIN y NAGAHAMA 2002).

En algunas ocasiones, se ha observado un cierto paralelismo entre la morfología de algunas hembras ginogenéticas, con ovarios en los que algunos grupos de células germinales no presentan un adecuado desarrollo (PIFERRER *et al.* 1994b) y la de hembras triploides. Esta similitud puede ser debida a desequilibrios genómicos, acarreados por la presencia de un juego extra de cromosomas en los triploides, o por fragmentos de cromosomas en algunos ginogenéticos, especialmente si se ha usado radiación gamma para inactivar el esperma (KRISFALUSI *et al.* 2000).



TABLA 5.

Comparación del crecimiento y proporción de sexos [machos (M): hembras (H)] de peces diploides (2n) y ginogenéticos diploides (G2n) en algunas especies de interés comercial.

Especie	Crecimiento	Proporción de sexos (2n M:H / G2n M:H)	Referencia
1. Salmónidos			
<i>Salmo salar</i> (salmón atlántico)	2n > G2n	50:50 / 0:100	JOHNSTONE y STET (1995)
<i>Oncorhynchus kistutch</i> (salmón «coho»)	2n > G2n	44:56 / 0:100 50:50 / 0:100	REFSTIE <i>et al.</i> (1982) PIFERRER <i>et al.</i> (1994b)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (trucha arco iris)		49:51 / 0:100 50:50 / 0:100	CHOURROUT y QUILLET (1982) KRISFALUSI <i>et al.</i> (2000)
2. Perciformes			
<i>Dicentrarchus labrax</i> (lubina)	2n = G2n (a los 2 años)	46:46 / 46:38 ¹ 47:53 / 50:45	FELIP <i>et al.</i> (2002)
	(edad sin especificar)	20:80 / 39:61 47:53 / 36:64 52:48 / 30:70 78:22 / 18:82	COLOMBO <i>et al.</i> (1998)
3. Peces planos			
<i>Scophthalmus maximus</i> (rodaballo)	2n > G2n (a los 3 años)	50:50 / 25:75 50:50 / 0:100	CAL <i>et al.</i> (2006b)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (fletán)	(a los 9 meses)	50:50 / 0:100	TVEDT <i>et al.</i> (2006)
<i>Solea solea</i> (lenguado común)	(5-10 cm)	50:50 / 60:40	HOWELL <i>et al.</i> (1995)

¹ El resto hasta 100% corresponde a peces con gónadas subdesarrolladas.

Los peces ginogenéticos de especies cuyo sexo homogamético sean las hembras pueden a su vez ser masculinizados con un tratamiento hormonal durante la diferenciación sexual, dando lugar a la producción de neomachos (Figura 9), definidos éstos como hembras genotípicas –constitución XX– convertidas en machos fenotípicos por el mencionado tratamiento. Estos neomachos pueden identificarse mediante una prueba de progenie (análisis de proporción de sexos en cruces con hembras normales) (PIFERRER 2001; DEVLIN y NAGAHAMA 2002). Aunque el procedimiento es largo y tedioso, la identificación de estos animales es crucial porque cuando maduren sexualmente producirán gametos que portarán exclusivamente el cromosoma X. Los neomachos devienen en reproductores valiosísimos, ya que una vez



identificados se tiene la práctica certeza de que al utilizar su espermatozoides para fertilizar huevos obtenidos de hembras normales generarán lotes formados exclusivamente por hembras, de crecimiento superior al de los machos (Figura 9).

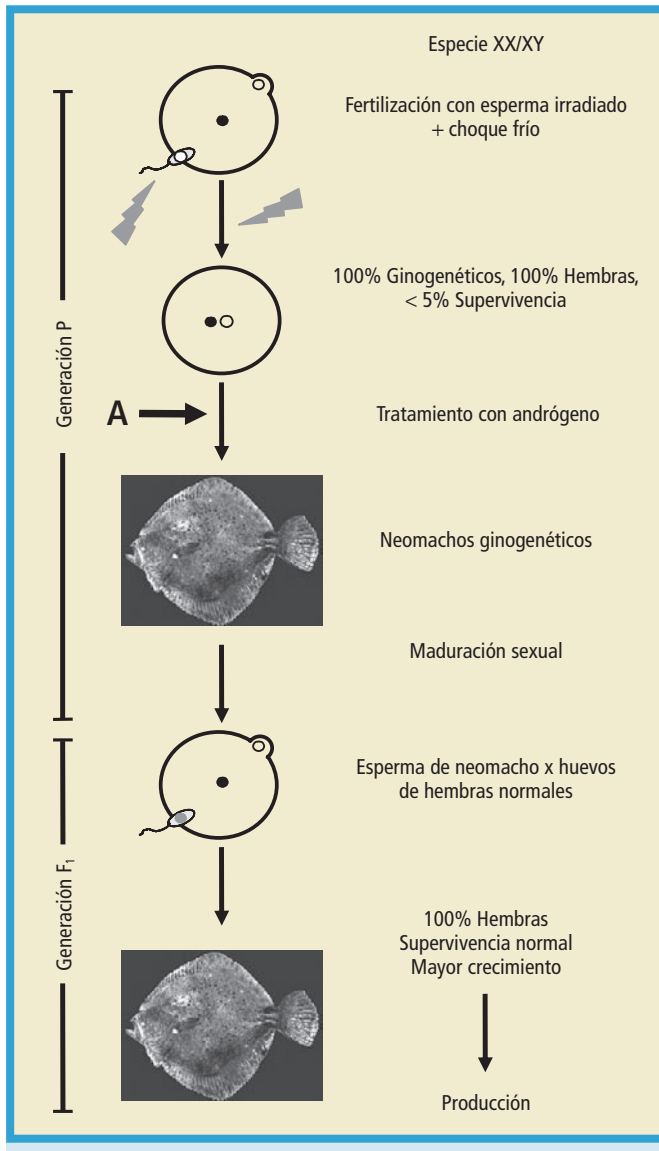


FIGURA 9.

Esquema de la producción de lotes de rodaballo formados exclusivamente por hembras mediante la combinación de la inducción de la ginogénesis y el tratamiento hormonal. Los puntos de distinto color representan cada uno un juego entero de cromosomas de origen materno (oscuro) y paterno (claro), ausente en el espermatozoides irradiado y presente en el espermatozoides normal. A, andrógeno.



En consecuencia, y a diferencia de la triploidía, donde los beneficios de ésta se obtienen en los mismos animales que se manipulan, la ventaja de la inducción de la ginogénesis en acuicultura se obtiene en la siguiente generación, ya que los peces ginogenéticos no pueden utilizarse en producción dada su baja supervivencia inicial (Tabla 4). Sin embargo, la inducción de la ginogénesis, a parte de servir para la generación de reproductores en especies cuyo sexo homogamético son las hembras, tiene otras posibilidades debido a la mayor homocigosis de estos animales, que puede explotarse para algunas aplicaciones (COLOMBO *et al.* 1997). Entre ellas destaca la producción de individuos clónicos (THORGAARD 1983; IHSEN *et al.* 1990). Un ejemplo de la aplicabilidad de las líneas clónicas para el estudio de caracteres productivos en acuicultura se da en la trucha arco iris, donde la producción de animales clónicos ha permitido avanzar notablemente en la genética y la genómica de esta especie (REXROAD y PALTI 2002; THORGAARD *et al.* 2002). Los ginogenéticos son también un material idóneo para producir mapas genéticos de ligamiento, imprescindibles para los programas de selección genética asistida por marcadores. Por consiguiente, se han empleado en la creación del mapa genético de la lubina (CHISTIAKOV *et al.* 2005), la dorada (FRANCH *et al.* 2006) y el rodaballo (BOUZA *et al.* 2007).

1.5. Utilización de peces triploides y ginogenéticos en acuicultura

Tal y como se ha explicado anteriormente, la inducción de la triploidía (Tabla 1) acompañada de la feminización sirve para la producción de peces estériles que al no madurar sexualmente no presentan los problemas asociados con este proceso y pueden usarse directamente en producción. Por otra parte, la inducción de la ginogénesis puede dar peces exclusivamente hembras sólo si el sexo homogamético es el femenino para la especie en cuestión (Tabla 5).

Por las ventajas derivadas de su esterilidad, actualmente la utilización de peces triploides en acuicultura y programas de mejora genética se aplica en las siguientes especies y en los siguientes países: trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Canadá, Francia y Japón; trucha común (*Salmo trutta*) en Francia; salmón atlántico (*Salmo salar*) en



Canadá; trucha arco iris, salmón amago (*Oncorhynchus rhodurus*), salmón japonés (*O. masou*), salmón plateado o «coho» (*O. kisutch*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), hirame (*Paralichthys olivaceus*) y el misgurno (*Misgurnus anguillicaudatus*) en Japón, y carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) en EE.UU. (ARAI 2001; HULATA 2001). Recientemente, han comenzado las pruebas para la aplicación de la triploidía en la producción de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) de gran tamaño en Francia (J.C. FALGUIÈRE y P. HAFFRAY, comunicación personal) y están previstas también para el cultivo del rodaballo en España. Igualmente, la producción de ginogenéticos para la obtención de lotes monosexo se emplea en las siguientes especies y en los siguientes países: trucha arco iris y común en Francia; carpín (*Carassius carassius*), carpín dorado (*C. auratus*), dorada japonesa (*Pagrus major*), ayu, salmón Atlántico, salmón amago, coho y masu en Japón; carpa común (*Cyprinus carpio*) en China, Israel y Japón; y barbo plateado (*Barbus sp.*; *Puntius sp.*) en Vietnam (HULATA 2001).

Para darle una mayor utilidad, este capítulo está orientado a casos concretos más que a temas concretos dentro de la investigación y aplicación del control genético del sexo en peces. Por lo tanto, las especies que aquí se consideran son, dentro de los salmoniformes, el salmón Atlántico, el salmón plateado y la trucha arco iris. La producción de estas especies está plenamente consolidada en Europa y Sudamérica. El salmón Atlántico se produce sobre todo en Noruega, Escocia y Chile; el salmón del Pacífico se ha producido o produce en algunas ocasiones en varios países europeos, y se cultiva en Chile, mientras que la trucha se produce en prácticamente en todo el mundo. En cuanto a los perciformes, se toman en consideración la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y la dorada (*Sparus aurata*), por su asentamiento e importancia en la piscicultura española así como de prácticamente todos los países europeos de la cuenca mediterránea. Finalmente, en cuanto a los Pleuronectiformes o peces planos, se toma en consideración en primer lugar al rodaballo (*Scophthalmus maximus*), por ser España el principal productor mundial y ser una especie estratégica para el desarrollo de la acuicultura marina en Chile. Por su parte, el fletán o hipogloso (*Hippoglossus hippoglossus*) y el lenguado, tanto el común (*Solea solea*), como el senegalés (*Solea senegalensis*), son considera-



dos nuevas especies para la acuicultura, de gran valor estratégico para su diversificación en países del Atlántico Norte, la primera, y de la cuenca mediterránea, las dos últimas. En las siguientes secciones, las especies acabadas de mencionar reciben una atención proporcional a su importancia actual para la acuicultura en España y al conocimiento existente sobre estas manipulaciones, haciendo por tanto mayor hincapié en la lubina y el rodaballo.

2. SALMONIFORMES

Aunque originarios del hemisferio norte, los salmónidos actualmente se cultivan prácticamente en todo el mundo. Entre ellos se encuentran algunas especies como el salmón del Atlántico cuya producción mundial alcanza centenares de miles de toneladas. Gran parte de la puesta a punto de las técnicas de la inducción de la triploidía y de la ginogénesis en peces se ha desarrollado en buena medida con investigaciones realizadas con salmónidos.

2.1. Salmón del Atlántico

Triploidía

Ésta es una de las especies más importantes a nivel mundial por su elevado volumen de producción. La inducción de la triploidía puede conseguirse mediante choques de presión o de calor (BENFEY y SUTTERLIN 1984a) (Tabla 1). En un estudio posterior con los mismos animales, no se observaron diferencias de peso entre salmones diploides y triploides entre los 9 y 18 meses de edad (Tabla 3), aunque éstos últimos fueron más grandes en longitud y, por tanto, tuvieron un factor de condición menor. Las hembras triploides mostraron ovarios rudimentarios que, sin embargo, produjeron entre 1 y 12 huevos según el animal, en contraste con varios centenares de huevos producidos en los diploides. Los testículos de los triploides alcanzaron un tamaño correspondiente aproximadamente a la mitad del de los diploides pero no produjeron esperma (BENFEY y SUTTERLIN 1984b).

Ginogénesis

Tras la irradiación del esperma con radiación gamma o UV la diploidización puede conseguirse mediante un choque térmico (REFSTIE 1983)



o hidrostático (JOHNSOTONE y STET 1995) (Tabla 4). El origen ginogenético de los animales obtenidos se demostró mediante el uso de marcadores moleculares (JOHNSOTONE y STET 1995). Aunque la supervivencia fue baja, los animales ginogenéticos pudieron desarrollarse, experimentar la esmoltificación y crecer lo suficiente como para asegurar su uso como reproductores. Todos los salmones ginogenéticos fueron hembras (JOHNSOTONE y STET 1995) (Tabla 5).

2.2. Salmón plateado

Triploidía

De las siete especies de salmones del Pacífico existentes, la inducción a la triploidía ha sido fundamentalmente estudiada y aplicada en el salmón plateado. En esta especie la triploidía puede conseguirse por la aplicación de choques de presión (PIFERRER *et al.* 1994a) (Tabla 1). Además, en esta especie se ha investigado la posibilidad de la inducción a la triploidía mediante descargas eléctricas sobre el huevo recién fertilizado como complemento a los choques de calor, que generan más variabilidad (TESKEREDZIC *et al.* 1993). Aunque la supervivencia fue elevada y el porcentaje de triploides obtenido del 100%, esta metodología en particular no ha tenido continuidad porque no supera los rendimientos obtenidos con los choques de presión convencionales.

La triploidía en el salmón del Pacífico da lugar a lotes con un número parecido de machos y hembras que exhiben el patrón típico de desarrollo gonadal observado en los triploides. No existen diferencias de crecimiento entre diploides y triploides en esta especie. La triploidía previene completamente la maduración sexual sólo en las hembras, mientras que los machos la siguen experimentando, por lo que la producción de lotes de hembras estériles es la opción preferida (PIFERRER *et al.* 1994a).

Ginogénesis

La obtención de lotes todo hembras puede conseguirse en esta especie mediante la irradiación del esperma con luz UV seguido del restablecimiento de la diploidía mediante la administración de choques fríos (REFSTIE *et al.* 1982) o hidrostáticos (PIFERRER *et al.* 1994b) (Tabla 4). Como es esperable en esta especie, cuyo sexo



homogamético corresponde a la hembra, la inducción de la ginogénesis produce lotes 100% hembras (REFSTIE *et al.* 1982; PIFERRER *et al.* 1994b) (Tabla 5).

2.3. Trucha arco iris

Triploidía

La trucha arco iris se produce en muchas partes del mundo. La tecnología para su cultivo está muy asentada y los niveles de producción son estables. Las truchas pueden comercializarse como tamaño ración o en forma de filetes. En este último caso, se requiere la producción de peces de considerable tamaño, que se ven afectados por la maduración sexual, por lo que es interesante la inducción de la triploidía. Ello se consigue normalmente por choques de calor entre los 25 y 30°C durante 10 min con tiempos bastante variables tras la fertilización, indicativo de la robustez de esta especie a la manipulación cromosómica (SOLAR *et al.* 1984) (Tabla 1). Los efectos de la triploidía en la trucha siguen el patrón habitual: esterilidad funcional en las hembras y producción de esperma aneuploide en los machos (LINCOLN y SCOTT 1984; CARRASCO *et al.* 1998). La inducción de la triploidía en huevos fertilizados con esperma de neomachos permite la producción de lotes de animales estériles todo hembras (LINCOLN y SCOTT 1983).

Ginogénesis

La producción de truchas ginogenéticas es posible por el método convencional. CHOURROUT y QUILLET (1982) optimizaron el método de producción tras la irradiación del esperma con una fuente de cobalto, considerando distintos protocolos de choque térmico. Se observó que tratamientos de 26°C durante 20 min aplicados 25 min después de la fertilización dio lugar a la producción de ginogenéticos con una tasa de eclosión del 56% (Tabla 4). Tras un periodo de crecimiento se observó que todos los animales así producidos eran hembras, lo que confirmó el patrón habitual de la determinación sexual de los salmónidos donde las hembras son el sexo homogamético (Tabla 5). La morfología gonadal de truchas ginogenéticas ha sido estudiada en detalle por KRISFALUSI *et al.* (2000).



3. PERCIFORMES

Actualmente, se dispone de bastante información generadas en los laboratorios sobre los distintos aspectos de la aplicación de técnicas de manipulación cromosómica en la lubina y, en menor grado, en la dorada gracias a las investigaciones llevadas a cabo fundamentalmente en los 10 últimos años. En la actualidad, se ha empezado a explorar la aplicación de estos procedimientos para la producción industrial de la lubina (P. HAFFRAY y J.C. FALGUIÈRE, comunicación personal). Ello permitirá determinar si la aplicación de estas técnicas es favorable bajo condiciones reales de producción.

3.1. Lubina

Triploidía

En la lubina, el procedimiento para la inducción hormonal a la puesta consiste en inyecciones en la cavidad visceral de un análogo de la hormona liberadora de la gonadotropina (LHRHa) (CARRILLO *et al.* 1995a). Los machos son inyectados una sola vez, administrándoles una dosis de 5 µg/kg. Las hembras son inyectadas dos veces con una primera dosis de 5 µg/kg y una segunda de 10 µg/kg. Sólo aquellas hembras a las que se determina a través de una biopsia que poseen oocitos postvitelogénicos (700-900 µm de diámetro) con la vesícula germinal migrando se inyectan con la hormona. Con este tratamiento se obtienen gametos a las 72 h después de la primera inyección. La calidad de los gametos producidos, principalmente la de los huevos, se estima en base a su tamaño (~1.2 mm de diámetro), su flotabilidad y la simetría de las divisiones celulares. Disponer de gametos de buena calidad es condición necesaria pero no suficiente para la obtención de lubinas triploides. Para la fertilización artificial, el método en seco es el más utilizado en la lubina (BILLARD 1984). Tras la fertilización, la administración de un choque térmico o físico a los huevos recién fertilizados es crítico para provocar la retención del segundo corpúsculo polar y conseguir así la producción de individuos triploides (Tabla 1).

En la lubina, los choques fríos con temperaturas próximas a los 0°C se han utilizado con éxito para la producción de triploides (COLOMBO *et al.* 1995; FELIP *et al.* 1997; PERUZZI y CHATAIN 2000), aunque los trata-



mientos de presión son igualmente efectivos (PERUZZI y CHATAIN 2000). No sucede lo mismo con los choques térmicos calientes los cuales, a pesar de que se ha demostrado que permiten la producción de triploides (CARRILLO *et al.* 1995b), necesitan ser mejorados. La Tabla 1 muestra un resumen detallado de los diferentes protocolos de inducción de la triploidía en la lubina descritos por varios autores. Se recogen los diferentes resultados obtenidos en esta especie en función del tipo de choque y las condiciones empleadas. Sin duda, bajo condiciones óptimas de tratamiento (FELIP *et al.* 1997; PERUZZI y CHATAIN 2000), la menor viabilidad de los triploides con respecto a la de sus congéneres diploides durante el desarrollo embrionario y los primeros días tras la eclosión se debe principalmente al tratamiento de choque al que se sometieron los huevos tras la fertilización y no a la condición *per se* de los triploides (FELIP *et al.* 1997).

Efectos de la triploidía en la lubina: crecimiento y reproducción

En la lubina, la triploidía provoca un bloqueo de la meiosis en las hembras, durante las fases iniciales de este proceso, y en los machos, en las fases tardías del mismo. La inhibición del proceso meiótico, como consecuencia del empaquetamiento cromosómico durante las fases tempranas de la meiosis y la falta de una correcta sinapsis entre los cromosomas homólogos, afecta a la oogénesis y a la espermatogénesis en lubinas triploides. Esta situación se traduce en la producción de individuos que presentan un desarrollo gonadal mermado, con un índice gonadosomático de 2% en los machos y 0.08% en las hembras triploides de 4 años de edad vs 3.6% y 9% en diploides adultos, respectivamente (FELIP *et al.* 2001c). Sin embargo, a pesar de esta condición de esterilidad funcional y morfológica la inducción de la triploidía en esta especie no confiere la superioridad esperada en el crecimiento de los individuos triploides, ni siquiera en estado adulto (Tabla 3). El crecimiento de lubinas triploides es equivalente o incluso menor, entre 12-20%, que el correspondiente al de sus congéneres diploides (FELIP *et al.* 1999a; FELIP *et al.* 2001b; PERUZZI *et al.* 2004). Una posible explicación a estos resultados está relacionada con el ciclo anual de reproducción. Dado que el periodo de reproducción en la lubina en el



Mediterráneo coincide con la época de invierno, cabe pensar que su menor crecimiento durante los meses de Diciembre-Marzo depende más de las temperaturas bajas que del coste energético dirigido a la reproducción (FELIP *et al.* 2001b). En consecuencia, la condición de esterilidad en la lubina no supone una ventaja para los triploides bajo estas condiciones, independientemente de que su cultivo sea separado (FELIP *et al.* 2001b) o conjunto (PERUZZI *et al.* 2004). No obstante, dado que la hembra es el sexo que mejor tasa de crecimiento presenta en esta especie (las hembras son entre 10-30% mayores en peso que los machos en el momento de la comercialización), queda por estimar la producción y el cultivo de poblaciones monosexos de lubinas todo hembras y estériles. Un análisis de su rentabilidad podría suponer una mejora para la acuicultura de esta especie, tal y como ha ocurrido con la producción de trucha arco iris en Canadá y EE.UU. (SHEEHAN *et al.* 1999).

Beneficios de la triploidía y posibilidades futuras en la lubina

Actualmente, la comercialización de la lubina se lleva a cabo como «lubina ración». Esto supone la venta de ejemplares enteros con un peso medio entre 350-450 g tras un período de engorde de 18 meses. Si bien en condiciones de cultivo experimentales el crecimiento de diploides y triploides es similar a esta edad (Tabla 3), no sucede lo mismo con el desarrollo gonadal, que es menor durante este periodo, principalmente en las hembras. Por lo tanto, la ventaja comercial de los triploides puede estar asociada al cultivo de hembras dado que éstas presentan, desde el inicio y durante toda su fase de cultivo, valores muy pequeños del índice gonadosomático (FELIP *et al.* 2001c). De hecho, observaciones en condiciones experimentales han demostrado en ejemplares de gran tamaño que las hembras triploides tienen un mayor crecimiento en peso que las diploides (FELIP, CARRILLO y ZANUJ; datos no publicados). Así pues, dado que hoy en día también se cultiva la «lubina real» (ejemplares de 800 g a 1 kg de peso medio), queda por estimar la rentabilidad que podría suponer el cultivo de individuos triploides de gran tamaño. Ensayos en esta dirección han empezado recientemente (J.C. . FALGUIÈRE y P. HAFFRAY, comunicación personal). Asimismo, faltaría por evaluar



aspectos de mercado relacionados con su venta, es decir, las formas de presentación para la venta de su carne en filetes o rodajas como ocurre con otras especies como el salmón o la trucha.

Ginogénesis

La obtención de lubinas ginogenéticas se ha conseguido mediante el uso de tratamientos con luz UV (Tabla 4). Los tratamientos que favorecen la retención del segundo corpúsculo polar son los más usados como método de diploidización para la inducción de la ginogénesis. Ésto ha dado lugar, entre otras razones, a que el tipo de ginogénesis más común sea la inducción de individuos ginogenéticos meióticos (meioginogénesis). La inducción de ginogenéticos mitóticos (mitoginogénesis: restauración de la diploidía mediante la inhibición de la primera división mitótica del huevo fertilizado) es menos frecuente y lleva asociada una mayor tasa de mortalidad (Tabla 4).

En la Tabla 4 se resumen los datos de la supervivencia de lubinas meio-ginogenéticas que representó un 17-35% respecto a la de los controles (COLOMBO *et al.* 1995; FELIP *et al.* 1999b; FRANCESCON *et al.* 2004; 2005) y hasta un máximo del 76% (PERUZZI y CHATAIN 2000). En el caso de la producción de lubinas mitoginogenéticas la supervivencia no superó el 27% (FRANCESCON *et al.* 2004). Por otro lado, la efectividad de la inducción alcanzó mayoritariamente el 100% (Tabla 4). Aunque las técnicas indirectas (i.e., citogenéticas y de morfología externa) se han usado como métodos para verificar la ginogénesis, el uso cada vez más frecuente de los marcadores moleculares en acuicultura ha permitido su práctica en los análisis de paternidad. Mediante el uso de marcadores de AFLPs (FELIP *et al.* 2000b) y de microsatélites (PERUZZI y CHATAIN 2000; FRANCESCON *et al.* 2005) es posible hoy en día la verificación y la identificación inequívoca de individuos con herencia exclusivamente materna en esta especie.

Efectos de la ginogénesis en la lubina: proporción de sexos, crecimiento y reproducción

En lotes de lubinas ginogenéticas se observó una presencia de machos comparable a la que existe en familias de lubinas diploides (FELIP *et al.* 2002), lo que hizo descartar la posibilidad de que un sistema del tipo XX/XY fuera responsable del control de sexo en esta



especie (Tabla 5). Sin embargo, en estos estudios se emplearon altas temperaturas durante la fase larvaria cuando aún no se sabía con certeza que éstas afectaban al sexo fenotípico (PIFERRER *et al.* 2005). Por tanto, los efectos de la inducción de la ginogénesis sobre la proporción de sexos en la lubina se deberían volver a examinar de nuevo incluyendo, además de este factor ambiental, su aplicación al análisis de las progenies de varias familias. Actualmente, son varias las investigaciones que intentan caracterizar y comprender los componentes genéticos, endocrinos y ambientales responsables de la determinación y diferenciación sexual de esta especie (PIFERRER *et al.* 2005).

Existen relativamente pocos trabajos que describan el crecimiento y la reproducción de peces ginogenéticos. Los resultados obtenidos hasta la fecha en la lubina han demostrado que a pesar de su mayor grado de homocigosidad el nivel de heterocigosidad que mantienen es suficiente para mantener una capacidad reproductiva comparable a la de lubinas diploides en términos de desarrollo gonadal, madurez sexual, producción de gametos y viabilidad de la descendencia (FELIP *et al.* 2002; FRANCESCO *et al.* 2005). Por otra parte, la inducción de la mitoginogénesis en la lubina mostró, como ya se había hecho en el hirame (*Paralichthys olivaceus*) (YAMAMOTO 1999) y la dorada japonesa (*Pagrus major*) (KATO *et al.* 2002; 2003), que es posible la producción de peces homocigóticos y líneas clónicas (BERTOTTO *et al.* 2005). De acuerdo con estos resultados, la tasa de homocigosidad de lubinas mitoginogenéticas varía entre 92-100%, a pesar de que la supervivencia promedio no superó el 0.07% en animales de 2 años de edad (BERTOTTO *et al.* 2005).

Beneficios de la ginogénesis y posibilidades futuras en la lubina

En la lubina, la viabilidad de individuos homocigóticos y clónicos ofrece la posibilidad de estudios de genética de esta especie con miras a una mejor producción de la misma (BERTOTTO *et al.* 2005).

3.2. Dorada

Triploidía

En la dorada la triploidía fue inducida mediante la aplicación de choques de calor (GARRIDO-RAMOS 1996; GORSHKOV *et al.* 1998; 2002).



Estos estudios demostraron que temperaturas de 34-37 °C inducen un 100% de triploidía pero sólo un 40% de supervivencia de promedio, lo que sugiere que el procedimiento puede mejorarse (Tabla 1). Para la identificación de doradas triploides, la metodología más usada ha sido la determinación del número de cromosomas, habiéndose determinado que su número diploide es $2n = 48$ cromosomas y su número triploide $3n = 72$ (GORSHKOV *et al.* 1998).

Efectos de la triploidía en la dorada: crecimiento y reproducción

La investigación para la mejora de la producción en espáridos se ha basado principalmente en: 1) la inducción de la triploidía para la producción de animales estériles y 2) la generación de híbridos inter-específicos (alotriploides) que pueden explotar el vigor híbrido y/o la esterilidad característica de muchos animales de este tipo. Ambas estrategias son potencialmente efectivas para inhibir el desarrollo reproductivo y potenciar el crecimiento, aunque ello no puede generalizarse para todas las especies estudiadas. Desafortunadamente, los datos obtenidos sobre el crecimiento, la supervivencia y el desarrollo gonadal de individuos triploides en espáridos son limitados porque los experimentos no han incluido la fase adulta del animal. Recientemente, se evaluó el potencial beneficio económico de híbridos triploides entre *Sparus aurata* y *Pagrus major* en comparación con sus correspondientes congéneres. Los resultados mostraron en primer lugar que, como ocurre en otros espáridos, la producción y el cultivo de híbridos intergenéricos diploides y triploides es factible entre la dorada y la dorada japonesa roja (GORSHKOV *et al.* 2002). Los híbridos producidos, que se cultivaron hasta alcanzar el estado adulto, exhibieron esterilidad gonadal y funcional. Sin embargo, y como ocurre también entre híbridos de salmónidos, la esterilidad en la dorada no se traduce en una ganancia en peso de estos animales (GORSHKOV *et al.* 2002).

Beneficios de la triploidía y posibilidades futuras en la dorada

Teniendo en cuenta que la producción de híbridos triploides en dorada no supone una ventaja en el crecimiento de estos animales con



respecto al de las líneas puras parentales, su aplicación a nivel comercial es cuestionable. Por otra parte, hay una falta de estudios en doradas triploides, no híbridos, para conocer el efecto de esta condición sobre el crecimiento de juveniles y adultos. En este sentido, el limitado número de trabajos en dorada sobre la manipulación cromosómica puede responder a una falta de interés por estos procedimientos dadas las características biológicas de esta especie. La dorada es una especie hermafrodita proterándrica de crecimiento rápido. Los animales destinados a producción son prácticamente todos machos puesto que esta especie se comercializa con 350-450 g y el cambio de sexo hacia hembra no se da hasta que los animales alcanzan los 600 g. Además, el esfuerzo invertido en reproducción de esta especie antes de la comercialización no es significativo por lo que, en términos generales, se puede considerar que la dorada no madura sexualmente antes de su puesta a la venta, por lo que los problemas asociados a este proceso que la triploidía puede impedir no se dan. Esto podría ser la razón por la cual la triploidía en esta especie es discutible, quedando los beneficios potenciales de la producción de triploides asociados exclusivamente a razones de prevención del impacto genético de poblaciones cultivadas sobre poblaciones naturales.

Ginogénesis

La inducción de la ginogénesis en la dorada se consiguió mediante el uso de luz UV para inactivar el DNA del espermatozoide y de choques térmicos de calor para impedir la extrusión del segundo corpúsculo polar y restaurar así la diploidía en el nuevo cigoto (Tabla 4) (GORSHKOV *et al.* 1998). Sin embargo, actualmente no hay datos disponibles del efecto que esta manipulación tiene sobre la proporción de sexos, el crecimiento o la reproducción. Por lo tanto, se desconocen los posibles beneficios que la inducción de la ginogénesis pudiera ofrecer en esta especie.

4. PLEURONECTIFORMES

En especies como el lenguado de Florida (*Paralichthys lethostigma*) (LUCKENBACH *et al.* 2004), el rodaballo (IMSLAND 1999; IMSLAND y JONASSEN 2001; IMSLAND *et al.* 1997; CAL *et al.* 2006a), o el fletán (JAKUPSSSTOVU y HAUG 1988; HAUG 1990; BJÖRNSSON 1995; HOLMEFJORD y REFSTIE 1997) las



hembras crecen más que los machos y esta diferencia, que aumenta con la edad, contribuye a incrementar las diferencias de peso entre individuos que de por sí se dan en las unidades de cultivo, lo que obliga a realizar una serie de desdoblamientos que implican mano de obra y un mayor manejo de los animales. Además la maduración sexual sobreviene en machos y en parte de las hembras antes de alcanzar el tamaño comercial, lo que obliga a sacrificar a los animales a un peso menor del óptimo para evitar la ralentización de crecimiento y las mortalidades asociadas a la maduración sexual.

Las técnicas de manipulación cromosómica en peces marinos comenzaron a desarrollarse en peces planos en la década de los 70. PURDOM (1972) indujo la triploidía y la ginogénesis en la platija (*Pleuronectes platessa*) y en sus híbridos (*Pleuronectes platessa* x *Platichthys flesus*) con fines experimentales. Durante los años 80 y 90, principalmente en Japón, la triploidía y la ginogénesis se experimentaron en diversas especies de *Paralichthys* (TABATA *et al.* 1986; YAMAMOTO 1992; TABATA y GORIE 1988; KIM *et al.* 1993; MANNING y CRIM 2000; MANNING y BURTON 2003; LUCKENBACH *et al.* 2004), y actualmente para muchas de ellas y sus híbridos se usa en su producción industrial. Actualmente estas técnicas están en fase de desarrollo en Europa en especies de interés comercial como el lenguado (*S. solea* y *S. senegalensis*), el rodaballo y el fletán.

4.1. Rodaballo

Triploidía

La inducción de la triploidía en el rodaballo se desarrolló con el fin de generar poblaciones estériles para evitar los inconvenientes asociados a la maduración sexual. Las técnicas de manipulación cromosómica son muy exigentes con la calidad de los gametos. En el cultivo intensivo del rodaballo la maduración sexual se induce manipulando el fotoperiodo (FORÉS *et al.* 1988), y los gametos se obtienen de cada individuo por masaje abdominal. La fertilización es artificial por lo que la selección y manipulación de gametos forma parte de las técnicas habituales en el cultivo de esta especie. El hecho de que el rodaballo no ponga de forma espontánea facilita en cierto modo la aplicación de técnicas de manipulación cromosómica en esta especie.



La triploidía en el rodaballo se puede inducir aplicando choques térmicos o de presión a huevos recién fertilizados. VÁZQUEZ *et al.* (1998) y PIFERRER *et al.* (2000; 2003) desarrollaron el método para inducir la triploidía en el rodaballo cultivado entre 13-14 °C, aplicando choques térmicos próximos a 0 °C para evitar la extrusión del segundo corpúsculo polar (Tabla 1). Los choques fríos han sido utilizados con el mismo fin en otras especies como la platija (PURDOM 1972), el lenguado (HOWELL *et al.* 1995), fletán (HOLMEFJORD y REFSTIE 1997), hirame o falso fletán de Japón (*Paralichthys olivaceus*) (YAMAMOTO 1999; YOU *et al.* 2001) y lenguado de Florida (LUCKEMBACH *et al.* 2004).

En el rodaballo cultivado a 13-14 °C, la mejor combinación para inducir la triploidía a gran escala (volúmenes de ~300 ml de huevos), es aplicar un choque frío a los 6,5 min después de la fertilización, durante 25 min, manteniendo la temperatura entre -1 y 0 °C. Con este método se puede obtener sistemáticamente tasas de triploidía del 95-100%, con tasas de supervivencia del 60% respecto a los controles (PIFERRER *et al.* 2000, 2003). Temperaturas por encima de 0 °C, especialmente durante los primeros 5 minutos después de la fertilización, reducen la tasa de triploidía, y por debajo disminuyen la tasa de supervivencia. La aplicación de choques calientes, entre 25-31 °C induce la triploidía pero las supervivencias son muy bajas (VÁZQUEZ *et al.* 1998). El momento de la aplicación del choque y la temperatura son similares a las utilizadas con otros peces planos marinos, pero la duración del choque es más corta que la de otras especies como la platija o el fletán, cultivados a temperaturas más bajas.

La supervivencia de los grupos tratados después de la eclosión no fue significativamente distinta de la supervivencia observada respecto a controles apropiados (PIFERRER *et al.* 2000, 2003). Esto sugiere que la menor supervivencia es más debida a un efecto mecánico de la manipulación de grandes cantidades de huevos que a la propia triploidía en sí. En la inducción de la triploidía en especies marinas como el rodaballo, de elevada fecundidad, la mortalidad en la eclosión es relativamente poco relevante, por lo que en la aplicación de esta técnica es prioritario conseguir altas tasas de triploidía.

La inducción de la triploidía no es una técnica infalible y su éxito ha de ser determinado lo antes posible cada vez que se realice. La eva-



luación de la ploidía en el rodaballo, se puede realizar por citometría de flujo (VÁZQUEZ *et al.* 1996) análisis cariológico (PIFERRER *et al.* 2000), cuantificando el número de nucleolos por núcleo (NORs) (PIFERRER *et al.* 2000), y determinando el tamaño de la longitud del eje mayor de los eritrocitos de la sangre (PIFERRER *et al.* 2003) (Tabla 2). De los cuatro métodos mencionados, los dos últimos son los más adecuados para su aplicación en sistemas de cultivo intensivo, por ser altamente eficaces, fáciles de realizar y no requerir material específico costoso, descartándose la citometría de flujo, que sí lo requiere, y la cuantificación del número de cromosomas por su laboriosidad.

El análisis del número de nucleolos por núcleo (NOR) es una técnica barata y fácil de realizar que se ha utilizado en la determinación del nivel de ploidía en embriones y en larvas en muchas especies de peces (PHILLIPS *et al.* 1989; FELIP *et al.* 1997; PIFERRER *et al.* 2000). En el rodaballo, debido a un polimorfismo en el número de NOR en un pequeño porcentaje de individuos, el método tiene un error menor del 5% (PIFERRER *et al.* 2000), lo que no lo invalida para determinar la ploidía en el rodaballo. Sin embargo, para animales mayores lo más práctico es la determinación de la ploidía mediante el análisis de los tamaños de los eritrocitos. En el rodaballo las muestras de sangre se obtuvieron fácilmente del arco branquial, sin necesidad de anestesiarse al pez. Este método es un sistema de determinación del nivel de ploidía muy rápido y barato, que permite analizar muchas muestras en poco tiempo y sin necesidad de sacrificar a los peces (PIFERRER *et al.* 2003).

Efectos de la triploidía en el rodaballo: crecimiento y reproducción

La triploidía en el rodaballo produce importantes cambios en la reproducción, el crecimiento después de la maduración sexual, la proporción de sexos, y la hematología. En los machos triploides los testículos son de forma semejante a los de los diploides aunque de menor tamaño pero el proceso de maduración sexual se desarrolla con marcadas diferencias. La meiosis no se interrumpe y se desarrolla actividad espermatogénica aunque con un ciclo de retraso. Así, en estudios histológicos hasta los dos años de edad se observa el desarrollo de la espermatogénesis hasta la formación de espermátidas, pero no se observan espermatozoides



(TERRONES 2002), que sin embargo pueden aparecer en machos de tres años aunque en muy baja frecuencia (CUÑADO *et al.* 2002). En ningún caso se ha podido extraer esperma de animales vivos, por eso aunque la esterilidad no sea completa, no hay duda de su nula capacidad reproductora (CAL *et al.* 2006a). En triploides de *Limanda ferruginea*, los machos también producen espermatozoides pero en muy baja cantidad con poca o ninguna movilidad y muy pobre fertilidad (MANNING *et al.* 2004), mientras que las platijas triploides producen espermatozoides móviles y moderadamente fértiles (LINCOLN 1981a).

En las hembras la triploidía provoca un bloqueo de la meiosis, la esterilidad es gonadal, los ovarios no se desarrollan apareciendo muy pequeños y de aspecto rudimentario y los oocitos no evolucionan más allá de estado previtelogénico (CAL *et al.* 2006a). En los triploides de *Limanda ferruginea* algunas hembras llegan a madurar, aunque más tarde que las diploides (MANNING *et al.* 2004).

Los rodaballos triploides juveniles (hasta la primera maduración sexual) no se distinguen morfológicamente de sus homólogos diploides (FERNÁNDEZ-PATO *et al.* 1998; CAL *et al.* 2006a) (Tabla 3) pero –como sucede en otras muchas especies– la maduración sexual marca un antes y un después en el modo de crecimiento. A partir de la primera maduración sexual, la tasa de crecimiento de los peces diploides está regulada por los ciclos anuales de reproducción, con incrementos rápidos de peso antes de las puestas debidos a un gran aumento del peso de sus gónadas, seguido de pérdidas de lo ganado tras las mismas, siendo este efecto más acusado en las hembras. En cambio en los triploides, debido a su esterilidad, el crecimiento es prácticamente regular y continuado (CAL *et al.* 2006a). Resultados similares se obtuvieron en la platija (LINCOLN 1981b), y en los primeros estadios de desarrollo de *Paralichthys olivaceus* (TABATA y GORIE 1988; YOU *et al.* 2001).

La triploidía afecta a la proporción de sexos en el rodaballo, produciendo un aumento del número de hembras. Descartada por poco probable una distinta mortalidad entre sexos en estadios tempranos, la causa más probable de este fenómeno quizá sea la doble dotación genómica materna (BENFEY 1999), debido a que la progenie triploide recibe dos juegos de cromosomas de la madre y uno del padre, lo que podría afectar al mecanismo de determinación sexual.



En relación a la hematología, los eritrocitos en los rodaballos triploides son de mayor tamaño que los de los diploides. Además, son de forma elipsoidal y presentan mayor frecuencia de anomalías como la segmentación nuclear o la presencia de micronúcleos. Paralelamente al aumento de volumen de los eritrocitos, los rodaballos triploides muestran respecto a los diploides una reducción de su número, lo que se traduce en un valor de hematocrito menor (CAL *et al.* 2005). Por otro lado, los niveles de concentración de hemoglobina son más bajos que en los diploides. Los rodaballos triploides toleran peor los bajos niveles de oxígeno, demostrando menor capacidad de resistencia a condiciones de hipoxia aguda que los diploides quizás como resultado de una menor capacidad de utilización del oxígeno a bajas concentraciones (CAL *et al.* 2005). La mortalidad observada en situaciones de hipoxia aguda quizás sea sólo el reflejo de una situación llevada al extremo de un problema habitual en el cultivo intensivo. Esto, aunque pueda no ser un obstáculo para el cultivo de rodaballos triploides, sí puede esconder el menor bienestar de estos peces y repercutir en el rendimiento del cultivo.

Los rodaballos triploides también tienen menor número de leucocitos que los diploides, pero con una más alta actividad celular. La respuesta innata humoral y celular de los triploides no parece estar afectada, lo que sugiere que los triploides deberían tener una resistencia a las enfermedades similar a la de los triploides (BUDIÑO *et al.* 2006).

La triploidía en sistemas de producción

La inducción de la triploidía se presenta como una técnica fácil de aplicar en los sistemas de producción, ya que no requiere de instalaciones especiales. Las hembras predominan en los rodaballos triploides, y además son estériles, por lo que se combina la ventaja de tener hembras, que crecen más que los machos, y de no sufrir los efectos asociados a la maduración. Estos dos factores provocan una reducción de la dispersión de tamaños, eliminando la necesidad de desdoblamientos asociados muchas veces con problemas sanitarios, y producen un incremento de biomasa. La esterilidad presupone que los peces mantengan una calidad de las partes comestibles constante y facilitaría que se puedan comercializar en cualquier época del año, no



produciéndose mortalidades asociadas a los periodos de reproducción, y eliminando los riesgos de escapes en individuos cultivados en jaulas. Así pues, la inducción de la triploidía se presenta como una alternativa muy interesante para la producción de rodaballos de 2 o más kilos de peso en cultivo intensivo y en jaulas.

Ginogénesis

Se utilizó la ginogénesis en el rodaballo para identificar el mecanismo de determinación del sexo y con el fin de estudiar la posibilidad de producir poblaciones todo hembras. Además, se utilizaron rodaballos ginogenéticos para la construcción del mapa genético de ligamiento de esta especie (BOUZA *et al.* 2007).

Inducción

La ginogénesis en el rodaballo se puede inducir activando el huevo con espermatozoides de rodaballo (fertilización homóloga) cuyo ADN ha sido previamente inactivado con luz UV (VÁZQUEZ *et al.* 2002; CAL *et al.* 2002; PIFERRER *et al.* 2004), o con espermatozoides de fletán (fertilización heteróloga) (BAYNES *et al.* 2004). En ambos casos se desencadena el desarrollo del embrión haploide con herencia exclusivamente materna (Tabla 4). La utilización de espermatozoides heterólogos evita el riesgo de transmisión paterna de ADN que no haya sido totalmente inactivado con la radiación y facilita las operaciones en especies oligospermicas (como el rodaballo) o en las que la extracción del espermatozoides es complicada.

En el rodaballo, el efecto de la radiación UV sobre el espermatozoides aumenta con la dosis aunque varía mucho según el macho utilizado, independientemente de su espermatozoides, de la dilución utilizada, e incluso de la movilidad de los espermatozoides tras la irradiación (PIFERRER *et al.* 2004). Ésto trae como consecuencia que con la misma dosis de radiación el espermatozoides es capaz de activar el huevo y desencadenar el desarrollo de embriones haploides (1n) con su síndrome característico, mientras que en otros casos fracasa y el huevo no se desarrolla, lo que implica una gran variabilidad en los resultados. A veces, los haploides sobreviven hasta los últimos estadios del desarrollo embrionario aunque normalmente no eclosionan y cuando lo hacen no sobreviven nunca más allá de las 24 horas siguientes. Para que los embriones



sean viables, la diploidía se restablece aplicando un choque térmico al huevo recién fertilizado, de forma semejante al utilizado en esta especie para inducir la triploidía (VÁZQUEZ *et al.* 2002; CAL *et al.* 2002; PIFERRER *et al.* 2004; BAYNES *et al.* 2004) (Tabla 1).

La confirmación de la condición ginogenética en el rodaballo se realizó mediante el uso de marcadores moleculares del tipo micro-satélites (Tabla 2). Al conocerse ambos padres utilizados en el cruzamiento, normalmente es suficiente analizar sólo dos loci diagnóstico cuidadosamente seleccionados en el descendiente para confirmar la herencia exclusivamente materna. CASTRO *et al.* (2003) utilizaron loci microsatélites altamente variables identificados previamente en varias poblaciones (COUGHLAN *et al.* 1996; ESTOUP *et al.* 1998; BOUZA *et al.* 2002). Esta variabilidad genética permite un alto nivel de confianza en las asignaciones de paternidad. El empleo de marcadores tipo microsatélites es una técnica muy fiable que además evita tener que sacrificar a los animales, ya que para el análisis se utiliza un trozo pequeño de la aleta caudal para la obtención de DNA.

Efectos de la ginogénesis en el rodaballo: proporción de sexos, crecimiento y reproducción

La inducción de la ginogénesis en el rodaballo produce importantes consecuencias tales como una menor tasa de eclosión y de supervivencia durante el primer año (VÁZQUEZ *et al.* 2002; CAL *et al.* 2002; PIFERRER *et al.* 2004; BAYNES *et al.* 2004), sin embargo, a partir de entonces y hasta los 3 años es semejante a la del control (CAL *et al.* 2006b). Probablemente la causa de la alta mortalidad que se produce en los primeros estadios del desarrollo se deba en parte a la manipulación y a los tratamientos que se aplican dada la fragilidad larvaria de esta especie (PLANAS y CUNHA 1999), y en parte a la expresión de alelos recesivos deletéreos como consecuencia de la mayor homocigosidad (IHSEN *et al.* 1990; LEARY *et al.* 1985).

A pesar de su baja supervivencia inicial, los rodaballos ginogenéticos muestran un desarrollo normal, crecen con una tasa de crecimiento ligeramente inferior al control, y en ambos sexos -aunque maduran más tarde respecto a los diploides controles- producen gametos fértiles capaces de producir embriones y desarrollarse hasta larvas norma-



les (CAL *et al.* 2006b) (Tabla 5). La proporción de sexos en las progenies ginogenéticas puede dar información relevante sobre el mecanismo de determinación sexual (TABATA 1991; YAMAMOTO 1999). En el rodaballo en dos experimentos independientes de inducción de la ginogénesis, se obtuvieron grupos de ginogenéticos diploides con un 75% o 100% de hembras (CAL *et al.* 2006b).

Considerando que en la inducción de la ginogénesis en especies con hembras homogaméticas no es rara la aparición de una pequeña proporción de machos (revisado en FELIP *et al.* 2001a), y que una progenie del 100% de hembras ginogenéticas sólo se puede obtener si el mecanismo de determinación sexual es del tipo XX hembras / XY machos, parece razonable deducir que, como ya se ha demostrado en otros peces planos, lo más probable es que en el rodaballo las hembras sean también el sexo homogamético. No obstante todo indica que además otros genes autosomales menores pueden estar implicados la determinación sexual del rodaballo. En experimentos similares, otros investigadores concluyen sin embargo que en el rodaballo los machos pueden ser el sexo homogamético (HAFFRAY *et al.* 2006). Igualmente, BAYNES *et al.* (2004) en experimentos parecidos obtuvieron un 30% de machos, por lo que ponen en duda que el mecanismo de determinación sexual sea del tipo XX/XY, y apuntan también la posibilidad de que sea del tipo WZ/ZZ o que haya una influencia importante de la temperatura, por lo que sería deseable verificar cual es el mecanismo de determinación sexual del rodaballo.

La ginogénesis en los sistemas de producción

Igual que ocurre con las demás especies, los rodaballos ginogenéticos diploides, aún siendo todas hembras, no son aptos para los sistemas de producción debido a su baja viabilidad. Actualmente se está considerando la posibilidad de masculinizar las hembras ginogenéticas para crear neomachos, y utilizarlas como dadores de esperma para fecundar hembras normales. Esto es interesante como punto de partida en la producción de lotes de rodaballos todo hembras. La producción de un lote pequeño de reproductores (neomachos) así producidos sería suficiente, ya que a partir de ellos los siguientes neomachos se podrían obtener simplemente masculinizando un pequeño porcentaje



de cada progenie que se supone sería todo o casi todo hembras. La inducción de la ginogénesis en el rodaballo tiene, además, otras aplicaciones interesantes como son la producción de líneas endogámicas y la explotación de heterosis a través de cruzamientos entre razas.

4.2. Lenguado

En el lenguado común (*Solea solea*), la aplicación de las técnicas de manipulación cromosómica presenta el inconveniente de la gran dificultad para la obtención de gametos en cantidad y sobre todo de calidad.

Triploidía

No se tiene el conocimiento de experimentos encaminados a obtener ejemplares triploides de lenguado común. Éstos presentarían la ventaja de su esterilidad en peces en producción y también la posibilidad de utilizarlos en programas de repoblación en el medio natural, ya que al ser estériles quizás se eliminarían las migraciones asociadas con la reproducción, lo que permitiría reducir el área de dispersión a partir del lugar de liberación (HOWELL *et al.* 1995).

Ginogénesis

El desarrollo de la ginogénesis en el lenguado común fue abordada por HOWELL *et al.* (1995) con el fin de estudiar el mecanismo de determinación genética del sexo. Los huevos de lenguado se obtuvieron de hembras salvajes sacrificadas y se activaron con esperma de fletanes mantenidos en cautividad debido al pequeño volumen de esperma de los machos de lenguado. La diploidía se restableció aplicando choques fríos a 2 °C, durante 120 min, a los 10 min después de la fertilización (Tabla 4). Con este tratamiento se obtuvieron tasas de supervivencia hasta la eclosión de un 23% . Los choques de presión ensayados fueron letales para los embriones (HOWELL *et al.* 1995). La determinación de la condición de ginogenético se hizo en base a la morfología externa (síndrome haploide) de los embriones tratados.

En el estudio de HOWELL *et al.* (1995), en la progenie ginogenética ($n = 15$) estaban representados ambos sexos, (60% machos: 40%



hembras), indicando que el sexo en esta especie no está determinado por un sistema simple XX-XY (Tabla 5). No obstante se necesitan más estudios para establecer proporciones de sexos más precisas en muestras de mayor tamaño y descartar la presencia de genes autosomales menores y/o un efecto ambiental como la temperatura en la proporción final de sexos.

Recientemente, se ha inducido la ginogénesis en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Para ello se ha usado un protocolo de inducción parecido al usado en el rodaballo (PIFERRER *et al.* 2004). La condición ginogenética se ha verificado mediante el uso de microsatélites desarrollados para esta especie (NAVAS, J. I., DE LA HERRÁN, R., ROBLES, F., HAMMAN-KHALIFA, A. M., HERRERA, M., HACHERO, I., MORA, M. J., RUIZ REJÓN, C., GARRIDO-RAMOS, M. A., RUIZ REJÓN, M., comunicación personal). Actualmente, se está a la espera de que estos lenguados ginogenéticos sean lo suficientemente grandes para sexarlos y determinar la proporción de sexos y así poder inferir el mecanismo de determinación sexual.

4.3. Fletán

Triploidía

En el fletán las hembras crecen también más que los machos, que alcanzan la madurez sexual antes de llegar al tamaño óptimo para su comercialización y a tamaños muy diferentes en los machos y en las hembras (JAKUPSSTOVU y HAUG 1988; HAUG 1990; BJÖRNSSON 1995). Esta particularidad explica el interés de los productores en producir lotes de peces que sean todo hembras y que no maduren sexualmente o que lo hagan más tarde.

En el fletán, la inducción de la triploidía para obtener individuos estériles se llevó a cabo mediante la aplicación de choque térmicos fríos. Los choques calientes produjeron tasas de triploidía semejantes pero con supervivencias muy bajas (HOLMERFJORD y REFSTIE 1997) (Tabla 1). La confirmación de la triploidía se realizó por cuantificación de la cantidad de DNA por célula mediante el método de citometría de flujo (HOLMERFJORD y REFSTIE 1997). No se han descrito todavía resultados respecto a la proporción de sexos en la progenie, ni tampoco acerca de su crecimiento o de su reproducción.



Ginogénesis

La inducción de ginogénesis en el fletán se realizó activando el huevo con espermatozoides homólogos irradiados con luz UV y la diploidía se restableció aplicando un choque de presión de 58.6 MPa, durante 5 min, 15 min después de haber sido activados (BROWN *et al.* 1997; TVEDT *et al.* 2006) (Tabla 4). La determinación de la haploidía en larvas y embriones se realizó visualmente (síndrome haploide) y se confirmó por citometría de flujo (Tabla 2). La determinación de la herencia uniparental materna se confirmó por análisis con microsatélites (MCGOWAN y REITH 1999) como en otras especies de pleuronectiformes (LUCKEMBACH *et al.* 2004; PIFERRER *et al.* 2004).

La supervivencia de los ginogénéticos diploides de fletán generados por este método es muy baja, como en todas las especies de peces planos descritas (e.g., TABATA 1991; KIM *et al.* 1999; HOWELL *et al.* 1995, LUCKENBACH *et al.* 2004; PIFERRER *et al.* 2004), lo que descarta la idea de utilizar esta técnica como método directo para producir grupos de peces todo hembras. Sin embargo, la presencia de 100% de hembras en la progenie ginogenética (TVEDT *et al.* 2006) confirma que las hembras son el sexo homogamético, lo que permite la producción de lotes de reproductores neomachos usando el método descrito por HENDRY *et al.* (2003) para utilizarlos luego como donadores de espermatozoides y obtener así progenies todo hembras.

5. CONCLUSIONES

De la precedente exposición del estado actual de las técnicas de manipulación de juegos enteros de cromosomas para la inducción de la triploidía y ginogénesis en varias especies de salmoniformes, perciformes y pleuronectiformes de interés en acuicultura, pueden extraerse algunas conclusiones generales, entre las que, a nuestro juicio, cabría destacar las siguientes:

Las técnicas de inducción a la triploidía y ginogénesis están disponibles y esencialmente optimizadas para un considerable número de especies de interés comercial. Se considera que, en general, actualmente el desarrollo de estas técnicas a nuevas especies no representa un gran reto. Sin embargo, no hay que olvidar que pequeños cam-



bios en las condiciones de inducción pueden resultar en grandes cambios en los resultados obtenidos en términos de porcentaje de individuos deseados y supervivencia, lo que puede conllevar la necesidad de realizar pruebas para adaptar estas técnicas a las nuevas especies.

La inducción a la triploidía y ginogénesis implica un incremento de la mortalidad durante las primeras fases de desarrollo, antes de que se hayan invertido recursos y alimento en los animales, por lo que dicha mortalidad debe ser evaluada en función de los beneficios luego esperados mediante la producción de este tipo de animales.

Para su aplicación a la acuicultura, las técnicas de manipulación cromosómica deben ser adaptadas de forma que permitan el manejo de un volumen importante de gametos, acorde con los volúmenes empleados en producción. Ello precisaría un mayor acercamiento y colaboración entre la comunidad científica y el sector privado, con miras a evaluar no sólo los beneficios potenciales de la triploidía, sino también a fomentar planes educativos y de información de cara al consumidor.

En este sentido, si bien se ha demostrado repetidamente que la inducción a la triploidía sirve, efectivamente, para producir peces estériles que no sufren los problemas derivados de la maduración sexual, el sector privado ha mostrado intereses contrapuestos, dependientes de la época y el país, a la hora de aplicar esta técnica. Así, la inducción a la triploidía se desarrolló en los salmónidos en los años 80, lo que permitió su implantación como una técnica normal en la producción de ciertas especies. Sin embargo, para otras especies en las que estas técnicas han sido desarrolladas más tarde, coincidiendo con una mayor disponibilidad de información científica sobre el rendimiento de los triploides, se ha detectado un menor entusiasmo por parte del sector privado por su aplicación. Ello puede ser debido a dos causas fundamentales.

La primera, derivada del no cumplimiento en muchos casos de un mayor crecimiento de los triploides respecto a los diploides en *cualquier* circunstancia, falsa expectativa por otro lado demasiadas veces difundida por personas no bien informadas. Es preciso insistir una vez más sobre el hecho de que no es que los triploides crezcan más



que los diploides, sino que siguen creciendo normalmente cuando los diploides lo dejan de hacer debido a su maduración sexual. La segunda causa podría ser la preocupación del sector privado de que los consumidores puedan asociar estas manipulaciones cromosómicas con lo que en términos legales se entiende por manipulaciones genéticas. Aquí también es preciso insistir en que si bien académicamente se puede, de hecho, considerar estas manipulaciones cromosómicas como manipulaciones genéticas, lo cierto es que según la normativa vigente a nivel europeo no tienen la consideración de tales, puesto que dicha normativa considera manipulaciones genéticas sólo a las aplicadas para la obtención de animales transgénicos. No hay que olvidar que las poliploidías naturales o inducidas son muy comunes en muchas especies vegetales de las que se obtiene alimentos habituales de gran consumo tales como frutas y cereales, y ya sea por desconocimiento, habituación o una combinación de ambos, no se cuestiona su consumo por su condición de poliploides. A pesar de ello, es factible pensar que en un futuro no muy lejano la producción masiva de triploides será una opción seriamente contemplada por las empresas, especialmente si se diversifica la producción hacia peces de mayor tamaño.

Por otro lado, a pesar de las claras ventajas de los cultivos monosexo, es cierto que la obtención de poblaciones formadas sólo por hembras mediante la combinación de la ginogénesis con la terapia endocrina es un proceso que requiere una cierta inversión en tiempo y espacio, lo que podría explicar la poca implantación de esta técnica en la producción. Esto puede cambiar el día en que se disponga de métodos basados en secuencias de DNA para el diagnóstico del sexo genotípico de los peces sin necesidad de su sacrificio. Ello permitirá la creación y selección de neomachos en la misma generación sin necesidad de recurrir a la ginogénesis.

Finalmente, cabe señalar que, a parte de las innegables ventajas de los cultivos de peces que no pueden madurar sexualmente o de lotes formados sólo por el sexo de mayor crecimiento, la generalización del uso de animales estériles mediante su inducción de la triploidía se presenta como una interesante alternativa para evitar el impacto genético de las poblaciones cultivadas sobre las salvajes.



BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS y J.D. WATSON, 1989 *Molecular Biology of the Cell* (2.^a ed.). Garland Publishing, Nueva York.
- ARAI, K., 1988 Viability of allotriploids in salmonids. Nipp. Suisan Gakk. **54**: 1695-1701.
- ARAI, K., 2000 Chromosome Manipulation in Aquaculture: Recent Progress and Perspective. Suisanzoshoku (Jap. Aquacult. Soc.) **48**: 295-303.
- ARAI, K., 2001 Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture **197**: 205-228.
- BAROILLER, J. F., Y. GUIGUEN y A. FOSTIER, 1999 Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. Cell. Mol. Life Sci. **55**: 910-931.
- BAYNES, S.M., R.B. HOWELL y V. HUGHES, 2004 Sex determination in Marine Flatfish. Spec. Publ. Eur. Aquac. Soc. **34**: 148-149.
- BENFEY, T. J., 1999 The physiology and behavior of triploid fishes. Rev. Fish. Sci. **7**: 39-67.
- BENFEY, T. J., y A. M. SUTTERLIN, 1984a Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture **36**: 359-367.
- BENFEY, T.J., y A. M. SUTTERLIN, 1984b Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. **41**: 1387-1392.
- BENFEY, T.J., y E.M. DONALDSON, 1987 Current status of induced sex manipulation, pp. 108-119 en *Reproductive Physiology of Fish*, edited by D.R. Idler, L.W. Crim, J.M. Walsh. Univ. Newfoundland.
- BENFEY, T.J., P. G. BOSA, N. L. RICHARDSON y E. M. DONALDSON, 1988 Effectiveness of a commercial-scale pressure shocking device for producing triploid salmonids. Aquacult. Engineer. **7**: 147-154.
- BENFEY, T. J., H. M. DYE, I. I. SOLAR y E. M. DONALDSON, 1989 The growth and reproductive endocrinology of adult triploid Pacific salmonids. Fish Physiol. Biochem. **6**: 113-120.
- BERTOTTO, D., F. CEPOLLARO, A. LIBERTINI, A. BARBARO, A. FRANCESCON, P. BELVEDERE, J. BARBARO y L. COLOMBO, 2005 Production of clonal founders in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., by mitotic gynogenesis. Aquaculture **246**: 115-124.
- BEUKEBOOM, L. W., y R. C. VRIJENHOEK, 1998 Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis. J. Evol. Biol. **11**: 755-782.



- BILLARD, R., 1984 La conservation des gamètes et l'insémination artificielle chez le bar et la daurade, pp. 95-116 en *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*, editado por G. Barnabé y R. Billard. INRA Publ., París.
- BJÖRNSSON, B., 1995 The growth pattern and sexual maturation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared in large tanks for 3 years. *Aquaculture* **138**: 281-290.
- BOUZA, C., L. SÁNCHEZ y P. MARTÍNEZ, 1994 Karyotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional, fluorochrome and restriction endonuclease-banding techniques. *Mar. Biol.* **120**: 609-613.
- BOUZA, C., P. PRESA, J. CASTRO, L. SÁNCHEZ y P. MARTÍNEZ, 2002 Allozyme and microsatellite diversity in natural and domestic populations of turbot (*Scophthalmus maximus*) in comparison with other Pleuronectiformes. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* **59**: 1-14.
- BOUZA, C., M. HERMIDA, B. G. PARDO, C. FERNÁNDEZ, G. G. FORTES, J. CASTRO, L. SÁNCHEZ, P. PRESA, M. PÉREZ, A. SANJUAN, A. DE CARLOS, J. A. ÁLVAREZ-DIOS, S. EZCURRAZ, R. M. CAL, F. PIFERRER y P. MARTÍNEZ, 2007 A microsatellite genetic map of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics* (enviado para publicación).
- BRANTLEY, R. K., J. C. WINGFIELD y A. H. BASS, 1993 Sex steroid levels in *Porichthys notatus*, a fish with alternative reproductive tactics and a review of the hormonal bases for male dimorphism among teleost fishes. *Horm. Behav.* **27**: 332-347.
- BROWN, N.P., R. JOHNSTONE, R. J. SHIELDS y N. R. BROMAGE, 1997 Induction of triploidy using hydrostatic pressure shocks in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Proc. Sixth Int. Symp. Genetics Aquacult.*, B. McAndrew y D. Penman (eds.). Univ. Stirling, UK.
- BUDIÑO, B., R. M. CAL, C. PIAZON y J. LAMAS, 2006 The activity of several components of the innate immune system in diploid and triploid turbot. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **145**: 108-113.
- BULL, J.J., 1983 *Evolution of sex determining mechanisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, CA.
- CAL, R.M., C. GÓMEZ, J. CASTRO, C. BOUZA, P. MARTÍNEZ y F. PIFERRER, 2002 Production of haploid and diploid gynogenetic turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Spec. Publ. Eur. Aquacult. Soc.* **32**: 179-180.
- CAL, R.M., S. VIDAL, T. CAMACHO, F. PIFERRER y F. J. GUITIÁN, 2005 Effects of triploidy on turbot haematology. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **141**: 35-41.
- CAL, R.M., S. VIDAL, C. GÓMEZ, B. ÁLVAREZ-BLAZQUEZ, P. MARTÍNEZ y F. PIFERRER, 2006a Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* **251**: 99-108.



- CAL, R.M., S. VIDAL, P. MARTÍNEZ, B. ÁLVAREZ- BLÁZQUEZ, C. GÓMEZ y F. PIFERRER, 2006b Growth and gonadal development of gynogenetic diploid turbot (*Scophthalmus maximus*). J. Fish Biol. **68**: 401-413.
- CARRASCO, L., S. DOROSHOV, D.J. PENMAN y N. BROMAGE, 1998 Long-term, quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Reprod. Fertil. **113**: 197-210.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, F. PRAT, J. CERDÁ, J. RAMOS, E. MAÑANÓS y N. BROMAGE, 1995a Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), pp. 138-168 en *Broodstock management and egg and larval quality*, editado por N.R. Bromage y R. J. Roberts. Blackwell Science, Oxford.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, M. BLÁZQUEZ, J. RAMOS, F. PIFERRER y E. M. DONALDSON, 1995b Sex control and ploidy manipulation in sea bass, pp. 125-143 en *OECD Documents, Environmental Impacts of Aquatic Biotechnology*. OECD, París.
- CARRILLO, M., J. BAYARRI y S. ZANUY, 2007 El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control de los ciclos sexuales y de la pubertad en la lubina en *La Reproducción de los peces: Aspectos básicos y su aplicación en Acuicultura* editado por M. Carrillo, Observatorio Español de Acuicultura, Madrid.
- CASTRO, J., C. BOUZA, L. SÁNCHEZ, R. M. CAL, F. PIFERRER y P. MARTÍNEZ, 2003 Gynogenesis assessment by using microsatellite genetic markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). Mar. Biotechnol. **5**: 584-592.
- CHISTIAKOV, D. A., B. HELLEMANS, C. S. HALEY, A. S. LAW, C. S. TSIGENOPOULOS, G. KOTOLAAS, D. BERTOTTO, A. LIBERTINI y F.A.M. VOLCKAERT, 2005 A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Genetics **170**: 1821-1826.
- CHOURROUT, D., 1982 La gynogenèse chez les vertébrés. Reprod. Nutr. Dévelop. **22**: 713-734.
- CHOURROUT, D., 1988 Induction of gynogenesis, triploidy and tetraploidy in fish. ISI Atlas of Science. An. Plant Sci., pp. 65-70.
- CHOURROUT, D., y E. QUILLET, 1982 Induced gynogenesis in the rainbow trout: sex and survival of progenies. Production of all-triploid populations. Theor. Appl. Genet. **63**: 201-205.
- COLOMBO, L., A. BARBARO, A. LIBERTINI, P. BENEDETTI, A. FRANCESCON e I. LOMBARDO, 1995 Artificial fertilization and induction of triploidy and meiogynogenesis in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. J. Appl. Ichthyol. **11**: 118-125.
- COLOMBO, L., A. BARBARO, A. FRANCESCON, A. LIBERTINI, M. BORTOLUSSI, F. ARGENTON, L. DALLA VALLE, S. VIANELLO y P. BELVEDERE, 1997 Towards an integration between



- chromosome set manipulation, intergeneric hybridization and gene transfer in marine fish culture. *Cah. Opt. Méditerran.* **34**: 77-122.
- COUGHLAN, J., E. MCCARTHEY, D. MC GREGOR, P. O'DONOGHUE, P. GALVIN, R., R. FITZGERALD, E. DAEMEN, A. IMSLAND, S. STEFASSON y T. CROSS, 1996. Four polymorphic microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Anim. Genet.* **27**: 433-442.
- CUÑADO, N., J. TERRONES, L. SÁNCHEZ, P. MARTÍNEZ y J. L. SANTOS, 2002 Sex-dependent synaptic behaviour in triploid turbot, (*Scophthalmus maximus*) (Pisces, Scophthalmidae). *Heredity* **89**: 460-464.
- DEVLIN, R. H, e Y. NAGAHAMA, 2002 Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* **208**: 191-364.
- DON, J., y R. R. AVTALION, 1988 Production of F₁ and F₂ diploid gynogenetic tilapias and analysis of the «Hertwig curve» obtained using ultraviolet irradiated sperm. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 253-259.
- DONALDSON, E. M., R. H. DEVLIN, I. I. SOLAR y F. PIFERRER, 1993 The reproductive containment of genetically altered salmonids, pp. 113-129 en *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*, editado por J. G. Cloud y G. H. Thorgaard. Plenum Press, Nueva York.
- DOU, S.Z., R. MASUDA, M. TANAKA y K. TSUKAMOTO 2004 Size hierarchies affecting the social interactions and growth of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **233**: 237-249.
- DUNHAM, R. A., 1990 Production and use of monosex or sterile fishes in aquaculture. *Rev. Aquat. Sci.* **2**: 1-17.
- ESTOUP, A., K. GHARBI, M. SANCRISTOBAL, C. CHEVALET, P. HAFFRAY y G. GUYOMARD, 1998 Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**: 715-725.
- FELIP, A., S. ZANUY, M. CARRILLO, G. MARTÍNEZ, J. RAMOS y F. PIFERRER, 1997 Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* **152**: 287-298.
- FELIP, A., S. ZANUY, M. CARRILLO y F. PIFERRER, 1999a Growth and gonadal development in triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during the first two years of age. *Aquaculture* **173**: 389-399.
- FELIP, A., F. PIFERRER, M. CARRILLO y S. ZANUY, 1999b The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Heredity* **83**: 387-397.



- FELIP, A., G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, F. PIFERRER, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2000 AFLP analysis confirms exclusive maternal genomic contribution of meiogynogenetic sea bass. *Mar. Biotechnol.* **2**: 301-306.
- FELIP, A., S. ZANUY, M. CARRILLO y F. PIFERRER, 2001a Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* **111**: 175-195.
- FELIP, A., F. PIFERRER, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2001b Comparative growth performance between diploid and triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over the first four spawning seasons. *J. Fish Biol.* **58**: 76-88.
- FELIP, A., F. PIFERRER, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2001c Comparison of the gonadal development and plasma levels of sex steroid hormones in diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J. Exp. Zool.* **290**: 384-395.
- FELIP, A., F. PIFERRER, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2002 Growth, gonadal development and sex ratios of meiogynogenetic diploid sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *J. Fish Biol.* **61**: 347-359.
- FELIP, A., S. ZANUY y M. CARRILLO, 2006 Comparative analysis of growth performance and sperm motility between precocious and non-precocious males in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* **256**: 570-578.
- FERNÁNDEZ-PATO, C., C. MARTÍNEZ-TAPIA, J. SÁNCHEZ, E. VÁZQUEZ, G. BLANCO, A. CRIADO y J. GONZÁLEZ, 1998 Comparison of growth, survival and body composition of diploid and triploid specimens of turbot (*Scophthalmus maximus*) to first sexual maturity. *Spec. Publ. Eur. Aquac. Soc.* **26**: 80-81.
- FORÉS, R., J. IGLESÍAS, M. OLMEDO, F. J. SÁNCHEZ y J. B. PELETEIRO, 1988 Induction of spawning in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) by sudden change in photoperiod. *Aquacult. Engineer.* **9**: 357-366.
- FRANCESCON, A., A. LIBERTINI, D. BERTOTTO y A. BARBARO, 2004 Shock timing in meiogynogenesis and tetraploidization of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **236**: 201-209.
- FRANCESCON, A., A. BARBARO, D. BERTOTTO, A. LIBERTINI, F. CEPOLLARO, *et al.* 2005 Assessment of homozygosity and fertility in meiotic gynogens of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* **243**: 93-102.
- FRANCH, R., B. LOURO, M. TSALAVOUTA, D. CHATZIPLIS, C. S. TSIGENOPOULOS, E. SARROPOULOU, J. ANTONELLO, A. MAGOULAS, C.C. MYLONAS M BABBUCCI, T. PATARNELLO D.M. POWER, G. KOTOULAS y L. BARGELLONI, 2006 A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata*. *Genetics* **174**: 851-861.
- GALLARDO, M.H., J. W. BICKHAM, R. L. HONEYCUTT, R. A. OJEDA y N. KÖHLER, 1999 Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* **401**: 341.



- GASCA-LEYVA, E., C. J. LEÓN, J. M. HERNÁNDEZ y J. M. VERGARA, 2002 Bioeconomic analysis of production location on sea bream (*Sparus aurata*) cultivation. *Aquaculture* **213**: 219-232.
- GARRIDO-RAMOS, M., R. DE LA HERRÁN, R. LOZANO, S. CÁRDENAS, C. RUÍZ REJÓN y M. RUÍZ REJÓN 1996 Induction of triploidy in offspring of gilthead seabream (*Sparus aurata*) by means of heat shock. *J. Appl. Ichthyol.* **12**: 53-55.
- GILBERT, S.F., 1991 *Developmental Biology*, 3.^a ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- GORSHKOV, S., G. GORSHKOVA, A. HADANI, H. GORDIN y W. KNIBB, 1998 Chromosome set manipulation and hybridization experiments in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Isr. J. Aquacult. Bamidgah* **50**: 99-110.
- GORSHKOV, S., G. GORSHKOVA, A. HADANI, H. GORDIN y W. KNIBB, 2002 Chromosome set manipulations and hybridization experiments in gilthead seabream (*Sparus aurata*). II. Assessment of diploid and triploid hybrids between gilthead seabream and red seabream (*Pagrus major*). *J. Appl. Ichthyol.* **18**: 106-112.
- GORSHKOVA, G., S. GORSHKOV, A. HADANI, H. GORDIN y W. KNIBB, 1995 Chromosome set manipulation in marine fish. *Aquaculture* **137**: 157-158.
- HAFFRAY, P., J.S. BRUANT, J.M. FACQUEUR y A. FOSTIER, 2005 Gonad development, growth, survival and quality traits in triploids of the protandrous hermaphrodite gilthead seabream *Sparus aurata* (L.). *Aquaculture* **247**: 107-117.
- HAFFRAY, P., S. JEUS, M. GUENNOC, Y. GUIGUEN, F.F. BAROILLER, A. FOSTIER y E. LEBEGUE, 2006. Genetic and temperature sex determination in the turbot *Scophthalmus maximus*. *Proc. Int. Symp. Genetics Aquacult. Montpellier*.
- HARRELL, R. M., y VAN HEUKELEM, 1998 A comparison of triploid induction validation techniques. *Progr. Fish Cult.* **60**: 221-226.
- HAUG, T., 1990 Biology of the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L., 1758). *Adv. Mar. Biol.* **26**: 1-70.
- HENDRY, C. I., D. MARTIN-ROBICHAUD y T. J. Benfey, 2003 Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* **219**: 769-781.
- HOLMEFIJORD, I., y T. REFSTIE, 1997 Induction of triploidy in Atlantic halibut by temperature shocks. *Aquacult. Int.* **5**: 169-173.
- HOWELL, B. R., S. M. BAYNES y D. THOMPSON, 1995 Progress towards the identification of the sex determining mechanism of the *Solea solea* (L.), by induction of diploid gynogenesis. *Aquacult. Res.* **26**: 135-140.
- HULATA, G., 2001 Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* **111**: 155-173.



- IHSEN, P.E., L. R. MCKAY, I. McMILLAN y R. B. PHILLIPS, 1990 Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. Trans. Am. Fish. Soc. **119**: 698-717.
- IMSLAND, A.K., 1999 Sexual maturation in turbot (*Scophthalmus maximus*) is related to genotypic oxygen affinity: experimental support for Pauly's juvenile-to-adult transition hypothesis. J. Mar. Sci. **56**: 320-325.
- IMSLAND, A.K., A. FOLKVORD, G. L. GRUNG y O. STEFANSSON, 1997 Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot (*Scophthalmus maximus*) (Rafinesque, 1810). Aquacult. Res. **28**: 101-114.
- IMSLAND, A.K., y T.M. JONASSEN 2001 Regulation of growth in turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): aspects of environment x genotype interactions. Rev. Fish Biol. Fish. **11**: 71-90.
- JAKUPSSTOVU, S. J., y T. HAUG, 1988 Growth, sexual maturation, and spawning season of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, in Faroese waters. Fish. Res. **6**: 201-206.
- JOHNSON, O.W, W.W. DICKHOFF y F.M. UTTER, 1986 Comparative growth and development in diploid and triploid coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Aquaculture **57**: 319-336.
- JOHNSON, R.M., J.M. SHRIMPTON, J.W. HEATH y D.D. HEATH, 2004 Family, induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture **234**: 123-142.
- JOHNSTON, I.A., R. ALDERSON, C. SANDHAM, A. DINGWALL, D. MITCHELL, C. SELKIRK, D. NICKELL, R. BAKER, B. ROBERTSON, D. WHYTE y J. SPRINGATE, 2000 Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture **189**: 335-349.
- JOHNSTONE, R., y R. J. M. STET, 1995 The production of gynogenetic Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Theor. Appl. Genet. **90**: 819-826.
- KATO, K., R. HAYASHI, D. T. YUASA, S. YAMAMOTO, S. MIYASHITA, O. MURATA y H. KUMAI 2002 Production of clones red sea bream, *Pagrus major*, by chromosome manipulation. Aquaculture **207**: 19-27.
- KATO, K., 2003 Production of cloned fish by chromosome manipulation and confirmation by DNA markers, pp. 410-416 en *Aquatic Genomics* Springer-Verlag, Tokio
- KIM, D. S., J. H. KIM, J. Y. JO, Y. B. MOON y K. C. CHO, 1993 Induction of gynogenetic diploids in hiramé (*Paralichthys olivaceus*). Korean J. Genet. **15**: 179-186.
- KIM, K. K., Y. KIM, J. K. BANG, J. K. LEE y S. U. PARK, 1999 Studies on the production of all-female populations in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Inst. **55**: 25-30.



- KRISFALUSI, M., P. A. WHEELER, G. H. THORGAARD y J. G. Cloud, 2000 Gonadal morphology of female diploid gynogenetic and triploid rainbow trout. *J. Exp. Zool.* **286**: 505-512.
- LE COMBER, S. C., y C. SMITH, 2004 Polyploidy in fishes: patterns and processes. *Biol. J. Linn. Soc.* **82**: 431-442.
- LEARY, R.F., F. W. ALLENDORF, K. L. KNUDSEN y G. H. THORGAARD, 1985 Heterozygosity and developmental stability in gynogenetic diploid and triploid rainbow trout. *Heredity* **54**: 219-225.
- LEGGATT, R. A., y G. K. IWAMA, 2003 Occurrence of polyploidy in the fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* **13**: 237-246.
- LINCOLN, R. F., 1981a Sexual maturation in triploid male plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice x flounder (*Platichthys flesus*) hybrids. *J. Fish Biol.* **19**: 499-507.
- LINCOLN, R. F., 1981b Sexual maturation in female triploid plaice (*Pleuronectes platessa*), and plaice x flounder (*Platichthys flesus*) hybrids. *J. Fish Biol.* **19**: 499-507.
- LINCOLN, R. F., y A. P. SCOTT, 1983 Production of all-female rainbow trout. *Aquaculture* **30**: 375-380.
- LINCOLN, R.F., y A. P. SCOTT, 1984 Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* **25**: 385-392.
- LUCKENBACH, J. A., J. GODWIN, H. V. DANIELS, J. M. BEASLEY, C. V. SULLIVAN y R.J. BORSKI, 2004 Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm. *Aquaculture* **237**: 499-516.
- MABLE, B. K., 2004 'Why polyploidy is rarer in animals than in plants': myths and mechanisms. *Biol. J. Linn. Soc.* **82**: 453-466.
- MANNING, A.J., y L. W. CRIM, 2000 The induction of triploidy in the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferrugineus* (Storer), pp. 433 en *Sixth Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish*, editado por B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Anderson y S. O. Stefansson. Bergen, Noruega.
- MANNING, A. J., y M. P. M. BURTON, 2003 Cytological abnormalities in the ovaries of triploid yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer). *Fish Physiol. Biochem.* **29**: 269-273.
- MANNING, A. J., M. P. M. BURTON y L. W. CRIM, 2004 Reproductive evaluation of triploid yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer). *Aquaculture* **242**: 625-640.
- McGOWAN, C. y M. E. REITH, 1999 Polymorphic microsatellite markers for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mol. Ecol.* **8**: 1761-1763.



- PANDIAN, T. J., y R. KOTEEWARAN, 1998 Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* **384**: 167-243.
- PARKER, G. A., 1992 The evolution of sexual size dimorphism in fish. *J. Fish Biol.* **41** (Suppl. B): 1-20.
- PARSONS, J. E., R. A. BUSCH, G. H. THORGAARD y P. D. SHEERER, 1986 Increased resistance of triploid rainbow trout x coho salmon hybrids to infectious hematopoietic necrosis virus. *Aquaculture* **57**: 337-343.
- PERUZZI, S., y B. CHATAIN, 2000 Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture* **189**: 23-37.
- PERUZZI, S., B. CHATAIN, E. SAILLANT, P. HAFFRAY, B. MENU y J.C. FALGUIÈRE, 2004 Production of meiotic gynogenetic and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1. Performances, maturation and carcass quality. *Aquaculture* **230**: 41-64.
- PHILLIPS, R. B., K. A. PLEYTE y P. E. IHSEN, 1989 Patterns of chromosomal nucleolar organizing region (NOR) variation in fishes of the genus *Salvelinus*. *Copeia* **47**: 132-136.
- PIFERRER, F., 2001 Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* **197**: 229-281.
- PIFERRER, F., 2007 Determinación y diferenciación sexual de los peces y su control en acuicultura en *La Reproducción de los peces: Aspectos básicos y su aplicación en Acuicultura*, editado por M. Carrillo. Observatorio Español de Acuicultura, Madrid.
- PIFERRER, F., T. J. BENFEY y E. M. DONALDSON, 1994a Production of female triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by pressure shock and direct estrogen treatment. *Aquat. Living Resour.* **7**: 127-131.
- PIFERRER, F., T. J. BENFEY y E. M. DONALDSON, 1994b Gonadal morphology of normal and sex-reversed triploid and gynogenetic diploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish Biol.* **45**: 541-553.
- PIFERRER, F., R. M. CAL, B. ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, L. SÁNCHEZ y P. MARTÍNEZ, 2000 Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* **188**: 79-90.
- PIFERRER, F., R. M. CAL, C. GÓMEZ, C. BOUZA y P. MARTÍNEZ, 2003 Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture* **220**: 821-831.
- PIFERRER, F., R. M. CAL, B. ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, J. CASTRO y P. MARTÍNEZ, 2004 Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irra-



- diation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture* **238**: 403-419.
- PIFERRER, F., M. BLÁZQUEZ, L. NAVARRO y A. GONZÁLEZ, 2005 Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* **142**: 102-110.
- PIFERRER, F., A. BEAUMONT, J.C. FALGUIÈRE, L. COLOMBO, M. FLAISHANS y P. HAFFRAY, 2007 The use of induced polyploidy in the aquaculture of bivalves and fish for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture (en preparación)*.
- PLANAS, M., e I. CUNHA, 1999 Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture* **177**: 171-190.
- PURDOM, C. E., 1972 Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity* **29**: 11-24.
- PURDOM, C. E., 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture* **33**: 287-300.
- QUILLET, E., B. CHEVASSUS, J. M. BLANC, F. KRIEG y D. CHOURROUT, 1988 Performances of auto and allotriploids in salmonids. I. Survival and growth in fresh water farming. *Aquat. Living Resour.* **1**: 29-43.
- REFSTIE, T., 1983 Induction of diploid gynogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) using irradiated sperm and heat shock. *Can J. Zool.* **61**: 2411-2416.
- REFSTIE, T., J. STOSS y E. M. DONALDSON, 1982 Production of all female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by diploid gynogenesis using irradiated sperm and cold shock. *Aquaculture* **29**: 67-82.
- REXROAD, C., e Y. PALTÍ, 2002 Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. B* **133**: 609-646.
- RIZZO, G., y M. SPAGNOLO, 1996 A model for the optimal management of sea bass *Dicentrarchus labrax* aquaculture. *Mar. Resour. Econom.* **11**: 267-286.
- SAILLANT, E., A. FOSTIER, P. HAFFRAY, B. MENU, J. THIMONIER y B. CHATAIN, 2002 Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Zool.* **292**: 494-505.
- SCHLUPP, I., 2005 The evolutionary ecology of gynogenesis. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **36**: 399-417.
- SCHRECK, C.B., W. CONTRERAS-SÁNCHEZ y M.S. FITZPATRICK 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* **197**: 3-24.



- SCHULZ, R. J., 1967 Gynogenesis and triploidy in the viviparous fish *Poeciliopsis*. Science **157**: 1564-1567.
- SHEEHAN, R. J., S. P. SHASTEEN, A. SURESH, A. R. KAPUSCINSKI y J. E. SEEB, 1999 Better growth in all-female diploid and triploid rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc. **128**: 491-498.
- SOLAR, I. I., E. M. DONALDSON y G. A. HUNTER, 1984 Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock and investigation of early growth. Aquaculture **42**: 57-67.
- STÖCK, M., D. K. LAMATSCH, C. STEINLEIN, J. T. EPELN, W. R. GROSSE R. HOCK, T. KLAPPERTSTUCK, K.P. LAMPERT, U. SCHEER, M. SCHMID y M. SCHARTL, 2002 A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. Nature Gen. **30**: 325-328.
- TABATA, K., 1991 Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame (*Paralichthys olivaceus*). Nipp. Suisan Gakk. **57** (5): 845-850.
- TABATA, K., y S. GORIE, 1988 Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus* by suppression of the first cleavage, with special reference to the survival and growth. Nipp. Suisan Gakk. **54**: 1867-1872
- TABATA, K., S. GORIE y K. NAKAMURA, 1986 Induction of gynogenetic diploid in hirame (*Paralichthys olivaceus*). Nipp. Suisan Gakk. **52**: 1901-1904.
- TANAKA, M., S. KIMURA, T. FUJIMOTO, S. SAJKAO, E. YAMAHA y K. ARAI 2003 Spontaneous mosaicism occurred in normally fertilized and gynogenetically induced progeny of the kokanee salmon *Oncorhynchus nerka*. Fish. Sci. **69**: 176-180.
- TERRONES, J., 2002 *Análisis morfológico y funcional del desarrollo gonadal y del crecimiento en el rodaballo (Scophthalmus maximus) diploide vs triploide*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- TESKEREDZIC, E., Z. TESKEREDZIC, E. M. DONALDSON, E. MCLEAN e I. I. SOLAR, 1993 Triploidization of coho salmon following application of heat and electric shocks. Aquaculture **116**: 287-294.
- THORGAARD, G. H., 1983 Chromosome set manipulation and sex control in fish, pp. 405-434 en *Fish Physiology*, Vol. IXB, editado por W. H. Hoar, D. J. Randall, y E. M. Donaldson. Academic Press, Nueva York.
- THORGAARD, G.H. 1986 Ploidy manipulation and performance. Aquaculture **57**: 57-64.
- THORGAARD, G.H., P.D. SCHEERER y J. ZHANG, 1992 Integration of chromosome set manipulation and transgenic technologies for fishes. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. **1**: 251-256.
- THORGAARD, G. H., G. S. BAILEY, D. WILLIAMS, D. R. BUHLER, S. L. KAATTARI, S.S. RISTOW, J.D. HANSEN, J.R. WINTON, J.L. BARTHOLOMEW, J.J. NAGLER, P.J. WALSH, M.M.



- VIJAYAN, R.H. DEVLIN, R.W. HARDY, K.E. OVERTURF, W.P. YOUNG, B.D. ROBISON, C. REXROAD Y Y. PALTÍ 2002. Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. B* **133**: 609-646.
- THORPE, J. E., 2004 Life history responses of fishes to culture. *J. Fish Biol.* **65** (Suppl. A): 263-285.
- TIWARY, B. K., R. KIRUBAGARAN y A. K. RAY, 2004 The biology of triploid Fish. *Rev. Fish. Biol.* **14**: 391-402.
- TVEDT, H. B., T. J. BENFEY, D. J. MARTIN-ROBICHAUD, C. MC GOWAN y M. REITH, 2006 Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* **252**: 573-583.
- VÁZQUEZ, E., C. FERNÁNDEZ-PATO, I. MARTÍNEZ-TAPIA, G. BLANCO y J. A. SÁNCHEZ, 1996 Rapid flow cytometry method for triploidy determination in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *International Council of the Exploration of the sea. C.M./F:8*, 9pp.
- VÁZQUEZ, E., C. FERNÁNDEZ-PATO, I. MARTÍNEZ-TAPIA, G. BLANCO y J. A. SÁNCHEZ, 1998 Triploid induction in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using temperature shocks. *Spec. Publ. Eur. Aquac. Soc.* **26**: 268-269.
- VÁZQUEZ, E., C. FERNÁNDEZ-PATO, C. MARTÍNEZ-TAPIA, G. BLANCO y J. A. SÁNCHEZ, 2002 Induced gynogenesis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Spec. Publ. Eur. Aquac. Soc.* **32**: 528-529.
- WITHLER, R.E., T. D. BEACHAN, I.I. SOLAR y E. M. DONALDSON, 1995 Freshwater growth, smolting, and marine survival and growth of diploid and triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* **136**: 91-107.
- WITHLER, R. E., W. C. CLARKC, J. BLACKBUNN y I. BAKER, 1998 Effect of triploidy on growth and survival of pre-smolt and post-smolt coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* **168**: 413-422.
- YAMAMOTO, E., 1992 Application of gynogenesis and triploidy in hirame (*Paralichthys olivaceus*) breeding. *Fish. Genet. Breeding Sci.* **18**: 3-23.
- YAMAMOTO, E., 1999 Studies on sex- manipulation and production of cloned populations in hirame (*Paralichthys olivaceus*) (Temminck y Schlegel). *Aquaculture* **173**: 235-246.
- YOU, F., J. LIU, X. WANG, Y. XU, R. HUANG, *et al.* 2001 Study of embryonic development and early growth of triploid and gynogenetic diploid left-eye flounder, (*Paralichthys olivaceus*). *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **19**: 147-151.
- ZANUY, S., M. CARRILLO, M. BLÁZQUEZ, J. RAMOS, F. PIFERRER y E. M. DONALDSON, 1994 Production of monosex and sterile sea bass by hormonal and genetic approaches. *Publ. Assoc. Dévelop. Aquac.* **119**: 409-423.
- ZANUY, S., M.CARRILLO, A. FELIP, L. RODRÍGUEZ, M. BLÁZQUEZ, J. RAMOS y F. PIFERRER, 2001 Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of



reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Aquaculture **202**: 187-203.

GLOSARIO

Alotriploide. Organismo formado mediante la triploidización de un huevo recién fertilizado con esperma de una especie distinta. Triploide híbrido.

Aneuploide. Que posee un nivel de ploidía distinto a cualquier múltiplo del número haploide, ya sea por contener cromosomas extra o por falta de alguno de ellos. En los peces, los machos triploides de muchas especies, a pesar de tener afectada su meiosis, son capaces de producir esperma aneuploide con un nivel de ploidía de, por ejemplo, $1.3n$ en lugar del esperado $1n$.

Autotriploide. Organismo formado mediante la triploidización de un huevo recién fertilizado con esperma de la misma especie.

Euploide. Que posee un nivel de ploidía igual a cualquier múltiplo entero del número haploide característico para una especie dada. Así, por ejemplo, los animales ha-, di-, tri- y tetraploides son animales euploides.

Ginogénesis. Tipo especial de partenogénesis en el que el huevo es activado por la penetración de esperma que, sin embargo, no contribuye con su dotación cromosómica a la del cigoto. Se conoce también con el término de pseudogamia.

Haploide. Condición en la que hay presente un único juego de cromosomas. Se da normalmente en los gametos, pero embriones resultantes de la activación de un huevo con esperma irradiado presentan también esta condición.

Meiosis. Tipo de división celular que sólo se da en las células germinales de los eucariotas que se reproducen sexualmente. En la meiosis, una única replicación del material genético es seguida de dos divisiones celulares, lo cual reduce a la mitad el número de cromosomas en las células resultantes, llamadas gametos.

Mosaico. Organismo con dos o más genotipos distintos a pesar de provenir de un solo huevo fertilizado o cigoto. Los mosaicos poliploides pueden ser haplo-diploides, diplo-triploides y otros citotipos



inusuales, y poseen dos o más tipos de poblaciones celulares con distinto nivel de ploidía.

Partenogénesis. Desarrollo de un organismo exclusivamente a partir de la información genética de la madre. En este modo de reproducción una hembra genera progenie a través de cigotos provenientes de huevos que, mediante distintos mecanismos, mantienen la condición diploide. En los partenogenéticos el desarrollo del cigoto puede tener lugar sin necesidad de fertilización, puesto que en muchas especies partenogenéticas los machos no participan en la fecundación o, simplemente, no existen.

Poliploide. Condición en la que células u organismos poseen más de dos juegos de cromosomas homólogos. De forma natural la poliploidía se da en animales, hongos y muchas especies de plantas.

Ploidía. Número de juegos de cromosomas homólogos en una célula. En un organismo, normalmente todas sus células son diploides, con dos juegos de cromosomas homólogos cada una, uno proveniente de su padre y otro de su madre. En los gametos, tras la meiosis, este número se reduce a la mitad.

Triploide. Poliploide que posee tres juegos completos de cromosomas homólogos.

11

TRANSFERENCIA GÉNICA EN PECES: BASES TÉCNICAS Y APLICACIONES

TRANSFERENCIA GÉNICA EN PECES: BASES TÉCNICAS Y APLICACIONES

A. Gómez

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal

I. Muñoz

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal

Resumen

La aplicación de las técnicas de DNA recombinante en biotecnología ha permitido conseguir grandes avances en procesos muy diferentes. Dentro de este campo, la transferencia génica en eucariotas superiores es uno de sus máximos logros. La transferencia génica nos permite modificar las características hereditarias de un animal, bien introduciendo genes nuevos, o bien reemplazando un gen concreto del genoma. Con esta segunda estrategia podemos generar animales «knock-out», aunque esta tecnología está poco desarrollada en peces si lo comparamos con los avances obtenidos en ratón. La metodología más frecuente en peces es la introducción directa de un gen exógeno en el huevo fecundado. Para ello se han ensayado distintos métodos, pero el más extendido es la microinyección del DNA en el citoplasma de una célula del embrión recién fecundado. Uno de los pasos limitantes en la creación de un pez transgénico es la integración del DNA foráneo en el genoma del huésped. Esta integración se produce aleatoriamente, y en fases tardías del desarrollo del embrión, dando lugar



a un organismo adulto mosaico y con poca presencia del transgén en las células de la línea germinal.

La mayoría de los estudios de transferencia génica en peces se han realizado con especies modelo y en trabajos dedicados a la investigación básica. Entre las aplicaciones biotecnológicas utilizando especies de peces comerciales, los mayores esfuerzos hasta el momento se han destinado a la creación de peces transgénicos, mayormente salmónidos, con elevadas tasas de crecimiento, mediante introducción de múltiples copias del gen de la hormona del crecimiento. También se han generado peces transgénicos para conseguir resistir a la congelación, aumentar la protección ante patógenos, controlar la maduración sexual, o modificar el metabolismo de los animales. Otro tipo de estudios se han encaminado al desarrollo de peces transgénicos para la monitorización de contaminantes o para utilizarlos como biofactorías.

Todos estos trabajos han suscitado mucho interés, pero también han llevado a la aparición de riesgos derivados de su uso, éstos incluyen riesgos medioambientales por la posibilidad de escape de animales transgénicos, también dudas sobre la aptitud de su consumo por los humanos, así como problemas éticos por la manipulación del genoma de animales.

Abstract

The application of recombinant DNA methodology to biotechnology has resulted in significant progress in very different processes. Gene transfer in higher eukaryotes is one of its main achievements. Gene transfer makes possible the modification of hereditary traits in an animal. This can be achieved by introducing a new gene, or by replacing a specific gene of the genome (gene targeting). This second approach allows the generation of knock-out animals, and requires the availability of in vitro cultured totipotent cells. This method is little developed in fish, when compared to what has been accomplished in mouse. The most usual methodology in fish is the direct introduction of an exogenous gene in the fertilized egg. Different methods have been tested to introduce the DNA, but the more common one is cytoplasmic microinjection of the early cleavage embryo. One of the limiting steps in the generation of a transgenic fish is the integration of the foreign DNA in the host genome. This



integration occurs at random and happens later during the development of the embryo, resulting in a mosaic adult organism with low incidence of the transgene in the germline.

Most of the gene transfer work in fish is related with basic research and uses model species. Among the biotechnological applications using commercial fish species the biggest efforts have been directed to produce transgenic fish, mostly salmonids, with high growing rates, through the introduction of multiples copies of the growth hormone gene. Less developed approaches include: generation of transgenic fish aimed to resist freezing, enhanced protection against pathogens, control of sexual maturation, or modification of animal metabolism. Other kind of studies have focused in the production of transgenic fish to monitor environmental contaminants or the use of these animals as biofactories.

All this research has aroused a lot of interest, but it has also lead to the existence of risks derived from its use. These include, environmental risks based on a possible escape of the transgenic animals, and also doubts about their suitability for human consumption, as well as ethic problems derived from the manipulation of the genome.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de metodologías para la introducción de un gen exógeno en un animal, su posterior integración estable en el genoma y su incorporación a la línea germinal, ha permitido la producción de animales transgénicos, que son actualmente una herramienta valiosa tanto en estudios básicos como aplicados. Su mejor exponente son los ratones transgénicos, pues han contribuido de manera significativa a comprender el control genético de distintos procesos fisiológicos. Además, han proporcionado modelos esenciales en estudios de cáncer y otras enfermedades genéticas en humanos. La tecnología transgénica también posee, potencialmente, múltiples aplicaciones biotecnológicas. Entre aquellas que afectan a la producción animal podríamos destacar la protección contra enfermedades, la mejora de funciones biológicas importantes como la tasa de crecimiento o la calidad de la carne, y la producción de proteínas de alto valor biológico y biofármacos (HOUEBINE 1997).



Las motivaciones para el desarrollo de peces transgénicos no difieren de aquéllas que impulsaron su uso en otros animales. La acuicultura intensiva actual está mayormente basada en la producción de peces carnívoros de alto valor. El éxito en la producción de estos peces depende de muchos factores, entre los que se encuentran: el patrimonio genético de los reproductores, el control eficiente de las enfermedades, el conocimiento de las condiciones fisiológicas, ambientales y nutricionales óptimas para el crecimiento, el control del ciclo reproductor, la disponibilidad de agua de calidad y la aplicación de técnicas de manejo innovadoras. La aplicación de la tecnología de transferencia génica en peces puede mejorar algunos de estos factores, tales como el crecimiento, la prevención y resistencia a enfermedades y la adaptación a condiciones ambientales no apropiadas.

Los primeros experimentos en los que se intentó aplicar la transferencia génica en embriones de pez datan de mitad de los años 80 (CHOURROUT *et al.* 1986; MACLEAN *et al.* 1987; FLETCHER *et al.* 1988). Desde entonces esta tecnología se ha aplicado a distintas especies, muchas de ellas importantes en acuicultura. Se han realizado tanto trabajos básicos que pretenden conocer el funcionamiento y regulación celular, como estudios con una clara aplicación biotecnológica. Los resultados han sido muy dispares y han puesto de manifiesto la complejidad de esta tecnología.

Para avanzar en este campo necesitamos obtener un mayor conocimiento de la función génica en peces y perfeccionar las técnicas actualmente utilizadas para la obtención de peces transgénicos, y que se describen a continuación.

2. GENERACIÓN DE PECES TRANSGÉNICOS

La transferencia génica nos permite modificar las características hereditarias de un animal mediante técnicas de ingeniería genética. Para ello existen dos tipos de estrategias: una, consiste en la introducción de genes nuevos (transgénesis convencional) con el objeto de introducir nuevas características. La otra estrategia se basa en la eliminación de un gen endógeno, o su reemplazamiento por una versión



no funcional del mismo, lo que nos permite eliminar características indeseables. Esta segunda aproximación, conocida como «*knock-out*», sólo se encuentra totalmente establecida en ratón.

2.1. Utilización de líneas celulares para la generación de peces transgénicos y «*knock-out*»

La producción de animales que tengan modificado un gen concreto («*gene targeting*») es una técnica compleja que combina distintas metodologías moleculares y celulares. La modificación de un gen concreto puede ir encaminada a su inactivación («*knock-out*») o a su sustitución por una copia diferente («*knock-in*»). Para ello, debe producirse un proceso de recombinación homóloga, ocasionando el reemplazamiento del gen concreto que deseamos modificar por una copia defectuosa («*knock-out*») o diferente («*knock-in*») del mismo. Los procesos de recombinación homóloga en eucariotas superiores ocurren con una probabilidad muy baja, por ello deben realizarse en células cultivadas *in vitro*, para poder rastrear y seleccionar aquélla en la que se haya producido esa recombinación. Así, como primer paso en este proceso se necesita la obtención de una línea de células madre embrionarias (ES) que sean capaces en último termino de diferenciarse en cualquier tipo celular (revisado en ALVAREZ *et al.* 2007). Estas células ES deben poder cultivarse *in vitro*, modificarse genéticamente para añadir o eliminar un gen y posteriormente seleccionarse *in vitro* sin perder su totipotencia. Finalmente, estas células se transplantarán a un embrión, donde deben ser susceptibles de diferenciarse en distintos tipos celulares para contribuir al desarrollo del animal, y también a la formación de la línea germinal. Esto dará lugar, en una primera generación parental (P), a organismos quimera que contendrán células provenientes del embrión recipiente y células derivadas del cultivo *in vitro*. En la generación siguiente, F1, ya se puede analizar si alguno de los individuos contiene el patrimonio genético de las células ES, y por tanto si éstas habían contribuido a la línea germinal en la generación parental (Figura 1). Con esta metodología se consigue trasladar, de manera permanente, una modificación genética realizada *in vitro* a un organismo vivo. Esta estrategia sólo se ha llevado a cabo de manera completa en algunas cepas concretas de ratón. En peces se han reali-

zados progresos en especies modelo como medaka (*Oryzias latipes*) y pez cebra (*Danio rerio*). En pez cebra se han conseguido embriones quimera para la línea germinal con la participación de una línea de células ES que se había cultivado *in vitro* durante un periodo máximo de 6 semanas (FAN *et al.* 2004). Por otra parte, en medaka se dispone de una línea de células ES (HONG *et al.* 1996) que después de años de cultivo sigue reteniendo la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares. Cuando estas células se transplantaron a embriones en las primeras etapas de desarrollo, se observó que eran capaces de participar en la formación de distintos tejidos en el animal adulto, sin embargo, todavía no se ha demostrado su aportación a la línea germinal (HONG *et al.* 1998).

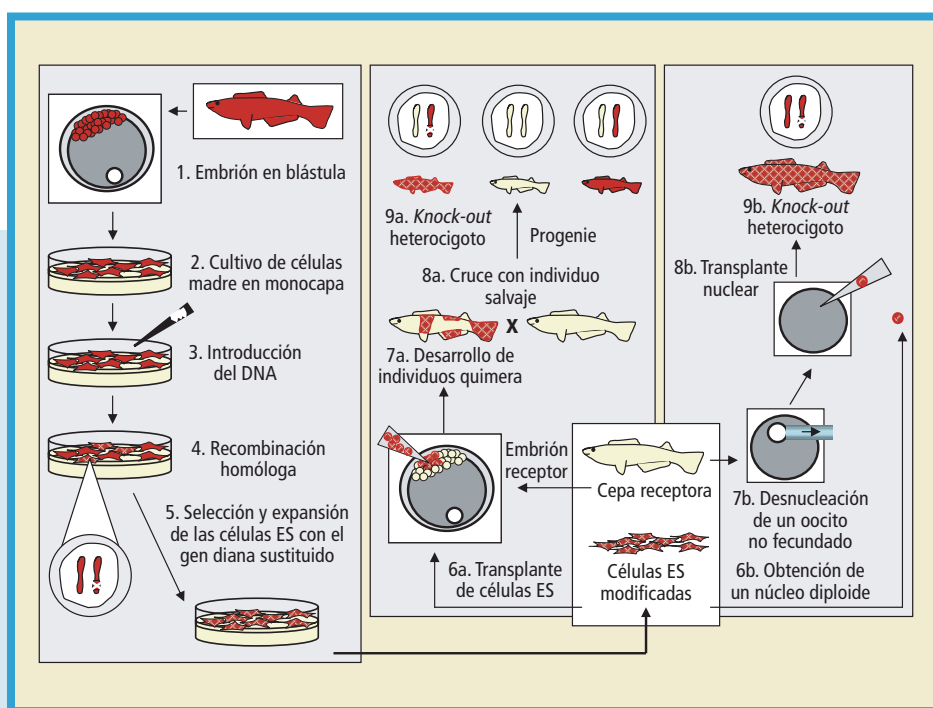


FIGURA 1.

Esquema de las etapas principales para obtener peces «*knock-out*» a través de células madre embrionarias (ES), mediante (a) la obtención de quimeras o (b) transferencia nuclear.



En cuanto a especies comerciales, la primera línea de células ES se derivó de dorada (*Sparus aurata*) (BEJAR *et al.* 1999). Embriones quimera que contenían células de esta línea transplantadas mostraron que éstas eran capaces de participar en los tres linajes embrionarios, aunque el porcentaje de contribución de estas células a la formación del embrión era escaso (BEJAR *et al.* 2002). También se han desarrollado distintas líneas de células embrionarias procedentes de especies de interés comercial en Asia (CHEN *et al.* 2003, 2004, 2005). Se ha caracterizado su capacidad totipotente *in vitro*, pero no se han realizado experimentos de quimerismo para evaluar su aportación *in vivo*.

Para transferir la dotación genética de las células cultivadas *in vitro* a un embrión, existe una estrategia alternativa al transplante de células y la formación de quimeras. Ésta consiste en transferir el núcleo diploide de la célula cultivada *in vitro* a un oocito enucleado. Esta técnica se ha ensayado en pez cebra, utilizando como donantes de núcleos a fibroblastos embrionarios cultivados *in vitro*. Aquellos organismos que llegaron a adultos produjeron descendencia fértil, que además heredó el genoma de los núcleos donantes (LEE *et al.* 2002). El transplante nuclear también se ha realizado con éxito en medaka, utilizando núcleos de células en estado de blástula como donantes (WAKAMATSU *et al.* 2001a). Es más, esta técnica se ha aplicado también utilizando como donante y receptor a especies distintas, con núcleos provenientes de células embrionarias de carpa común (*Cyprinus carpio*) transgénica, y oocitos receptores de carpa roja (*Carassius auratus*) (SUN *et al.* 2005).

Otro de los tipos celulares que se está ensayando en peces como alternativa a las células ES son las células germinales primordiales (PGCs). Éstas son las células progenitoras de la línea germinal, antes de la diferenciación sexual, y que dan lugar posteriormente a oocitos o esperma. En trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se han aislado PGCs provenientes de embriones transgénicos que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) exclusivamente en estas células germinales. Posteriormente, estas PGCs se han transplantado a embriones salvajes recién eclosionados. Se ha comprobado que estas células transplantadas se diferencian finalmente en gametos, y éstos, tras su fecundación, son capaces de dar lugar a una progenie viable (TAKEUCHI *et al.* 2003; KOBAYASHI *et al.* 2004). A pesar de contribuir a la línea germinal de una manera



tan eficiente, no sé dispone todavía de métodos para el cultivo y manipulación génica *in vitro* de las PGCs, cuando éstos estén disponibles, las PGCs constituirán una herramienta importante para el desarrollo de transgénicos o «*knock-out*» (YOSHIZAKI *et al.* 2003) (Figura 2).

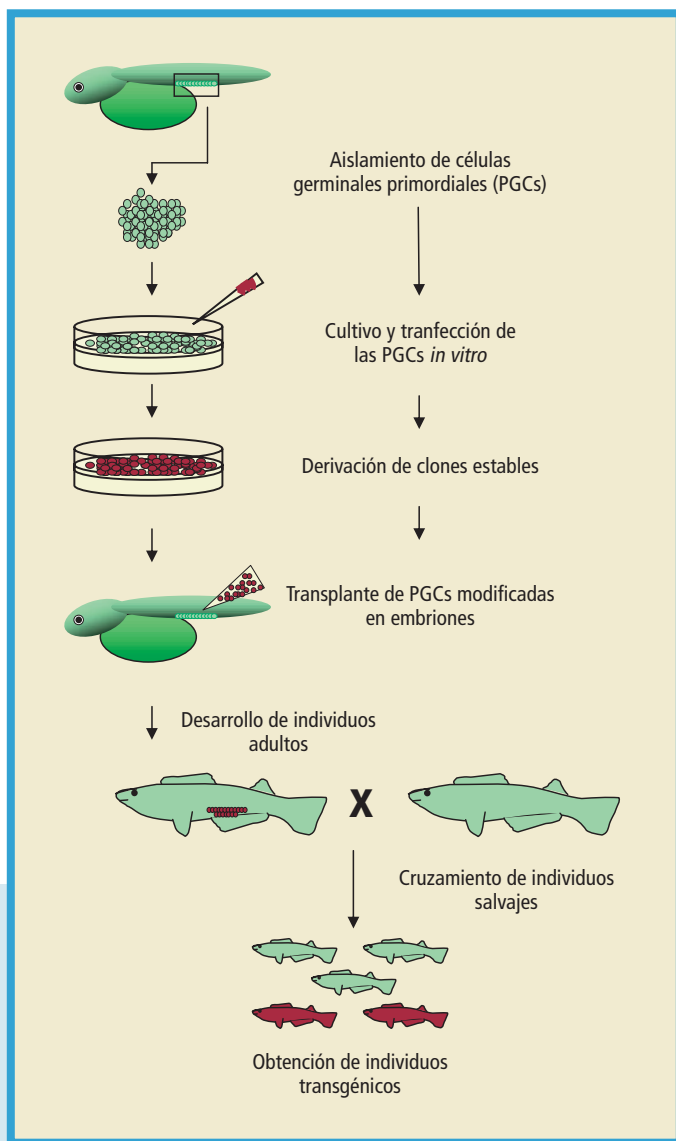


FIGURA 2.

Diagrama de las fases necesarias para la obtención de transgénicos o «*knock-out*» a través de células germinales primordiales (PGCs).



Otras aproximaciones incluyen el desarrollo de líneas de células germinales masculinas. En medaka se ha establecido una línea celular de espermatogonias. Estas células pueden modificarse genéticamente y diferenciarse *in vitro* para obtener esperma motil y haploide, sin embargo, la capacidad de fertilización de este esperma no se ha ensayado todavía (HONG *et al.* 2004). Por otra parte, en pez cebra se han obtenido cultivos primarios de células germinales masculinas, éstos se han infectado *in vitro* con un retrovirus que portaba un gen indicador, posteriormente se han diferenciado a esperma, y éste se ha utilizado para realizar fecundación *in vitro*. Con esta estrategia se ha conseguido progenie viable que además contenía el gen indicador introducido durante el cultivo *in vitro* (KURITA *et al.* 2004) (Figura 3).

2.2. Metodología convencional para la generación de peces transgénicos

La técnica mejor desarrollada para la producción de peces transgénicos consiste en la introducción directa del DNA exógeno (transgén) en el huevo fecundado. Hay varios pasos cruciales en este proceso (Figura 4).

2.2.1. DNA foráneo

El DNA que vamos a introducir para la producción de un pez transgénico debe poseer la secuencia codificante completa del gen que deseamos expresar, junto con todas las secuencias reguladoras que aseguren una expresión eficiente. En el caso de que el pez transgénico vaya a tener una aplicación biotecnológica es deseable que todas estas secuencias provengan también de un pez, y que se eliminen todas las secuencias bacterianas que han sido necesarias para su construcción. Sin embargo, en muchos de los peces transgénicos utilizados en estudios básicos no se han usado promotores de origen piscícola, sino promotores de origen viral, que se encuentran bien caracterizados y aseguran una fuerte expresión de los genes que se hallan bajo su control.

Todavía existen pocos promotores y secuencias reguladoras aisladas de peces que estén bien caracterizados. Uno de los promotores clásicamente más utilizado es el de la actina β de carpa (LIU *et al.* 1990;

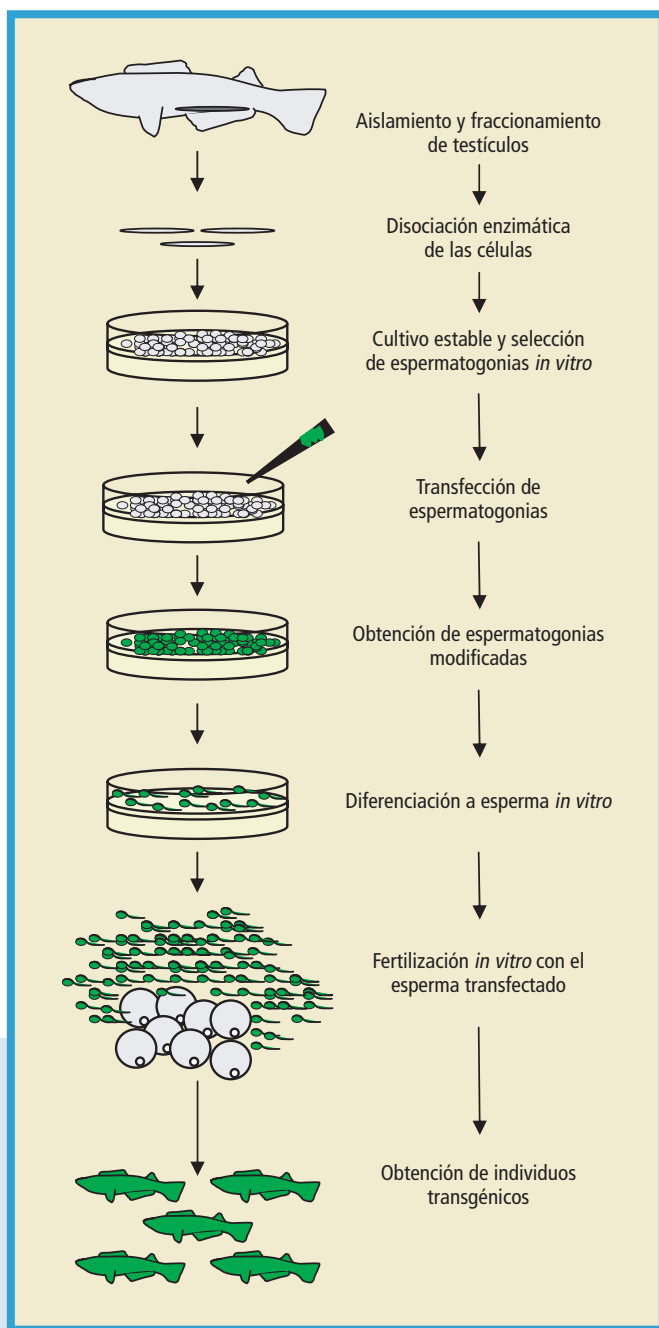


FIGURA 3.

Etapas necesarias para la obtención de peces transgénicos utilizando células germinales masculinas, cultivadas *in vitro*, como vector para la introducción del DNA.

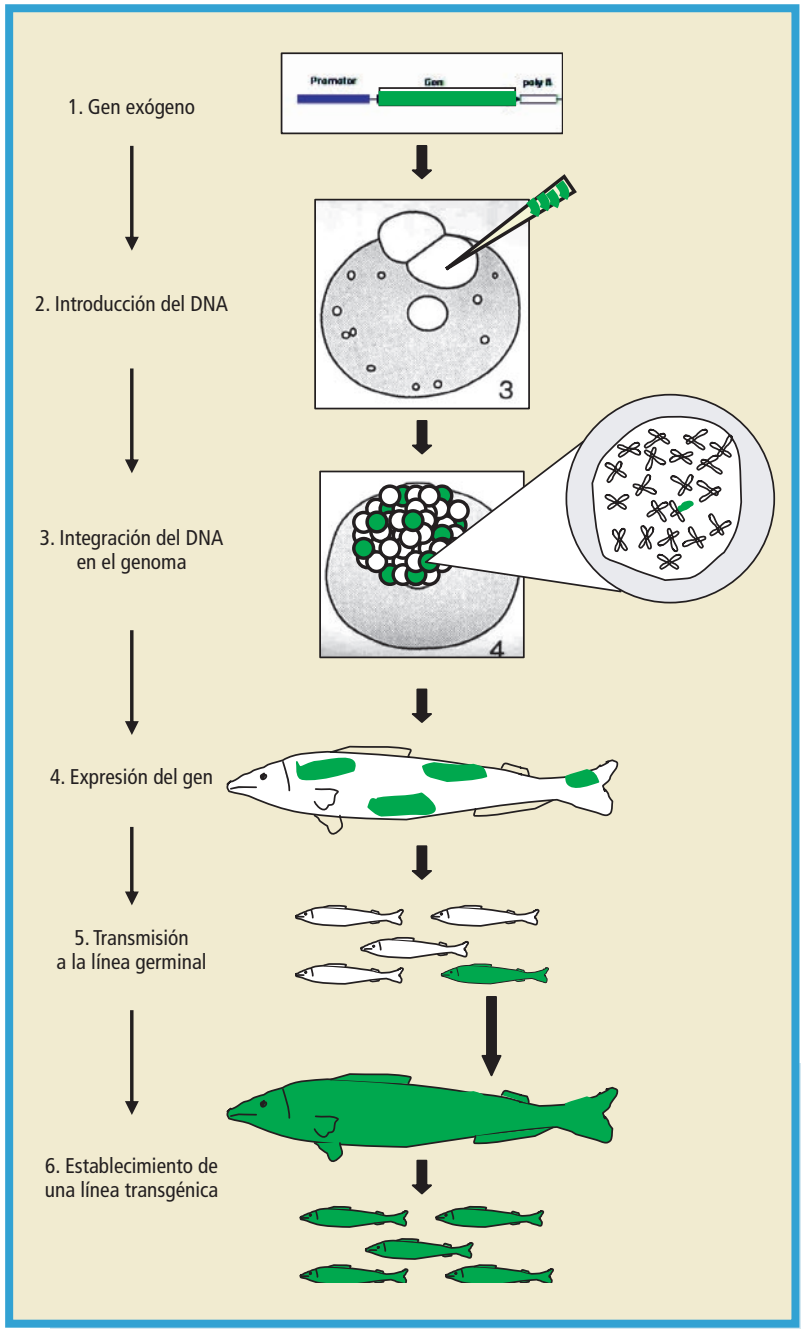


FIGURA 4.
Esquema de la metodología tradicional para la generación de un pez transgénico.



MACLEAN *et al.* 1992; MOAV *et al.* 1993; ALAM *et al.* 1996a; ALAM *et al.* 1996b). Posteriormente también se ha aislado el promotor de la actina β en otras especies de peces (TAKAGI *et al.* 1994; HIGASHIJIMA *et al.* 1997; HAMADA 1998; HWANG *et al.* 2003; NOH *et al.* 2003), de hecho este promotor se utiliza cada vez más en sustitución de ciertos promotores virales. Otros promotores de origen piscícola utilizados en la generación de peces transgénicos son los de las proteínas anticongelantes de *Macrozoarces americanus* (HEW *et al.* 1987; FLETCHER *et al.* 1988), y los de las metalotioneinas de trucha arcoiris (INOUE *et al.* 1992; HONG *et al.* 1993).

2.2.2. Introducción del DNA en el embrión

El procedimiento más utilizado es la inyección del DNA exógeno en el citoplasma de una célula del embrión. Esta inyección debe hacerse en una etapa temprana, cuando el embrión consta de 1 ó 2 células. Inyectar la solución de DNA directamente en el núcleo celular aumentaría la eficacia del proceso, pero desafortunadamente durante estas primeras fases del desarrollo el núcleo de las células embrionarias de peces no es visible.

Se han ensayado otros métodos (Tabla 1) que permiten la transferencia de DNA a muchos embriones a la vez, para evitar la laboriosidad que supone la microinyección citoplásmica. En esta línea, se ha ensayado la electroporación, que utiliza pulsos eléctricos cortos para permeabilizar la membrana celular, y permitir así la entrada de DNA. Esta técnica se ha utilizado con huevos fecundados de distintas especies de peces como medaka, pez cebra, carpa común ó *Ictalurus punctatus* (POWERS *et al.* 1992; BUONO y LINSEY 1992; HOSTETLER *et al.* 2003).

Existen otros métodos en los que se utiliza el espermatozoides como portador del transgén en el momento de la fertilización. Inicialmente se mezclaba simplemente el DNA exógeno con el espermatozoides, pero esta técnica era ineficiente en la obtención de transgénicos (CHOURROUT y PERROT 1992). Posteriormente, se han realizado ensayos electroporando el espermatozoides para introducir el DNA en distintas especies como carpa común, pez gato africano (*Clarias gariepinus*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) o salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (MULLER *et al.* 1992; SIN *et al.* 1993), pero se ha visto que los niveles de integración



TABLA 1.

Métodos de transferencia génica alternativos a la microinyección citoplásmica.

Método	Especie	Integración ^a	Referencia
Electroporación de huevos fertilizados	<i>Cyprinus carpio</i>		Powers et al. 1992
	<i>Danio rerio</i>	X	Powers et al. 1992; Sheela et al. 1998; Buono y Linser 1992
	<i>Heteropneustes fossilis</i>	X	Sheela et al. 1999
	<i>Ictalurus punctatus</i>		Powers et al. 1992
	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>		Xie et al. 1993
	<i>Oryzias latipes</i>	X	Inoue et al. 1990; Ono et al. 1997; Hostetler et al. 2003
Esperma como portador del DNA (sin electroporación)	<i>Danio rerio</i>		Khoo 2000
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>		Chourrout y Perrot 1992
Esperma como portador del DNA (con electroporación)	<i>Catla catla</i>		Venugopal et al. 1998
	<i>Cirrhinus mrigala</i>		Venugopal et al. 1998
	<i>Clarias gariepinus</i>		Muller et al. 1992
	<i>Cyprinus carpio</i>		Muller et al. 1992
	<i>Danio rerio</i>		Khoo 2000
	<i>Labeo rohita</i>		Venugopal et al. 1998
	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>		Tsai et al. 1995
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>		Sin et al. 1993
	<i>Oreochromis niloticus</i>		Muller et al. 1992
	<i>Sparus sarba</i>	X	Lu et al. 2002
Bombardeo de huevos fertilizados	<i>Danio rerio</i>		Zelenin et al. 1991
	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>		Zelenin et al. 1991
	<i>Oryzias latipes</i>	X	Yamauchi et al. 2000; Kinoshita et al. 2003
	<i>Paralichthys olivaceus</i>		Yazawa et al. 2005
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>		Zelenin et al. 1991
Transposones	<i>Danio rerio</i>	X	Davidson et al. 2003
	<i>Oryzias latipes</i>	X	Grabher et al. 2003
Liposomas	<i>Danio rerio</i>		Sussman 2001
	<i>Sparus sarba</i>	X	Lu et al. 2002
Adenovirus, retrovirus	<i>Danio rerio</i>	X	Linney et al. 1999; Hsiao et al. 2001
	<i>Oryzias latipes</i>	X	Chou et al. 2001

^a Casos en los que se ha demostrado la integración del DNA exógeno en el genoma.



y expresión del transgén eran mucho más bajos que los alcanzados mediante microinyección.

También se ha evaluado el empleo de otros métodos masivos, como el bombardeo de micropartículas recubiertas de DNA en huevos fecundados (ZELENIN *et al.* 1991; YAMAUCHI *et al.* 2000; KINOSHITA *et al.* 2003; YAZAWA *et al.* 2005). En medaka se ha conseguido establecer una línea estable, aunque los niveles de transmisión a la generación F1 eran menores a los conseguidos con microinyección, debido a que no todos los embriones bombardeados en la generación parental tomaron el DNA (KINOSHITA *et al.* 2003). Asimismo, se ha ensayado la lipofección en pez cebra (SUSSMAN 2001) y *Sparus sarba*. En éste último se inyectó una mezcla de liposoma-DNA en testículos de machos. Los embriones obtenidos, tras el cruzamiento de estos machos, mostraron que los niveles de introducción del DNA eran satisfactorios, además posteriormente se consiguió su transmisión a la siguiente generación (LU *et al.* 2002).

Con objeto de mejorar los niveles de integración se ha ensayado el uso de retrovirus atenuados como vehículo para introducir el DNA (LIN *et al.* 1994; KURITA *et al.* 2004). A pesar de algunos buenos resultados obtenidos, este método tiene bastantes limitaciones, como son: un tamaño límite del DNA a introducir, o la necesidad de altas medidas de seguridad en los primeros pasos de su realización, por lo que su uso se ha visto limitado sólo a ciertos laboratorios. Además, este método no sería aceptable para desarrollar peces destinados al consumo humano. Más recientemente se han empleado elementos transponibles de pez (IMCS *et al.* 1997) para la introducción del DNA, y se han obtenido muy buenos resultados en integración y expresión en pez cebra (DAVIDSON *et al.* 2003), pero no en medaka (GRABHER *et al.* 2003). En cualquier caso su uso no está de momento lo suficientemente extendido como para comparar su eficacia con la de la inyección en el citoplasma, que sigue siendo, por tanto, el método más ampliamente utilizado.

2.2.3. Integración del DNA en el genoma del huésped

Una vez introducido el DNA en una de las células del embrión en desarrollo, éste debe dirigirse al núcleo y posteriormente integrarse en el genoma del organismo huésped. La integración del DNA es un paso limitante en la producción de un pez transgénico. Esta integra-



ción ocurre al azar, o sea el DNA se puede integrar en cualquier sitio del genoma, además, ésta no se produce inmediatamente después de la inyección. En las primeras fases del desarrollo embrionario las células se dividen activamente, y la maquinaria enzimática del huésped empieza a replicar y amplificar el DNA introducido, que todavía es extracromosomal. En medaka, por ejemplo, se puede amplificar de 10 a 12 veces formándose concatémeros de alto peso molecular (WINKLER *et al.* 1991).

En estados de desarrollo embrionario más avanzados se ralentiza la división celular, no hay tanta replicación, y la degradación del DNA exógeno se vuelve más aparente (STUART *et al.* 1988; WINKLER *et al.* 1991; ZHU 1992; VOLCKAERT *et al.* 1994; WU *et al.* 2003). La integración del DNA en el genoma se produce en estas etapas tardías de la embriogénesis, y de manera independiente en las distintas células. Esto da lugar a la aparición de mosaicismo en la generación parental, y puede observarse que no todas las células del organismo contienen el transgén. Además, aquéllas que lo han integrado, presentan distinto número de copias del mismo.

Otra de las consecuencias de la integración tardía es la existencia de mosaicismo también en las células de la línea germinal, lo que dará lugar a una baja frecuencia de transmisión del transgén a la descendencia.

Para mejorar los porcentajes de integración se ha intentado hacer uso de retrovirus o transposones, los cuales presentan otros problemas como comentábamos en el apartado anterior. Por otra parte, para aumentar la integración en la producción de transgénicos por microinyección se ha utilizado la meganucleasa *I-SceI*, y en medaka se ha conseguido elevar los porcentajes de transgénesis hasta un 30% (THERMES *et al.* 2002).

2.2.4. Expresión del gen introducido

Debido a la integración tardía del DNA exógeno en el genoma, el patrón de expresión del gen introducido también presenta mosaicismo, esto es, no todas las células del organismo están expresando el transgén. Además, los niveles de expresión también varían entre individuos, debido a que el número de copias y los sitios de integración del transgén son diferentes.



Con la técnica de microinyección citoplásmica se introducen muchas moléculas de DNA para aumentar su eficiencia, éstas normalmente forman concatémeros antes de la integración, lo que resulta en la inserción de múltiples copias. Esto afecta a la expresión del transgén, ya que la maquinaria celular puede acabar inactivando este DNA extraño mediante metilación o formación de heterocromatina. Para solucionar estos problemas se ha ensayando el uso de secuencias que puedan «aislar» al gen exógeno de la formación de cromatina inactiva a su alrededor (CALDOVIC y HACKETT 1995; CALDOVIC *et al.* 1999).

Otro de los aspectos importantes en la obtención de un pez transgénico es el desarrollo de sistemas que permitan un mejor control de la expresión génica. El control exógeno de la expresión de un transgén en peces es una necesidad tanto en estudios básicos como en trabajos con fines biotecnológicos. Los transgenes deben permanecer silenciados cuando su expresión no es necesaria. La experiencia en peces con promotores inducibles de origen homólogo (metalotioneína, «*heat shock*») no ha resultado satisfactoria, pues, entre otras limitaciones, está la naturaleza de los inductores (metales pesados, stress) que pueden causar efectos colaterales que afecten al animal. En cuanto al uso de sistemas heterólogos, cabe destacar el sistema de regulación por tetraciclina, que ha resultado útil para controlar la expresión génica en ratones transgénicos (FURTH *et al.* 1994; KISTNER *et al.* 1996). Ensayos realizados *in vitro* utilizando una línea celular de peces, e *in vivo* con músculo de lubina (*Dicentrarchus labrax*), han demostrado que se puede obtener un buen control sobre la expresión génica en peces con este sistema (MUÑOZ *et al.* 2005; MUÑOZ 2005).

Para muchas de las aplicaciones de los peces transgénicos, también es deseable el control espacial de la expresión del transgén, de manera que éste sólo se exprese en determinados órganos o tejidos. Este control se puede conseguir usando promotores específicos de tejido para dirigir la expresión del gen exógeno. En peces ya se dispone de algunos promotores caracterizados, que incluyen, entre otros, promotores que permiten una expresión específica en el corazón (SHENTU *et al.* 2003), músculo esquelético (ZENG *et al.* 2005a), oocitos (ONICHTCHOUK *et al.* 2003), células germinales primordiales (YOSHIZAKI *et al.* 2005), hígado



(HER *et al.* 2003; UENO *et al.* 2004), glándula pineal (GOTHILF *et al.* 2002) etc. Es más, estos promotores no sólo permiten restringir la expresión del transgén a un tipo celular determinado, sino que también pueden permitir que éste se exprese en las mismas condiciones fisiológicas en las que lo hace el gen original del que proviene el promotor.

2.2.5. Transmisión a la descendencia

El último paso en la generación de un animal transgénico es conseguir la presencia del gen exógeno en las células de la línea germinal, para asegurar que el transgén pasará a la siguiente generación.

Debido a la integración tardía del DNA en el genoma, la transmisión en peces es baja, con una media inferior al 15% de la descendencia que ha incorporado el transgén. Este porcentaje de transmisión es incluso más bajo en animales con ciclos vitales más largos (2-5%) (FLETCHER *et al.* 1988). Sin embargo, en la segunda generación transgénica (F2) ya se obtiene una transmisión mendeliana. Aun así, pueden aparecer también fenómenos de silenciamiento incluso después de varias generaciones, debido en algunos casos a una recombinación imperfecta entre los concatémeros integrados.

3. APLICACIONES DE LOS PECES TRANSGÉNICOS

Aunque cuantitativamente la mayoría de los estudios de transferencia génica en peces se han llevado a cabo en laboratorios dedicados a investigación básica, también se han realizado considerables progresos utilizando las técnicas de transferencia génica en especies de peces cultivadas. Las aportaciones que la transferencia génica puede hacer a la acuicultura están relacionadas con la introducción de caracteres nuevos o la mejora de caracteres de interés productivo (Tabla 2). Las bases moleculares que determinan algunos de estos caracteres son muy complejas, e implican la acción de distintos genes, en estos casos se necesita un conocimiento previo de cuales son los genes implicados y su modo de acción. A continuación se describen las áreas donde los avances han sido más significativos, aunque cada una se encuentra en una etapa distinta de desarrollo.

3.1. Estudios básicos

El uso de pequeños peces de acuario en estudios básicos relacionados con biomedicina está cada vez más extendido. Entre ellos destacan el pez cebra y la medaka (Figura 5) (WAKAMATSU *et al.* 2001b; WITTBRODT *et al.* 2002; LANGENAU *et al.* 2003; LANGENAU y ZON 2005). La aplicación de técnicas de transferencia génica en peces «de laboratorio» ofrece muchas ventajas comparado con el uso de otros modelos como el ratón. Su facilidad de cultivo y elevada fecundidad (disponibilidad diaria de huevos), unido a un tiempo corto de generación y a la existencia de métodos eficientes de transferencia génica, los hacen muy atractivos para este tipo de estudios. Por otra parte, el hecho de que la fertilización de los huevos y el desarrollo de los embriones sean externos, unido a la transparencia de los mismos en muchas especies, permite la monitorización del desarrollo embrionario y los ha convertido en modelos ideales para estudios de biología del desarrollo.

FIGURA 5.

Fotografía de las principales especies modelo en estudios de transferencia génica en peces. (A) pez cebra, *Danio rerio*. (B) medaka, *Oryzias latipes*.



Más recientemente, se ha incorporado el uso de estos peces como modelos para el estudio de procesos fisiológicos de especies de peces comerciales, cuyos ciclos vitales son más largos, y para los que en muchos casos las técnicas de manipulación génica son inexistentes o más difíciles de aplicar (YAZAWA *et al.* 2006; DAHM y GEISLER 2006).

Aunque de manera menos extendida, también se han utilizado transgénicos de especies de peces comerciales en estudios básicos, con objeto de conocer la función o regulación de genes relacionados



directa o indirectamente con la producción animal (HEW *et al.* 1999; YOSHIZAKI *et al.* 2000; WANG *et al.* 2002).

3.2. Aplicaciones biotecnológicas

3.2.1. Transferencia del gen de la hormona de crecimiento en peces

La habilidad de los salmónidos para responder a la hormona del crecimiento aplicada exógenamente es bien conocida (MCLEAN y DONALDSON 1993). Por tanto, es comprensible que en el área de la transgénesis en peces la aplicación que más atención ha recibido, y la que se ha ensayado en un mayor número de especies, sea el aumento de crecimiento mediante la introducción de copias adicionales del gen de la hormona del crecimiento (GH), y la posterior expresión de altos niveles de esta hormona.

El primer trabajo en el que se introdujo una copia exógena del gen de la GH en un animal fue realizado en ratón (PALMITER *et al.* 1982). Se observó que la expresión de copias extra de este gen producía un aumento extraordinario del crecimiento. La utilización de esta aproximación en especies de peces cultivadas pretende también un aumento en la tasa de crecimiento, con el fin de conseguir ejemplares adultos de mayor talla e índice de conversión.

Esta estrategia se ha ensayado en un gran número de especies, mayormente salmónidos, con construcciones de DNA muy diferentes respecto al origen del gen de la GH y al promotor utilizado. En los primeros experimentos realizados en peces se usaron principalmente genes de la GH de mamíferos y promotores de origen viral o provenientes de mamíferos (Tabla 3). Posteriormente, se han utilizado construcciones de DNA con secuencias de origen piscícola (Tabla 4).

La respuesta a la acción del transgén ha sido muy dispar, desde animales que no han visto incrementado su crecimiento respecto a sus congéneres no transgénicos, hasta aumentos en el crecimiento de más de 20 veces, aunque lo más frecuente ha sido obtener al menos una duplicación del crecimiento. De manera general, la utilización de genes y zonas reguladoras homólogos ofrece mejores resultados que la utilización de transgenes de origen muy distante (LIU *et al.* 1990; BETANCOURT *et al.* 1993; ALAM *et al.* 1996b), además, éstos tendrían



TABLA 2.
Ejemplos de genes introducidos en peces con objetivos biotecnológicos.

Fenotipo esperado	Gen introducido	Promotor	Especie	Referencia
Aumento del crecimiento	Ver tablas 3 y 4			
Resistencia a la congelación y tolerancia al frío	AFP-I de <i>Pseudo-pluronectes americanus</i>	AFP-I de <i>P. americanus</i>	<i>Salmo salar</i>	Hew <i>et al.</i> 1999
	AFP-III de <i>Macrozoarces americanus</i>	AFP-III de <i>M. americanus</i>	<i>Carassius auratus</i>	Wang <i>et al.</i> 1995
Esterilidad	GnRH-III antisentido de <i>S. salar</i>	GnRH-III de <i>S. salar</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Uzbekova <i>et al.</i> 2000
Mayor resistencia a enfermedades				
Resistencia a enfermedades virales	Proteína G de IHNV y VHSV	Mayormente hCMV	Varias especies de salmónidos	Heppell y Davis 2000; Lorenzen y LaPatra 2005
Resistencia a infecciones bacterianas	Lisozima de <i>O. mykiss</i>	AFP de <i>M. americanus</i>	<i>S. salar</i>	Hew <i>et al.</i> 1995
	Lisozima de pollo (lisozima de clara de huevo)	Queratina de <i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Danio rerio</i>	Yazawa <i>et al.</i> 2006
	Cecropina B de la polilla de la seda (<i>H. cecropia</i>)	hCMV	<i>Ictalurus punctatus</i>	Dunham <i>et al.</i> 2002
	Preprocecropina B, procecropina B y Cecropina B de la polilla de la seda, cecropina P1 porcina	hCMV	<i>Oryzias latipes</i>	Sarmasik <i>et al.</i> 2002
Modificación del metabolismo				
Mayor aprovechamiento de carbohidratos	Transportador de glucosa I humano y hexoquinasa II de rata	MT y H3 de <i>Oncorhynchus nerka</i> , hCMV	<i>O. mykiss</i>	Pitkanen <i>et al.</i> 1999a
Mayor asimilación del fósforo	Fitasa de <i>Aspergillus niger</i>		<i>O. latipes</i>	Hostetler <i>et al.</i> 2005
Modificación de la composición de ácidos grasos	Delta5-desaturasa, delta6-desaturasa y elongasa de <i>Oncorhynchus masou</i>	Actina β de <i>O. latipes</i>	<i>D. rerio</i>	Alimuiddin <i>et al.</i> 2005; Alimuiddin <i>et al.</i> 2007
Monitorización de contaminantes	EGFP	Vitelogenina de <i>O. latipes</i>	<i>O. latipes</i>	Zeng <i>et al.</i> 2005b
	EGFP	<i>hsp70</i> de <i>D. rerio</i>	<i>D. rerio</i>	Blechinger <i>et al.</i> 2002
				Legler <i>et al.</i> 2000
	EGFP	<i>hsp70</i> humano	<i>D. rerio</i>	Seok <i>et al.</i> 2006
Biofactorías	Factor VII de coagulación humano	hCMV, cadena pesada de la miosina de rata	<i>D. rerio</i> <i>Clarias gariepinus</i> <i>Oreochromis niloticus</i>	Hwang <i>et al.</i> 2004
	Subunidades α y β de la hormona luteinizante de <i>C. auratus</i>	Actina β de <i>O. latipes</i>	<i>O. mykiss</i>	Morita <i>et al.</i> 2004
Donantes para xenotransplante	Insulina de tilapia «humanizada»	Insulina de <i>O. niloticus</i>	<i>O. niloticus</i>	Pohajdak <i>et al.</i> 2004; Alexander <i>et al.</i> 2006

Abreviaturas: AFP, proteína anticongelante; GnRH, hormona liberadora de las gonadotrofinas; IHNV, virus de la necrosis hematopoyética infecciosa; VHSV, virus de la septicemia hemorrágica viral; hCMV, citomegalovirus humano; MT, metalotioneína; H3, histona 3; *hsp70*, proteína de choque térmico.



TABLA 3.

Ejemplos de peces transgénicos para GH que incluyen promotores y/o genes de mamíferos.

Especie	Promotor	Origen del gen de la GH	Aumento crecimiento ^a	Tiempo de crecimiento	Generación analizada	Referencia
<i>Salmo salar</i>	MT de ratón	humano	ND			ROKKONES <i>et al.</i> 1989
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	SV40	humano	ND			CHOURROUT <i>et al.</i> 1986
	MT de ratón	rata	ND			MACLEAN <i>et al.</i> 1987
	MT de ratón	humano	ND			ROKKONES <i>et al.</i> 1989
<i>Salvelinus alpinus</i>	hCMV	<i>Oncorhynchus nerka</i>	≤1300%	10 meses	Parental	PITKANEN <i>et al.</i> 1999b
<i>Oreochromis niloticus</i>	MT de ratón	humano	ND			BREM <i>et al.</i> 1988
<i>Oreochromis hornorum</i>	hCMV	<i>O. niloticus</i>	82%	9 meses	F1	MARTINEZ <i>et al.</i> 1996
	hCMV	<i>O. niloticus</i>	62%	7 meses	F2	MARTINEZ <i>et al.</i> 1999
<i>Ictalurus punctatus</i>	RSV	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	≤26%		F1	DUNHAM <i>et al.</i> 1992
	RSV	<i>O. mykiss</i>	0%		F1	DUNHAM <i>et al.</i> 1992
	MT de ratón	humano	ND			DUNHAM 1987
<i>Carassius auratus</i>	MT de ratón	humano	78 a 110%	7 meses	Parental	ZHU 1992
<i>Cyprinus carpio</i>	MT de ratón	humano	9,4 a 40%	5 meses	Parental	ZHU 1992
			48%	2 meses	F4	FU <i>et al.</i> 1998
	RSV	<i>O. mykiss</i>	20 a 40%	3 meses	F1	CHEN <i>et al.</i> 1993
<i>Catla catla</i>	RSV	<i>O. mykiss</i>	ND			SARANGI <i>et al.</i> 1999
<i>Cirrhinus mrigala</i>	RSV	<i>O. mykiss</i>	ND			SARANGI <i>et al.</i> 1999
<i>Labeo rohita</i>	RSV	<i>O. mykiss</i>	ND			SARANGI <i>et al.</i> 1999
	hCMV	<i>L. rohita</i>	300%	9 meses	Parental	VENUGOPAL <i>et al.</i> 2004
<i>Esox lucius</i>	RSV	bovino	30%	14 meses	Parental	GROSS <i>et al.</i> 1992
<i>Misgurnus mizolepis</i>	MT de ratón	humano	≤360%	1,5 meses	Parental	ZHU 1992
			≤280%	4,5 meses		

^a Calculado como: Diferencia de peso entre el animal transgénico y el control expresada en % respecto al peso del animal control.

Abreviaturas: MT, metalotioneína; SV40, virus vacuolante de los monos (*simian virus 40*); hCMV, citomegalovirus humano; RSV, virus del sarcoma de Rous; ND, no documentado.

una mejor aceptación pública. Esa variabilidad de respuesta es debida también a otros factores. Por una parte influye el sitio de integración del transgén, el número de copias integradas y el nivel de expresión del mismo. Esta influencia se observa en diferentes líneas transgénicas de una misma especie y construcción de DNA, donde la expresión obtenida puede llegar a ser muy variable (RAHMAN *et al.* 2000; MACLEAN *et al.* 2002). También se ha observado que aquellos promotores que



ofrecen una expresión constitutiva y ubicua suelen dar mejores resultados en cuanto a tasas de crecimiento de los animales. Por el contrario, en una línea de trucha arcoiris no se observó crecimiento utilizando un promotor específico para pituitaria, que es el sitio natural de expresión del gen de la GH (PITKANEN *et al.* 1999b).

La respuesta a una misma construcción de DNA también puede variar entre especies, y se ha visto que generalmente en los salmónidos se obtienen mejores resultados. Se ha sugerido que esto puede deberse a que los salmónidos muestran disminuciones estacionarias del crecimiento, mientras que otros peces crecen a tasas casi máximas a lo largo de todo el año (DEVLIN 1997). El patrimonio genético es otro de los factores que influyen en la respuesta del animal al transgén de la GH. Experimentos de transgénesis para GH realizados con dos cepas de trucha arcoiris, una salvaje y otra domesticada, mostraron un aumento en el crecimiento de las truchas salvajes, que de manera natural tienen una tasa baja de crecimiento. Sin embargo, en la cepa domesticada, que tenía una tasa de crecimiento más rápida, la acción del transgén no causó un crecimiento adicional (DEVLIN *et al.* 2001).

Para determinar el rendimiento de un transgénico para GH respecto a sus hermanos no modificados, éstos deben evaluarse en condiciones que se asemejen en lo posible a las de producción comercial. Aunque hay indicios de que se están realizando experimentos a gran escala con tilapias transgénicas en Cuba (CARR 1999) y con carpa común en China (FU *et al.* 2005), son pocos los experimentos de este tipo que han sido publicados. Uno de ellos se llevó a cabo en EEUU, se usó una variedad de la carpa común que contenía el gen de la GH de trucha arcoiris precedido por un promotor viral. El número de copias del transgén en esta línea era de 1 a 5, y en experimentos en laboratorio se había observado un aumento en la tasa de crecimiento de un 20%. En este experimento de campo, que duró un año, se observó mucha variación entre lotes en cuanto a aumento del crecimiento, algunos lotes mostraron más de un 50% de mejora sobre los controles no transgénicos y otros crecieron menos que los lotes control (CHEN *et al.* 1993; CHEN *et al.* 1996). Otra de las pruebas a gran escala bien documentadas se realizó con una línea de *I. punctatus*, que contenía la misma construcción de DNA que en el caso anterior. En el laboratorio los peces trans-



TABLA 4.

Ejemplos de peces transgénicos para GH que incluyen promotores y genes de peces.

Especie	Promotor	Origen del gen de la GH	Aumento del crecimiento ^a	Tiempo de crecimiento	Generación analizada	Referencia
<i>Salmo salar</i>	AFP de <i>Macrozoarces americanus</i>	<i>O. tschawhytscha</i>	100 a 1200%	12 meses	Parental	Du <i>et al.</i> 1992
	AFP de <i>M. americanus</i>	<i>O. tschawhytscha</i>	420%		F1	Hew <i>et al.</i> 1995
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	MT de <i>Oncorhynchus nerka</i>	<i>O. nerka</i>	500 a 1000%	12 meses	Parental	DEVLIN <i>et al.</i> 1994
	AFP de <i>M. americanus</i>	<i>O. tschawhytscha</i>	260%	5 meses	Parental	DEVLIN <i>et al.</i> 1995
			1000%	15 meses	Parental	DEVLIN <i>et al.</i> 1995
<i>Oncorhynchus tschawhytscha</i>	AFP de <i>M. americanus</i>	<i>O. tschawhytscha</i>	500%	19 meses	Parental	DEVLIN <i>et al.</i> 1995
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AFP de <i>M. americanus</i>	<i>O. tschawhytscha</i>	215%	10 meses	Parental	DEVLIN <i>et al.</i> 1995
	GH de <i>O. nerka</i>	<i>O. nerka</i>	0%	-	Parental	PITKANEN <i>et al.</i> 1999b
	MT de <i>O. nerka</i>	<i>O. nerka</i>	1630%	14 meses	F1	DEVLIN <i>et al.</i> 2001
<i>Oncorhynchus clarki</i>	AFP <i>M. americanus</i>	<i>O. tschawhytscha</i>	ND		Parental	DEVLIN <i>et al.</i> 1995
<i>Salvelinus alpinus</i>	MT de <i>O. nerka</i>	<i>O. nerka</i>	≤1300%	10 meses	Parental	PITKANEN <i>et al.</i> 1999b
	H3 de <i>O. nerka</i>	<i>O. nerka</i>	≤1300%	10 meses	Parental	PITKANEN <i>et al.</i> 1999b
	GH de <i>O. nerka</i>	<i>O. nerka</i>	0	-	Parental	PITKANEN <i>et al.</i> 1999b
<i>Oreochromis niloticus</i>	AFP de <i>M. americanus</i>	<i>O. tschawhytscha</i>	200%	7 meses	F2	RAHMAN <i>et al.</i> 1998; RAHMAN y MACLEAN 1999; RAHMAN <i>et al.</i> 2001
	MT de <i>O. nerka</i>	<i>O. nerka</i>	0%		F1	RAHMAN <i>et al.</i> 1998
<i>Heteropneustes fossilis</i>	Zona pellucida de <i>Pseudopleuronectes americanus</i>	<i>Taius tumifrons</i> <i>O. mykiss</i>	30-60%	10 meses	Parental	SHEELA <i>et al.</i> 1999
<i>Cyprinus carpio</i>	Actina β de <i>C. carpio</i>	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	42-80%	5 meses	F1	WANG 2001
	Actina β de <i>C. carpio</i>	<i>O. tschawhytscha</i>	200%	3 meses	F2	HINITIS y MOAV 1999
	Actina β de <i>C. carpio</i>	<i>C. carpio</i>	260%	3 meses	F1	HINITIS y MOAV 1999
<i>Labeo rohita</i>	Actina β de <i>C. idellus</i>	<i>L. rohita</i>	350 a 480%	9 meses	Parental	VENUGOPAL <i>et al.</i> 2004
<i>Misgurnus mizolepis</i>	AFP <i>M. americanus</i>	<i>O. tschawhytscha</i>	130%	5 meses	Parental	TSAI <i>et al.</i> 1995
	Actina β de <i>M. mizolepis</i>	<i>M. mizolepis</i>	≤3400%	6 meses	F1	NAM <i>et al.</i> 2001; NAM <i>et al.</i> 2002

^a Calculado como: Diferencia de peso entre el animal transgénico y el control expresada en % respecto al peso del animal control. Abreviaturas: AFP, proteína anticongelante; MT, metalotioneína; H3, histona 3; ND, no documentado.

génicos habían crecido un 58% más rápido que los controles, pero los resultados del estudio de campo fueron dispares. En algunas familias los animales transgénicos incrementaron la tasa de crecimiento entre



un 23 y un 26 %, pero otros no mostraron ninguna mejora sobre los peces control (DUNHAM *et al.* 1992). Una tercera prueba a gran escala se realizó con una línea de tilapia transgénica que contenía el gen de la GH de salmón chinook bajo el control del promotor del gen de la proteína anticongelante (AFP, *antifreeze protein*) de *M. americanus*. El experimento duró 7 meses, al final de este periodo los peces transgénicos mostraron un aumento del peso de más del doble (2,5 veces más) respecto a los no transgénicos, y una mejor eficiencia de conversión del alimento (MACLEAN y LAIGHT 2000; RAHMAN *et al.* 2001).

El mecanismo que subyace al incremento de crecimiento no está claro. Puede deberse a una mayor tasa de conversión del alimento o a una mayor tasa de consumo de alimento, aunque algunos estudios han indicado que los peces transgénicos para la GH son metabolíticamente más eficientes que los no transgénicos (KRASNOV *et al.* 1999; MARTINEZ *et al.* 2000; RAHMAN *et al.* 2001). Con un impacto tan grande sobre el crecimiento es de esperar que la expresión del gen exógeno de la GH tenga otras manifestaciones fisiológicas, además de influir en el comportamiento del animal y en su bienestar. Todas estas cuestiones deben estudiarse si se pretende la comercialización de alguna de estas líneas, pero todavía existen pocos estudios de este tipo. Se debe tener en cuenta que cada línea transgénica es única pues el acervo genético, el tipo de construcción de DNA utilizada y el sitio de integración van a influir en el resultado final. Además, el fenotipo final se verá influido también por el ambiente. Solamente se han realizado estudios esclarecedores (HALLERMAN *et al.* 2007) de la influencia de este transgén en la fisiología y el comportamiento de los peces en una línea de salmón «coho» (*Oncorhynchus kisutch*) (DEVLIN *et al.* 1994, Tabla 4). Aparte de éste, hay otros tres casos en los que el desarrollo de líneas transgénicas está bastante avanzado, y en los que se ha planteado su comercialización (HALLERMAN *et al.* 2007). Se trata de líneas transgénicas para GH de salmón atlántico (*Salmo salar*) (HEW *et al.* 1995), tilapia (MARTINEZ *et al.* 1996) y carpa común (WU *et al.* 2003).

De manera general, se ha observado que en estos peces transgénicos existe un aumento en la síntesis de proteínas y la movilización de lípidos, lo que afecta no sólo al crecimiento sino también a la tasa metabólica, la composición corporal, la morfología del cuerpo y la edad de maduración sexual (HALLERMAN *et al.* 2007). En salmónidos se han observado



cambios en el color de la piel o en la forma de la cabeza (DEVLIN 1997). Sin embargo, en tilapia no se han observado anomalías (RAHMAN *et al.* 2001). Debido a un aumento en la avidez por el alimento también se ha observado una mayor actividad y agresividad, y un menor temor a exponerse a los depredadores (SUNDSTROM *et al.* 2004), y en algunos casos una habilidad reducida para nadar (FARRELL *et al.* 1997). Todos ellos son parámetros con claras implicaciones en el bienestar animal. Recientemente, se ha estudiado la expresión hepática en la línea de salmón «coho» nombrada anteriormente, utilizando distintas plataformas de «microarrays». Se han identificado variaciones de expresión en genes implicados en el metabolismo del hierro, función mitocondrial, metabolismo de carbohidratos, proliferación celular, inmunidad innata y mantenimiento de los niveles de hemoglobina (RISE *et al.* 2006). Todo ello apunta a que ciertas rutas hepáticas y funciones biológicas están alteradas por el transgén introducido, y el crecimiento que éste produce. En *Oncorhynchus masou* transgénico para GH, también se han estudiado cambios de expresión génica en el hígado, y se ha visto que este salmón transgénico tiene alterada la expresión de genes relacionados con el metabolismo del hierro, la reproducción, el crecimiento y la inmunidad innata. Es más, la actividad lisozima en el suero estaba significativamente reducida en estos animales transgénicos (MORI *et al.* 2007). Sin embargo, en carpa común, se ha visto que la GH exógena podría ejercer una acción estimuladora sobre la inmunidad no específica (HALLERMAN *et al.* 2007; WANG *et al.* 2006).

Todos estos conocimientos son de interés práctico, pues el comportamiento y bienestar de de estos peces puede afectar al diseño y gestión de los sistemas de producción. Por ejemplo, un aumento de avidez por el alimento en los peces transgénicos puede aumentar la agresividad y el stress y llevar a un menor crecimiento. Esto quizás se podría evitar alimentando frecuentemente y en muchos puntos distintos del recipiente de cultivo (HALLERMAN *et al.* 2007).

Como se ha comentado anteriormente, se han dado pasos para poder comercializar líneas transgénicas que expresen un gen adicional de la GH. Aqua Bounty Technologies Inc. ha solicitado la aprobación de un salmón atlántico transgénico para GH que intenta comercializar bajo el nombre de salmón *AquAdvantage*TM (NILER 2000; FLETCHER *et al.*



2004; LESHER 2004). Esta petición se encuentra en proceso de revisión por la *Food and Drug Administration* (FDA) de EEUU. Por otra parte, el gobierno cubano está considerando una petición de producción de tilapia transgénica para GH (GUILLEN *et al.* 1999), y ya se han producido en ese país toneladas de esta tilapia transgénica (CARR 1999). En China, una línea de carpa común transgénica, que incluye una construcción basada íntegramente en secuencias de origen piscícola, espera para ser presentada al Comité Nacional de Bioseguridad de Transgénicos de ese país, de momento aún se necesitan estudios adicionales sobre el impacto ambiental y la bioseguridad de estas carpas de crecimiento rápido (WU *et al.* 2003; FU *et al.* 2005).

3.2.2. Peces resistentes al frío

Muchos teleósteos marinos que habitan aguas polares con temperaturas de hasta -1.9°C producen una serie de proteínas que les permiten evitar la congelación. Se conocen cuatro tipos de estas proteínas anticongelantes: AFP tipo I, II, III y IV; así como un tipo de glicoproteína anticongelante. Estas proteínas actúan uniéndose a los cristales de hielo que se empiezan a formar en el animal e inhibiendo su crecimiento, lo que disminuye la temperatura de congelación del organismo. Los genes que codifican estas proteínas se han clonado en distintas especies de peces, la mayoría de ellos se expresan en el hígado y en algunos casos muestran claros cambios de expresión estacionales. En algunos peces también se ha observado expresión en piel, branquias y otros tejidos periféricos (FLETCHER *et al.* 2001; ZHONG y FAN 2002; DAVIES *et al.* 2002; HARDING *et al.* 2003).

El uso de los genes de las AFPs en la producción de animales transgénicos ha venido mayormente motivado por la posibilidad de cultivar salmón atlántico en latitudes más extremas de la costa Este de Canadá; generando líneas de salmón resistentes a la congelación. Con este objetivo, se introdujo en salmón atlántico el gen de una AFP de tipo I del pez plano *Pseudo-pluronectes americanus*, bajo el control de su propio promotor. Se demostró que el transgén estaba integrado en el genoma del pez, y se transmitía a las generaciones sucesivas (FLETCHER *et al.* 1988; SHEARS *et al.* 1991). Este gen se expresaba específicamente en hígado y se observaron variaciones estacionales



de expresión muy similares a las que se producen en el pez original, además, ensayos *in vitro* mostraron actividad anticongelante en el suero de la tercera generación de peces transgénicos. Sin embargo, estos animales no eran resistentes a la congelación. Esto se debe a dos circunstancias, por una parte a que el salmón atlántico carece de las endopeptidasas necesarias para procesar el precursor de la AFP, y obtener así la proteína madura totalmente activa. Por otra parte, la expresión del gen es demasiado baja para conferir resistencia al frío, ya que éste está presente en copia única en estos salmones transgénicos, mientras que en *P. americanus* los genes AFP se encuentran en multicopia (HEW *et al.* 1988). Esto se traduce en niveles de AFP en suero aproximadamente 100 veces menores en el salmón transgénico que en el pez original (250 µg/ml vs. 10-20 mg/ml), lo que no es suficiente para conferir resistencia a la congelación (HEW *et al.* 1999). Estos resultados podrían mejorarse intentando la expresión de múltiples copias del gen de la AFP y utilizando otras AFPs con mayor actividad anticongelante.

Además de la resistencia a la congelación, la tolerancia a aguas frías podría ser interesante en el cultivo de algunas especies de aguas templadas. La falta de tolerancia al frío de la carpa común produce, algunos inviernos, fuertes pérdidas en su cultivo en China. De manera similar, en Israel, se producen grandes pérdidas de tilapia en inviernos especialmente fríos (MACLEAN 2003). Hay algunas evidencias que muestran que el uso de genes de AFPs podría ser útil para paliar estos problemas. En la especie modelo carpa roja se introdujo un gen de la AFP de tipo III, procedente de *M. americanus*, que codifica la proteína madura. La proteína AFP madura se expresaba en las generaciones F1 y F2, y aunque los niveles de expresión eran 1000 menores que en el pez original, se observó que estos peces transgénicos toleraban temperaturas frías, a las cuales no podían sobrevivir sus congéneres no transgénicos (WANG *et al.* 1995). En el caso de tilapia no se han desarrollado ejemplares transgénicos que expresen AFP, pero si se ha comprobado que la administración de AFP a individuos juveniles aumenta la tolerancia al frío, comparando con tilapias control no tratadas (WU *et al.* 1998). Por lo tanto, el desarrollo de líneas transgénicas de este tipo podría ser beneficioso en el cultivo de ciertas especies de



peces, en países donde las temperaturas invernales están cercanas a los límites fisiológicos de estas especies.

3.2.3. Peces estériles

La producción y utilización de peces estériles puede ofrecer beneficios a la acuicultura. El uso de animales estériles permitiría que el metabolismo del pez no invirtiera recursos en el crecimiento gonadal, lo que podría favorecer el crecimiento somático y el desarrollo de músculo comestible. El desarrollo de peces transgénicos para cualquier carácter, pero que además fueran estériles, reduciría drásticamente el impacto ambiental de un eventual escape de esos transgénicos, ya que impediría que éstos se aparearan con peces salvajes introduciendo así en el ambiente el gen modificado.

La inducción de la esterilidad en peces implica manipulación génica. Así, se han desarrollado métodos para la producción de peces triploides (véase capítulo 10) que son estériles. La tecnología transgénica también ofrece la posibilidad de producir peces estériles, mediante el bloqueo de la hormona liberadora de las gonadotrofinas (GnRH) (ANDERSEN *et al.* 1992). Esta estrategia se ha inspirado en experimentos con ratones hipogonadales (MASON *et al.* 1986), donde una delección en el gen de la GnRH reducía los niveles de gonadotrofinas de manera que estos ratones eran estériles. Así pues, poder reemplazar el gen de la GnRH por una copia no funcional podría producir peces estériles. El problema, como ya hemos explicado anteriormente, es que la tecnología «*knock-out*» no está disponible en peces; por ello, se han ideado otras estrategias para reducir la expresión de este gen, y así anular su acción. En este caso se ha intentado utilizar tecnología antisentido, aunque ésta presenta muchos inconvenientes (GURA 1995). La idea de esta técnica es producir un RNA que sea complementario del RNA de un gen específico, de manera que se produzca hibridación entre estas dos moléculas, impidiendo que el RNA se traduzca a proteína.

El primer intento de aplicar tecnología antisentido para bloquear la acción de la GnRH se ensayó en trucha arcoiris. La construcción introducida contenía un cDNA antisentido del cDNA de la GnRH-III, proveniente de salmón atlántico. Como promotor se utilizó el propio del gen de la GnRH. Se logró integración en el genoma, transmisión a



la línea germinal y presencia del RNA antisentido principalmente en el cerebro. Se observó que efectivamente la producción de RNA mensajero de GnRH-III endógeno había disminuido en el cerebro, pero los niveles de gonadotrofinas no se vieron afectados y los peces no eran estériles, pues alcanzaron la maduración sexual (UZBEKOVA *et al.* 2000).

Aparte de problemas con la propia técnica antisentido, la no obtención de animales estériles se podría explicar por el hecho de que en peces se conocen tres formas de GnRHs, codificadas por tres genes distintos, GnRH-I, GnRH-II y GnRH-III. Algunas especies de peces poseen los tres genes, mientras que en el caso expuesto anteriormente, así como en el resto de salmónidos, existen sólo dos de ellas GnRH-II y GnRH-III. Conocer en profundidad cual es la función de cada una ayudará a diseñar estrategias más validas en el futuro.

En tilapia se están desarrollando líneas que incluyen dos tipos de construcciones antisentido, contra los genes GnRH-I y GnRH-III (MACLEAN *et al.* 2002), aunque todavía no existen datos sobre su comportamiento. Por otra parte, un grupo de investigadores chinos ha utilizado una construcción antisentido para el gen GnRH-III de carpa, bajo el control de promotor de la actina β de carpa. Tras su introducción en esta especie, han determinado que aproximadamente un 30% de la población parental no desarrolla gónadas (Hu *et al.* 2006), pero los datos y experimentos completos de este trabajo no están publicados todavía.

Una ventaja que tiene este tipo de aproximación para conseguir peces estériles, frente a otras como la producción de triploides (véase capítulo 10), es la posibilidad de revertir esa esterilidad a demanda mediante inyección con GnRH. De esta manera, estos peces podrían reproducirse, aunque su progenie seguiría siendo estéril. Esta reversión mediante inyección con GnRH se ha comprobado en un modelo de ratón que porta una mutación en el gen de la GnRH (SEEBURG 1987).

3.2.4. Peces resistentes a enfermedades

Las condiciones de hacinamiento utilizadas en el cultivo intensivo de peces hacen que éstos sean susceptibles de padecer distintas enfermedades originadas por virus, bacterias, protozoos u hongos. Mejorar la resistencia a patógenos en peces cultivados es un reto importante en piscicultura. Se han propuesto diversas estrategias para



abordar este problema utilizando técnicas de transferencia génica. Estas aproximaciones tienen dos metas distintas, o bien la resistencia a patógenos virales específicos, o bien el aumento de la resistencia general a infecciones bacterianas.

Las vacunas de DNA son, hasta el momento, la herramienta de transferencia génica más desarrollada para combatir patógenos virales. Estas vacunas se basan en una construcción de DNA que contiene el gen codificante de una proteína antigénica, generalmente se trata de una proteína de la capsida del virus diana. Este DNA se inyecta generalmente en el músculo del animal, allí, el gen introducido se expresa, dando lugar a la producción de antígeno que estimula la producción de anticuerpos. En cualquier caso, la vacunación con DNA no puede considerarse una tecnología transgénica estrictamente, ya que la línea germinal del animal no se ve afectada, ni tampoco hay evidencias de integración de ese DNA en el genoma. Se han desarrollado vacunas de DNA eficientes contra ciertos virus patógenos, como el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) (revisado en LORENZEN *et al.* 2002; KURATH 2005; BIERING 2005). De hecho, la empresa Novartis ya ha presentado la primera vacuna de DNA contra el IHNV para salmón atlántico, llamada Apex-IHN®. Ésta ha sido aprobada por la Agencia de Inspección Alimentaria de Canadá para su comercialización.

Otra estrategia para atacar dianas virales específicas se basa en el uso de ribozimas. Los ribozimas son moléculas de RNA con actividad catalítica que posibilitan el corte de RNAs mensajeros específicos en sitios determinados, lo que puede servir para destruir RNAs virales. Se ha ensayado la posibilidad de inhibir al virus de la necrosis pancreática infecciosa usando ribozimas de tipo «cabeza de martillo» (CHEN *et al.* 2000).

Para aumentar la resistencia general a infecciones bacterianas se ha propuesto el uso de genes que codifiquen proteínas antimicrobianas. Una de las proteínas antimicrobianas mejor caracterizadas es la lisozima. Las lisozimas son hidrolasas que rompen cierto tipo de enlaces presentes en las paredes celulares bacterianas. Estos enzimas se encuentran en muchos tejidos de vertebrados superiores y pertenecen al sistema inmunitario innato. Existen varios tipos de lisozimas,



que muestran actividades líticas diferentes sobre distintas especies bacterianas. La lisozima de trucha arcoiris es un potente agente antibacteriano contra muchas bacterias gram-positivas, el gen que la codifica, bajo el control del promotor AFP de *M. americanus*, se utilizó para generar salmones transgénicos (Hew *et al.* 1995), aunque no se conoce de momento si esta estrategia fue efectiva para aumentar la resistencia a las infecciones. Recientemente, se han generado pez cebra transgénicos que contienen el gen de la lisozima de pollo (lisozima de la clara de huevo), bajo el control del promotor de la queratina de hirame (*Paralichthys olivaceus*). En la F2 de esta línea transgénica la expresión de este gen era fuerte en tejido epitelial, hígado y branquias. Se realizaron retos con dos especies bacterianas que suelen ser patógenas para hirame, y sobre las cuales las lisozimas propias de este pez muestran una actividad lítica muy reducida, pero no así la lisozima de la clara de huevo. En esos experimentos entre un 60-65% de los pez cebra transgénicos sobrevivieron a las infecciones, mientras que el 100% de los peces control murieron, lo que demuestra que esta estrategia podría ser útil para proporcionar una mayor resistencia a enfermedades bacterianas en esa especie (YAZAWA *et al.* 2006).

En esta misma línea, se ha introducido el gen de la cecropina de la polilla de la seda en *I. punctatus* (DUNHAM *et al.* 2002) y en medaka (SARMASIK *et al.* 2002), y se han desarrollado líneas transgénicas. Las cecropinas son pequeños péptidos catiónicos que poseen algunos insectos, y que presentan actividad bactericida contra un amplio espectro de bacterias. No son tóxicos para eucariotas, ya que algunos mamíferos como el cerdo también los sintetizan. La exposición de estos peces transgénicos a la acción de distintas bacterias patógenas para peces demostró que la expresión de cecropinas confería una resistencia significativamente mayor a la infección bacteriana en estos peces respecto a los controles.

Por último, también se ha propuesto la transferencia y expresión de genes implicados en la defensa inmunitaria, como son los interferones y las citoquinas, para de esta manera estimular el sistema inmunitario. A medida que se identifiquen y caractericen nuevos genes y proteínas implicados en distintas enfermedades se podrán diseñar nuevas estrategias biotecnológicas para combatirlas.



3.2.5. Modificaciones en el metabolismo

Una de las aplicaciones de la transgénesis en este campo ha ido encaminada a modificar el metabolismo digestivo, para que los peces puedan aprovechar mejor los hidratos de carbono. La capacidad para utilizar los carbohidratos de las dietas varía entre las distintas especies de teleósteos, pero en cualquier caso es muy baja si la comparamos con la que presentan los animales de granja terrestres. En muchas especies de peces, mejorar la utilización de los carbohidratos permitiría utilizar dietas que contuvieran estas moléculas como fuentes de energía. Estudios en este campo sugieren que esta deficiencia en los peces podría estar relacionada con dificultades en el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática. Para comprobar esta hipótesis, y evaluar su potencial en la mejora del metabolismo de carbohidratos en salmónidos, se transfirieron los genes del transportador de la glucosa tipo 1 humano, y la hexoquinasa tipo 2 de rata, a dos especies de peces salmónidos (PITKANEN *et al.* 1999a). Desafortunadamente no se pudo obtener una evidencia directa de la funcionalidad de estos genes para mejorar el metabolismo de los hidratos de carbono en estos peces, debido a problemas de mosaicismo que hacían difícil interpretar los resultados.

De manera similar, se ha pretendido mejorar el metabolismo del fósforo en peces. La mayoría del fósforo que contienen las semillas incluidas en los piensos para alimentación animal se encuentra en forma de fitato, el cual es indigerible excepto para los animales rumiantes. El fósforo es necesario para el crecimiento, y para aportarlo en la dieta los piensos deben enriquecerse de forma artificial con fósforo inorgánico, lo que encarece su producción enormemente. Por otro lado, el fósforo fitato no digerido se convierte en un elemento contaminante importante. El gen de la fitasa, aislado del hongo filamentoso *Aspergillus niger*, se ha transferido a medaka, y se ha comprobado que la enzima recombinante que producen estos peces es activa. Además, estas medakas transgénicas tienen tasas de supervivencia hasta 6 veces mayores que los controles no transgénicos, al consumir dietas con fitato como única fuente de fósforo (HOSTETLER *et al.* 2005).

Otra serie de experimentos están encaminados a modificar la composición de ácidos grasos en peces. Ciertos ácidos grasos, como el



ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA), tienen importantes beneficios nutricionales para los humanos. Los peces son una de las fuentes más importantes para aportar estos ácidos grasos a la alimentación humana. Sin embargo, la inclusión creciente de aceites vegetales en las dietas de los peces cultivados, en detrimento del aceite de pescado, ha llevado a una reducción de la calidad de la carne en cuanto a contenido de EPA y DHA (BELL *et al.* 2002), ya que los peces necesitan de estos ácidos grasos o sus precursores en sus dietas para contenerlos. Buscando estrategias de transferencia génica que permitan paliar este problema, se han desarrollado recientemente tres líneas transgénicas de pez cebra, una que expresa copias adicionales del gen de la delta6-desaturasa, otra que expresa el gen de la delta5-desaturasa, y una tercera no publicada que expresa el gen de la elongasa; todos estos genes provienen de *O. masou* y se encuentran bajo el control del promotor de la actina β de medaka. Las enzimas que codifican estos genes pertenecen a la ruta de biosíntesis de EPA y DHA. En las tres líneas transgénicas se ha observado un aumento en el contenido de los ácidos grasos mencionados anteriormente, respecto a sus controles no transgénicos, pero este incremento ha sido mayor en la línea que sobreexpresaba delta6-desaturasa, lo que sugiere que esta actividad enzimática puede ser el paso limitante en la producción de EPA y DHA en pez cebra (ALIMUDDIN *et al.* 2005, 2007).

3.2.6. Peces transgénicos y toxicología ambiental

El uso de peces transgénicos en toxicología ambiental está todavía poco explotado. La idea es utilizar ciertos peces modelo como sistemas de detección de contaminantes en el agua. Así, ya existen líneas de pez cebra y medaka que contienen un gen indicador, normalmente el de la GFP o la luciferasa de luciérnaga, cuya expresión está bajo el control de un elemento inducible por algún contaminante del agua (MACLEAN 1998; LEGLER *et al.* 2000; CARVAN 2000; CARVAN *et al.* 2001; MATTINGLY *et al.* 2001; MAYER *et al.* 2003; ZENG *et al.* 2005b; SEOK *et al.* 2006). Se han utilizado promotores de «*heat shock*», promotores que responden a metales pesados, a hidrocarburos aromáticos, o a compuestos estrogénicos. Para detectar estos compuestos contaminantes los peces se sitúan en el agua que supuestamente los contiene. Tras la



incorporación de estos compuestos, su distribución y acumulación en los distintos tejidos del pez, éstos son capaces de activar los promotores diana dando lugar a la expresión del gen indicador. La proteína marcadora sintetizada se puede monitorizar fácilmente en los peces.

Otra aproximación, en el área de la toxicología ambiental, son las líneas de peces transgénicos pensadas para valorar el poder mutagénico de algunos compuestos químicos y contaminantes del agua (AMANUMA *et al.* 2000; WINN *et al.* 2000; WINN 2001). Estos peces contienen en su genoma un gen que actúa como diana mutacional. El gen diana se separa posteriormente del DNA genómico, y se transfiere a un sistema bacteriano especializado para cuantificar las mutaciones.

3.2.7. Peces como biofactorías

Aunque no se han conseguido todavía resultados significativos en este campo, la utilización de peces transgénicos para producir proteínas con interés terapéutico o industrial ampliaría considerablemente las aplicaciones e intereses de la acuicultura. Los peces, al igual que otros eucariotas, pueden producir todas las modificaciones post-traduccionales necesarias para obtener una proteína activa, pero además presentan ciertas ventajas respecto a otros animales, sobre todo mamíferos, para su uso como biofactorías: un desarrollo rápido, bajo coste de producción, y la ausencia de riesgo de transferencia de retrovirus y ciertas enfermedades al hombre. Algunos autores han demostrado que el músculo de pez cebra puede utilizarse eficientemente como biorreactor (GONG *et al.* 2003). Maclean y colaboradores están trabajando con tilapias transgénicas para la producción del factor VII de coagulación humano (HWANG *et al.* 2004), y su posterior purificación a partir de embriones o suero del pez. Este factor de coagulación es una glicoproteína que participa en la cascada de coagulación sanguínea, y se usa para el tratamiento de la hemofilia y otros problemas de coagulación. Tradicionalmente esta proteína se obtenía por fraccionamiento a partir de plasma humano, pero esta práctica está en desuso por problemas de transmisión de enfermedades. Como alternativa está su producción como proteína recombinante en cultivos *in vitro*, pero este sistema no es viable por su elevado precio. Las ventajas de su obtención a partir tilapias transgénicas incluyen, entre otras, el bajo



coste de este procedimiento, debido a la facilidad de mantenimiento del animal y a su corto tiempo de generación.

Recientemente, también se ha ensayado la producción de hormona luteinizante bioactiva en embriones de trucha (MORITA *et al.* 2004)

3.2.8. Peces para xenotransplante

Para el tratamiento de la diabetes tipo I en humanos, se está desarrollando un modelo de xenotransplante utilizando tilapia como donante. Se han producido tilapias transgénicas que expresan una insulina «humanizada» en sus corpúsculos de Brockmann, para posteriormente utilizar estos corpúsculos para transplante. La tilapia ofrece varias ventajas frente a otros donantes más convencionales como el cerdo. Por una parte los corpúsculos de Brockmann, equivalentes a los islotes del páncreas de mamíferos, pueden aislarse fácilmente, mientras que en mamíferos se necesitan procedimientos complejos para su aislamiento. Además, los islotes de tilapia son mucho más resistentes a la hipoxia que los de mamífero; esto permite transplantarlos encapsulados, lo que evitaría la infiltración y el rechazo por parte del sistema inmunitario del huesped. Siguiendo esta metodología se transplantaron islotes de tilapia transgénica a ratones diabéticos, y éstos mantuvieron niveles normales de glucosa gracias a la producción de insulina por parte de los corpúsculos transplantados (WRIGHT Y POHAJDAK 2001; POHAJDAK *et al.* 2004; ALEXANDER *et al.* 2006).

Lo expuesto anteriormente pretende ilustrar la variedad de ámbitos en los que se está aplicando la transferencia génica en peces. También queda patente que la mayoría de las aplicaciones de la transgénesis en peces están en fase de desarrollo, y continúan relegadas exclusivamente al plano de la investigación. Esto se debe fundamentalmente a dos razones: la necesidad de poseer un conocimiento más profundo de la acción de los genes en peces, y la falta de una técnica verdaderamente eficaz para la producción de transgénicos. Por esto, muchos de los esfuerzos actuales en transferencia génica en peces están enfocados a la mejora de las distintas etapas de este proceso, con el objeto de que la producción de peces transgénicos sea una tecnología eficaz y predecible.

Aun así, ya existen peces transgénicos comercializados. La empresa GloFish™ comercializa peces cebras transgénicos que contienen distin-



tas variantes del gen de la GFP (<http://www.glofish.com>). Expuestos a la luz adecuada, éstos pueden verse de diferentes colores. Estos peces se comercializan como peces ornamentales no destinados al consumo humano.

4. EVALUACIÓN Y MANEJO DE RIESGOS

Pese a no existir ningún pez transgénico comercializado para el consumo humano, estos animales ya han despertado grandes polémicas sobre todo en Europa y Norteamérica. Para superar estas inquietudes, y poder desarrollar una tecnología segura, es necesario elaborar un buen plan de evaluación de riesgos, que se acompañe de metodología para la disminución o eliminación de los mismos. Los riesgos a tener en cuenta se engloban en dos grandes grupos, riesgos ecológicos o ambientales y riesgos sobre la salud humana, sin olvidarse de las consideraciones relativas al bienestar y sanidad animal.

Como en toda tecnología compleja en la que influyen muchos factores diferentes, se debe diseñar un proceso sistemático que permita evaluar y verificar la seguridad de estas técnicas. Este proceso debería integrar métodos y conocimientos de muy distintas disciplinas, e incluiría una serie de pasos. El primer paso consiste en evaluar los riesgos, identificando los peligros que puedan existir, la probabilidad de que ocurran y los daños que pueden causar. A continuación cabe diseñar un plan de manejo de riesgos que incluya la reducción o eliminación de los mismos, y a continuación su monitorización para verificar si esas medidas son realmente efectivas. Por último, se impone una comunicación de esos riesgos a la opinión pública, para asegurar la transparencia del proceso (KAPUSCINSKI 2005; DEVLIN *et al.* 2006).

En el caso de los peces transgénicos el riesgo ambiental se basa en el escape de estos peces al medio natural. Los peligros que esto podría generar son muy variados, desde que el transgen se transfiriera a poblaciones naturales de la misma especie, a que los peces transgénicos desplazaran a las poblaciones naturales, o que tuvieran otro tipo de impacto sobre el ecosistema. Para cuantificar estos peligros se necesita una metodología estandarizada y fiable que permita hacer buenas predicciones. La metodología más próxima a estas



características es la «*net fitness methodology*», desarrollada por Muir y colaboradores (MUIR 2004). Este método incluye la recopilación de rasgos de idoneidad (*fitness* en inglés) de los individuos transgénicos y de sus congéneres no transgénicos, seguida de la inclusión de estos datos en un modelo matemático que predice el destino del transgén sobre múltiples generaciones. Esta metodología ha sido en principio desarrollada para evaluar la transferencia potencial del transgén a peces salvajes. En cualquier caso, todavía se está muy lejos de poder tener una información completa para la evaluación y el manejo de la bioseguridad de los peces transgénicos, debido sobre todo a la falta de conocimiento científico sobre los rasgos de los organismos modificados, la ecología de los ambientes naturales en los que podrían penetrar estos organismos y la interacción entre los dos (KAPUSCINSKI 2005; DEVLIN *et al.* 2006).

En cuanto al manejo de riesgo ambiental en peces transgénicos, hasta el momento los estudios se han orientado a buscar opciones para reducir riesgos, dejando a un lado la búsqueda de acciones «terapéuticas» (KAPUSCINSKI 2005). Las propuestas para la reducción de riesgos están mayormente relacionadas con métodos de confinamiento para impedir la entrada de peces transgénicos en el medio natural (MACLEAN y LAIGHT 2000; DEVLIN *et al.* 2006). Se han propuesto métodos de contención por aislamiento geográfico con el medio acuático, aunque esto puede resultar poco viable económicamente. También mediante limitación física utilizando recipientes convenientemente aislados, como se ha realizado en algunos de los experimentos a gran escala explicados para los peces transgénicos para GH. La contención por esterilidad de los peces transgénicos es la que ha recibido más atención. Aunque esto no podría evitar el escape de estos peces al medio natural, sí que aseguraría que éstos no pudieran establecerse de manera permanente, y que no transfirieran los transgenes a individuos salvajes. Para obtener animales estériles se ha propuesto la inducción de triploidía, metodología ya establecida en muchas especies (véase capítulo 10), o la inactivación de genes fundamentales para el desarrollo gonadal, como se explicaba en el apartado 3.2.3 de este capítulo.

En cuanto a los riesgos para la salud humana, éstos son evaluados por agencias específicas en cada país. En el caso del salmón transgénico



para GH, que está siendo evaluado por la FDA, se ha considerado como una «nueva droga animal» y está sometiéndose a todos los controles y pruebas correspondientes. En Canadá, por ejemplo, se considera que deben compararse las características del organismo transgénico con las de ese mismo organismo sin modificar. Se debe considerar como se ha generado el organismo modificado, también se debe examinar su calidad nutricional, la presencia potencial de toxinas y si ha habido cambios en sus características alergénicas. Esta estrategia es similar a la que aplican las agencias reguladoras en otros países (FLETCHER *et al.* 2004).

Aparte de los controles que requieren las agencias alimentarias reguladoras, hay dos casos publicados de seguridad alimentaria con peces transgénicos. Uno de ellos se realizó en Cuba con tilapias transgénicas para GH, donde a un grupo de hombres y mujeres voluntarios se les dio de comer tilapias transgénicas. La carne de tilapia transgénica se evaluó bien en cuanto a sabor, y además distintos parámetros clínicos y bioquímicos mostraron que no había diferencias entre individuos que habían comido tilapia transgénica o normal (GUILLEN *et al.* 1999). Por otra parte, en China, se ha evaluado la seguridad alimentaria de la carpa transgénica para GH en ratones. Para esta evaluación se siguieron las mismas normas que se utilizan para evaluar nuevas medicinas en ese país. Los resultados indicaron que los ratones que habían consumido carpa transgénica no mostraban diferencias respecto a los grupos control, en cuanto a su crecimiento, análisis de sangre, análisis histoquímico de 12 órganos o capacidad reproductora (Fu *et al.* 2005).

Otro aspecto que debe ser evaluado es el relativo al bienestar animal (HALLERMAN *et al.* 2007; FLETCHER *et al.* 2004). El bienestar y salud general de un animal transgénico es importante, tanto por cuestiones éticas como prácticas, porque pueden afectar a su manejo y producción. También es importante conocer estos aspectos de cara a la evaluación de riesgos ecológicos, y como información para el consumidor. Por otra parte, la transgénesis también tendría el potencial de mejorar la salud animal, pues la mortalidad debida a ciertas enfermedades podría reducirse mediante el aumento de la resistencia a las mismas como veíamos en un apartado previo.

En último término será el consumidor el que marcará el destino de los peces transgénicos para consumo humano. Para ello, los beneficios



que el consumidor aprecie en estos alimentos deben ser mayores que los riesgos (MACLEAN 2003; FLETCHER *et al.* 2004; AERNI 2004). Existen varias escalas de aceptación pública. En una de ellas influye la finalidad de la aplicación. Si ésta tiene que ver con beneficios para la salud, es más aceptada, sin embargo, la biotecnología aplicada a los alimentos crea más preocupación en el consumidor. Otra escala tiene que ver con la naturaleza del organismo modificado: la manipulación de micro-organismos es la que genera menos objeciones, seguido por las plantas y finalmente por los animales. Uno de los temas que más inquietud despierta es el uso de animales transgénicos como alimento (EINSIEDEL 2005). Otra de las preocupaciones de los consumidores tiene que ver con la poca confianza en las entidades reguladoras. Las objeciones del consumidor deben ser recogidas e incorporadas en los procesos de regularización. El consumidor debe tener toda la información objetiva necesaria que le permita decidir si quiere comprar ese producto o no (FLETCHER *et al.* 2004; EINSIEDEL 2005).

BIBLIOGRAFÍA

- AERNI, P., 2004 Risk, regulation and innovation: The case of aquaculture and transgenic fish. *Aquat. Sci.* **66**: 327-341.
- ALAM, M. D. S., A. POPPLEWELL y N. MACLEAN, 1996a Germ line transmission and expression of a lacZ containing transgene in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Res.* **5**: 87-95.
- ALAM, M. S., F. L. LAVENDER, A. IYENGAR, M. A. RAHMAN, H. H. AYAD *et al.* 1996b Comparison of the activity of carp and rat beta-actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **45**: 117-122.
- ALEXANDER, E. L. R., K. C. DOOLEY, B. POHAJDAK, B. Y. XU y J. R. WRIGHT, 2006 Things we have learned from tilapia islet xenotransplantation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **148**: 125-131.
- ALIMUDDIN, G. YOSHIZAKI, V. KIRON, S. SATOH y T. TAKEUCHI, 2005 Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by over-expression of masu salmon Delta 6-desaturase-like gene in zebrafish. *Transgenic Res.* **14**: 159-165.
- ALIMUDDIN, Y. GORO, K. VISWANATH, S. SHUICHI y T. TOSHIO, 2007 Expression of Masu Salmon delta5-Desaturase-Like Gene Elevated EPA and DHA Biosynthesis in Zebrafish. *Mar. Biotechnol.* **9**: 92-100.



- ALVAREZ, M. C., J. BEJAR, S. CHEN y Y. HONG, 2007 Fish ES Cells and Applications to Biotechnology. *Mar. Biotechnol.* **9**: 117-127.
- AMANUMA, K., H. TAKEDA, H. AMANUMA y Y. AOKI, 2000 Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nat. Biotechnol.* **18**: 62-65.
- ANDERSEN, O., H. J. S. LARSEN y P. ALESTROM, 1992 Immunization of Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Against Gonadotropin-Releasing-Hormone - A Possible Approach to the Control of Sexual-Maturation in Fish. *Aquaculture* **106**: 195-200.
- BEJAR, J., Y. HONG y M. C. ALVAREZ, 1999 Towards obtaining ES cells in the marine fish species *Sparus aurata*; multipassage maintenance, characterization and transfection. *Genet. Anal.* **15**: 125-129.
- BEJAR, J., Y. HONG, y M. C. ALVAREZ, 2002 An ES-like cell line from the marine fish *Sparus aurata*: Characterization and chimaera production. *Transgenic Res.* **11**: 279-289.
- BELL, J. G., R. J. HENDERSON, D. R. TOCHER, F. MCGHEE, J. R. DICK *et al.* 2002 Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *J. Nutr.* **132**: 222-230.
- BETANCOURT, O. H., J. ATTAL, M. C. THERON, C. PUISSANT y L. M. HOUEBINE, 1993 Efficiency of introns from various origins in fish cells. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**: 181-188.
- BIERING, E., 2005 Update on viral vaccines for fish. *Dev. Biol. (Basel)* **121**: 97-113.
- BLECHINGER, S. R., J. T. WARREN, J. Y. KUWADA y P. H. KRONE, 2002 Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line. *Environ. Health Perspec.* **110**: 1041-1046.
- BREM, G., B. BREINIG, G. HORSTGEN-SCHWARK y E.-L. WINNACKER, 1988 Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **68**: 209-219.
- BUONO, R. J., y P. J. LINSER, 1992 Transient expression of RSV-CAT in transgenic zebrafish made by electroporation. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1**: 271-275.
- CALDOVIC, L., y P. B. HACKETT, 1995 Development of position-independent expression vectors and their transfer into transgenic fish. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **4**: 51-61.
- CALDOVIC, L., D. AGALLIU y P. B. HACKETT, 1999 Position-independent expression of transgenes in zebrafish. *Transgenic Res.* **8**: 321-334.
- CARR, K., 1999 Cuban biotechnology treads a lonely path. *Nature* **398**: A22-A23.



- CARVAN, M. J., 2000 Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **919**: 133-147.
- CARVAN, M. J., D. M. SONNTAG, C. B. CMAR, R. S. COOK, M. A. CURRAN *et al.* 2001 Oxidative stress in zebrafish cells: potential utility of transgenic zebrafish as a deployable sentinel for site hazard ranking. *Sci. Total Environ.* **274**: 183-196.
- CHEN, J. Y., J. Y. CHEN, W. K. CHU, H. N. WU, Y. L. HSU *et al.* 2000 Infectious pancreatic necrosis virus RNA cleavage in vitro by hammerhead ribozymes and enhancement of ribozyme catalysis by oligonucleotide facilitators. *Mar. Biotechnol.* **2**: 364-375.
- CHEN, S. L., H. Q. YE, Z. X. SHA y Y. HONG, 2003 Derivation of a pluripotent embryonic cell line from red sea bream blastulas. *J. Fish Biol.* **63**: 795-805.
- CHEN, S. L., G. C. REN, Z. X. SHA y C. Y. SHI, 2004 Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* for virus isolation. *Dis. Aquat. Org.* **60**: 241-246.
- CHEN, S. L., G. C. REN, Z. X. SHA y Y. H. HONG, 2005 Development and characterization of a continuous embryonic cell line from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* **249**: 63-68.
- CHEN, T. T., K. KIGHT, C. M. LIN, D. A. POWERS, M. HAYAT *et al.* 1993 Expression and inheritance of RSVLTR-rtGH1 complementary DNA in the transgenic common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**: 88-95.
- CHEN, T. T., J. K. LU, M. J. SHAMBLOTT, C. M. CHENG, C. M. LIN *et al.* 1996 Transgenic fish: ideal models for basic research and biotechnological applications, pp. 401-433 in *Molecular Zoology*, edited by J. D. Ferraris and S. R. Palumbi. Wiley Liss.
- CHOU, C. Y., L. S. HORNG, y H. J. TSAI, 2001 Uniform GFP-expression in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation. *Transgenic Res.* **10**: 303-315.
- CHOURROUT, D., y E. PERROT, 1992 No transgenic rainbow trout produced with sperm incubated with linear DNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1**: 282-285.
- CHOURROUT, D., R. GUYOMARD y L. M. HOUBEINE, 1986 High-Efficiency Gene-Transfer in Rainbow-Trout (*Salmo gairdneri* Rich) by Microinjection Into Egg Cytoplasm. *Aquaculture* **51**: 143-150.
- DAHM, R., y R. GEISLER, 2006 Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar. Biotechnol.* **8**: 329-345.
- DAVIDSON, A. E., D. BALCIUNAS, D. MOHN, J. SHAFFER, S. HERMANSON *et al.* 2003 Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Dev. Biol.* **263**: 191-202.



- DAVIES, P. L., J. BAARDSNES, M. J. KUIPER y V. K. WALKER, 2002 Structure and function of antifreeze proteins. *Philos. Transact. B: Biol. Sci.* **357**: 927-933.
- DEVLIN, R. H., 1997 Transgenic salmonids, pp. 105-117 in *Transgenic animals: Generation and use*, edited by L. M. Houdebine. Hardwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- DEVLIN, R. H., T. Y. YESAKI, C. A. BIAGI, E. M. DONALDSON, P. SWANSON *et al.* 1994 Extraordinary Salmon Growth. *Nature* **371**: 209-210.
- DEVLIN, R. H., T. Y. YESAKI, E. M. DONALDSON, S. J. DU y C. L. HEW, 1995 Production of Germline Transgenic Pacific Salmonids with Dramatically Increased Growth-Performance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **52**: 1376-1384.
- DEVLIN, R. H., C. A. BIAGI, T. Y. YESAKI, D. E. SMAILUS, y J. C. BYATT, 2001 Growth of domesticated transgenic fish - A growth-hormone transgene boosts the size of wild but not domesticated trout. *Nature* **409**: 781-782.
- DEVLIN, R. H., L. F. SUNDSTROM y W. M. MUIR, 2006 Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *Trends Biotechnol.* **24**: 89-97.
- DU, S. J., Z. Y. GONG, G. L. FLETCHER, M. A. SHEARS, M. J. KING *et al.* 1992 Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an «all fish» chimeric growth hormone gene construct. *BioTechnology (N. Y.)* **10**: 176-181.
- DUNHAM, R. A., 1987 Transfer of the Metallothionein-Human Growth Hormone Fusion Gene into Channel Catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* **116**: 87.
- DUNHAM, R. A., A. C. RAMBOUX, P. L. DUNCAN, M. HAYAT, T. T. CHEN *et al.* 1992 Transfer, expression, and inheritance of salmonid growth hormone genes in channel catfish., *Ictalurus punctatus*, and effects on performance traits. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1**: 380-389.
- DUNHAM, R. A., G. W. WARR, A. NICHOLS, P. L. DUNCAN, B. ARGUE *et al.* 2002 Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes. *Mar. Biotechnol.* **4**: 338-344.
- EINSIEDEL, E. F., 2005 Public perceptions of transgenic animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **24**: 149-157.
- FAN, L. C., J. CRODIAN y P. COLLODI, 2004 Production of zebrafish germline chimeras by using cultured embryonic stem (ES) cells. *Zebrafish: 2Nd Edition Genetics Genomics and Informatics* **77**: 113-119.
- FARRELL, A. P., W. BENNETT, y R. H. DEVLIN, 1997 Growth-enhanced transgenic salmon can be inferior swimmers. *Can. J. Zool.* **75**: 335-337.
- FLETCHER, G. L., M. A. SHEARS, M. J. KING, P. L. DAVIES y C. L. HEW, 1988 Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **45**: 352-357.



- FLETCHER, G. L., C. L. HEW y P. L. DAVIES, 2001 Antifreeze proteins of teleost fishes. *Ann. Rev. Physiol.* **63**: 359-390.
- FLETCHER, G. L., M. A. SHEARS, E. S. YASKOWIAK, M. J. KING y S. V. GODDARD, 2004 Gene transfer: potential to enhance the genome of Atlantic salmon for aquaculture. *Aust. J. Exp. Agric.* **44**: 1095-1100.
- FU, C., Y. CUI, S. S. O. HUNG y Z. ZHU, 1998 Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *J. Fish Biol.* **53**: 115-129.
- FU, C., W. HU, Y. WANG y Z. ZHU, 2005 Developments in transgenic fish in the people's Republic of China. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **24**: 299-307.
- FURTH, P. A., L. ST ONGE, H. BOGER, P. GRUSS, M. GOSSEN *et al.* 1994 Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 9302-9306.
- GONG, Z., H. WAN, T. L. TAY, H. WANG, M. CHEN *et al.* 2003 Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**: 58-63.
- GOTHILF, Y., R. TOYAMA, S. L. COON, S. J. DU, I. B. DAWID *et al.* 2002 Pineal-specific expression of green fluorescent protein under the control of the serotonin-N-acetyltransferase gene regulatory regions in transgenic zebrafish. *Dev. Dyn.* **225**: 241-249.
- GRABHER, C., T. HENRICH, T. SASADO, A. ARENZ, J. WITTBRODT *et al.* 2003 Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. *Gene* **322**: 57-66.
- GROSS, M. L., J. F. SCHNEIDER, N. MOAV, B. MOAV, C. ALVAREZ *et al.* 1992 Molecular Analysis and Growth Evaluation of Northern Pike (*Esox lucius*) Microinjected with Growth-Hormone Genes. *Aquaculture* **103**: 253-273.
- GUILLEN, I., J. BERLANGA, C. M. VALENZUELA, A. MORALES, J. TOLEDO *et al.* 1999 Safety Evaluation of Transgenic Tilapia with Accelerated Growth. *Mar. Biotechnol.* **1**: 2-14.
- GURA, T., 1995 Antisense Has Growing Pains. *Science* **270**: 575-577.
- HALLERMAN, E. M., E. MCLEAN y I. A. FLEMING, 2007 Effects of growth hormone transgenes on the behavior and welfare of aquacultured fishes: A review identifying research needs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **104**: 265-294.
- HAMADA, K., 1998 Usefulness of the medaka beta-actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **7**: 173-180.
- HARDING, M. M., P. I. ANDERBERG y A. D. J. HAYMET, 2003 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1381-1392.



- HEPPELL, J., y H. L. DAVIS, 2000 Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **43**: 29-43.
- HER, G. M., Y. H. YEH y J. L. WU, 2003 435-bp liver regulatory sequence in the liver fatty acid binding protein (L-FABP) gene is sufficient to modulate liver regional expression in Transgenic zebrafish. *Dev. Dyn.* **227**: 347-356.
- HEW, C., P. L. DAVIES, M. SHEARS, M. KING y G. FLETCHER, 1987 Antifreeze Protein Gene-Transfer to Atlantic Salmon by Microinjection. *Federation Proceedings* **46**: 2039.
- HEW, C. L., N. C. WANG, S. JOSHI, G. L. FLETCHER, G. K. SCOTT *et al.* 1988 Multiple Genes Provide the Basis for Antifreeze Protein Diversity and Dosage in the Ocean Pout, *Macrozoarces americanus*. *J. Biol. Chem.* **263**: 12049-12055.
- HEW, C. L., G. L. FLETCHER y P. L. DAVIES, 1995 Transgenic salmon: Tailoring the genome for food production. *J. Fish Biol.* **47**: 1-19.
- HEW, C., R. POON, F. XIONG, S. GAUTHIER, M. SHEARS *et al.* 1999 Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic Res.* **8**: 405-414.
- HIGASHIJIMA, S., H. OKAMOTO, N. UENO, Y. HOTTA y G. EGUCHI, 1997 High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev. Biol.* **192**: 289-299.
- HINITIS, Y., y B. MOAV, 1999 Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* **173**: 285-296.
- HONG, Y. H., C. WINKLER, G. BREM y M. SCHARTL, 1993 Development of A Heavy Metal-Inducible Fish-Specific Expression Vector for Gene-Transfer *Invitro* and *Invivo*. *Aquaculture* **111**: 215-226.
- HONG, Y. H., C. WINKLER y M. SCHARTL, 1996 Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*). *Mech. Dev.* **60**: 33-44.
- HONG, Y. H., C. WINKLER y M. SCHARTL, 1998 Production of medakafish chimeras from a stable embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 3679-3684.
- HONG, Y. H., T. M. LIU, H. B. ZHAO, H. Y. XU, W. J. WANG *et al.* 2004 Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 8011-8016.
- HOSTETLER, H. A., S. L. PECK y W. A. MUIR, 2003 High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current-shifted radio frequency pulses. *Transgenic Res.* **12**: 413-424.



- HOSTETLER, H. A., P. COLLODI, R. H. DEVLIN y W. M. MUIR, 2005 Improved Phytate Phosphorus Utilization by Japanese Medaka Transgenic for the *Aspergillus niger* Phytase Gene. *Zebrafish* **2**: 19-31.
- HOUEBINE L. M., 1997 *Transgenic animals: Generation and use*. Harwood Academic Publishers. The Netherlands..
- HSIAO, C. D., F. J. HSIEH y H. J. TSAI, 2001 Enhanced expression and stable transmission of transgenes flanked by inverted terminal repeats from adeno-associated virus in zebrafish. *Dev. Dyn.* **220**: 323-336.
- HU, W., Y. P. WANG y Z. Y. ZHU, 2006 A perspective on fish gonad manipulation for biotechnical applications. *Chin. Sci. Bull.* **51**: 1-7.
- HWANG, G. L., M. A. RAHMAN, S. ABDUL RAZAK, F. SOHM, H. FARAHMAND *et al.* 2003 Isolation and characterisation of tilapia beta-actin promoter and comparison of its activity with carp beta-actin promoter. *Biochim. Biophys. Acta* **1625**: 11-18.
- HWANG, G. L., F. MULLER, M. A. RAHMAN, D. W. WILLIAMS, P. J. MURDOCK *et al.* 2004 Fish as bioreactors: Transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Mar. Biotechnol.* **6**: 485-492.
- INOUE, K., S. YAMASHITA, J. HATA, S. KABENO, S. ASADA *et al.* 1990 Electroporation As A New Technique for Producing Transgenic Fish. *Cell Diff. Dev.* **29**: 123-128.
- INOUE, K., N. AKITA, T. SHIBA, M. SATAKE y S. YAMASHITA, 1992 Metal-Inducible Activities of Metallothionein Promoters in Fish Cells and Fry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**: 1108-1114.
- IVICS, Z., P. B. HACKETT, R. H. PLASTERK y Z. IZSVAK, 1997 Molecular reconstruction of Sleeping beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* **91**: 501-510.
- KAPUSCINSKI, A., 2005 Current scientific understanding of the environmental biosafety of transgenic fish and shellfish. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **24**: 309-322.
- KHOO, H. W., 2000 Sperm-mediated gene transfer studies on zebrafish in Singapore. *Mol. Reprod. Dev.* **56**: 278-280.
- KINOSHITA, M., M. YAMAUCHI, M. SASANUMA, Y. ISHIKAWA, T. OSADA *et al.* 2003 A transgene and its expression profile are stably transmitted to offspring in transgenic medaka generated by the particle gun method. *Zool. Sci.* **20**: 869-875.
- KISTNER, A., M. GOSSEN, F. ZIMMERMANN, J. JERECIC, C. ULLMER *et al.* 1996 Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 10933-10938.



- KOBAYASHI, T., G. YOSHIZAKI, Y. TAKEUCHI y T. TAKEUCHI, 2004 Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.* **67**: 91-100.
- KRASNOV, A., J. J. AGREN, T. I. PITKANEN y H. MOLSA, 1999 Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) - II. Nutrient partitioning in rapidly growing fish. *Genet. Anal.* **15**: 99-105.
- KURATH, G., 2005 Overview of recent DNA vaccine development for fish. *Dev. Biol. (Basel)* **121**: 201-213.
- KURITA, K., S. M. BURGESS y N. SAKAI, 2004 Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of in vitro-cultured sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 1263-1267.
- LANGENAU, D. M., y L. I. ZON, 2005 The zebrafish: A new model of T-cell and thymic development. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 307-317.
- LANGENAU, D. M., D. TRAVER, A. A. FERRANDO, J. L. KUTOK, J. C. ASTER *et al.* 2003 Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science* **299**: 887-890.
- LEE, K. Y., H. G. HUANG, B. S. JU, Z. G. YANG y S. LIN, 2002 Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. *Nat. Biotechnol.* **20**: 795-799.
- LEGLER, J., J. L. M. BROEKHOF, A. BROUWER, P. H. LANSER, A. J. MURK *et al.* 2000 A novel in vivo bioassay for (xeno-)estrogens using transgenic zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 4439-4444.
- LESHER, M., 2004 Seeds of change. *Regional Review* **14**: 12-21.
- LIN, S., S. YANG y N. HOPKINS, 1994 LacZ Expression in Germline Transgenic Zebrafish Can be Detected in Living Embryos. *Dev. Biol.* **161**: 77-83.
- LINNEY, E., N. L. HARDISON, B. E. LONZE, S. LYONS y L. DiNAPOLI, 1999 Transgene expression in zebrafish: A comparison of retroviral-vector and DNA-injection approaches. *Dev. Biol.* **213**: 207-216.
- LIU, Z. J., B. MOAV, A. J. FARAS, K. S. GUISE, A. R. KAPUSCINSKI *et al.* 1990 Development of Expression Vectors for Transgenic Fish. *BioTechnology* **8**: 1268-1272.
- LORENZEN, N., y S. E. LAPATRA, 2005 DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **24**: 201-213.
- LORENZEN, N., E. LORENZEN, K. EINER-JENSEN y S. E. LAPATRA, 2002 DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* **12**: 439-453.
- LU, J. K., B. H. FU, J. L. WU y T. T. CHEN, 2002 Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol.* **4**: 328-337.



- MACLEAN, N., 1998 Regulation and exploitation of transgenes in fish. *Mutat. Res.* **399**: 255-266.
- MACLEAN, N., 2003 Genetically modified fish and their effects on food quality and human health and nutrition. *Trends Food Sci. Tech.* **14**: 242-252.
- MACLEAN, N., y R. J. LAIGHT, 2000 Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish Fish.* **1**: 146-172.
- MACLEAN, N., D. PENMAN y Z. ZHU, 1987 Introduction of Novel Genes into Fish. *Nat. Biotechnol.* **5**: 257-261.
- MACLEAN, N., A. IYENGAR, A. RAHMAN, Z. SULAIMAN y D. J. PENMAN, 1992 Transgene transmission and expression in rainbow trout and tilapia. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1**: 355-365.
- MACLEAN, N., M. A. RAHMAN, F. SOHM, G. HWANG, A. IYENGAR *et al.* 2002 Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene* **295**: 265-277.
- MARTINEZ, R., M. P. ESTRADA, J. BERLANGA, I. GUILLEN, O. HERNANDEZ *et al.* 1996 Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**: 62-70.
- MARTINEZ, R., A. ARENAL, M. P. ESTRADA, F. HERRERA, V. HUERTA *et al.* 1999 Mendelian transmission, transgene dosage and growth phenotype in transgenic tilapia (*Oreochromis hornorum*) showing ectopic expression of homologous growth hormone. *Aquaculture* **173**: 271-283.
- MARTINEZ, R., J. JUNCAL, C. ZALDIVAR, A. ARENAL, I. GUILLEN *et al.* 2000 Growth efficiency in transgenic tilapia (*Oreochromis* sp.) carrying a single copy of an homologous cDNA growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**: 466-472.
- MASON, A. J., J. S. HAYFLICK, R. T. ZOELLER, W. S. YOUNG, H. S. PHILLIPS *et al.* 1986 A Deletion Truncating the Gonadotropin-Releasing-Hormone Gene Is Responsible for Hypogonadism in the Hpg Mouse. *Science* **234**: 1366-1371.
- MATTINGLY, C. J., J. A. McLACHLAN y W. A. TOSCANO, 2001 Green fluorescent protein (GFP) as a marker of aryl hydrocarbon receptor (AhR) function in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Health Perspec.* **109**: 845-849.
- MAYER, G. D., A. LEACH, P. KLING, P. E. OLSSON y C. HOGSTRAND, 2003 Activation of the rainbow trout metallothionein-A promoter by silver and zinc. *Comp. Biochem. Physiol. B* **134**: 181-188.
- MCLEAN, E., y E. M. DONALDSON, 1993 The role of somatotropin in growth in poikilotherms., pp. 43-71 in *The endocrinology of growth development and metabolism in vertebrates*, edited by M. P. Schreibman, C. G. Scanes and P. K. T. Pang. Academic Press, New York, NY.



- MOAV, B., Z. J. LIU, L. D. CALDOVIC, M. L. GROSS, A. J. FARAS *et al.* 1993 Regulation of Expression of Transgenes in Developing Fish. *Transgenic Res.* **2**: 153-161.
- MORI, T., I. HIRAKA, Y. KURATA, H. KAWACHI, N. MANO *et al.* 2007 Changes in hepatic gene expression related to innate immunity, growth and iron metabolism in GH-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou*) by cDNA subtraction and microarray analysis, and serum lysozyme activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* **151**: 42-54.
- MORITA, T., G. YOSHIZAKI, M. KOBAYASHI, S. WATABE y T. TAKEUCHI, 2004 Fish eggs as bioreactors: the production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. *Transgenic Res.* **13**: 551-557.
- MUIR, W. M., 2004 The threats and benefits of GM fish. *EMBO Reports* **5**: 654-659.
- MULLER, F., Z. IVICS, F. ERDELYI, T. PAPP, L. VARADI *et al.* 1992 Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1**: 276-281.
- MUÑOZ, I., 2005 Introducción de la tecnología de transferencia génica en lubina (*Dicentrarchus labrax*). Tesis doctoral. Universitat de València .
- MUÑOZ, I., M. CARRILLO, S. ZANUY y A. GOMEZ, 2005 Regulation of exogenous gene expression in fish cells: An evaluation of different versions of the tetracycline-regulated system. *Gene* **363**: 173-182.
- NAM, Y. K., J. K. NOH, Y. S. CHO, H. J. CHO, K. N. CHO *et al.* 2001 Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res.* **10**: 353-362.
- NAM, Y. K., Y. S. CHO, H. J. CHO y D. S. KIM, 2002 Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture* **209**: 257-270.
- NIILER, E., 2000 FDA, researchers consider first transgenic fish. *Nat. Biotechnol.* **18**: 473.
- NOH, J. K., K. N. CHO, E. H. HAN, A. R. KIM, J. S. LEE *et al.* 2003 Genomic cloning of mud loach *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes, Cobitidae) beta-actin gene and usefulness of its promoter region for fish transgenesis. *Mar. Biotechnol.* **5**: 244-252.
- ONICHTCHOUK, D., K. ADUROJA, H. G. BELTING, L. GNUGGE y W. DRIEVER, 2003 Transgene driving GFP expression from the promoter of the zona pellucida gene *zpc* is expressed in oocytes and provides marker for gonad differentiation in an early zebrafish. *Dev. Dyn.* **228**: 393-404.



- ONO, H., E. HIROSE, K. MIYAZAKI, H. YAMAMOTO y J. MATSUMOTO, 1997 Transgenic medaka fish bearing the mouse tyrosinase gene: Expression and trans-mission of the transgene following electroporation of the orange-colored variant. *Pigment Cell Res.* **10**: 168-175.
- PALMITER, R. D., R. L. BRINSTER, R. E. HAMMER, M. E. TRUMBBAUER, M. G. ROSENFELD *et al.* 1982 Dramatic Growth of Mice That Develop from Eggs Micro-Injected with Metallothioneine-Growth Hormone Fusion Genes. *Nature* **300**: 611-615.
- PITKANEN, T. I., A. KRASNOV, M. REINISALO y H. MOLSA, 1999a Transfer and expres-sion of glucose transporter and hexokinase genes in salmonid fish. *Aqua-culture* **173**: 319-332.
- PITKANEN, T. I., A. KRASNOV, H. TEERIJOKE y H. MOLSA, 1999b Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) - I. Growth response to various GH constructs. *Genet. Anal.* **15**: 91-98.
- POHAJDAK, B., M. MANSOUR, O. HRYTSENKO, J. M. CONLON, L. C. DYMOND *et al.* 2004 Production of transgenic Tilapia with Brockmann bodies secreting [des-ThrB30] human insulin. *Transgenic Res.* **13**: 313-323.
- POWERS, D. A., L. HEREFORD, T. COLE, T. T. CHEN, C. M. LIN *et al.* 1992 Electropora-tion: a method for transferring genes into the gametes of zebrafish (*Bra-chydanio rerio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), and common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1**: 301-308.
- RAHMAN, M. A., y N. MACLEAN, 1999 Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. *Aquaculture* **173**: 333-346.
- RAHMAN, M. A., R. MAK, H. AYAD, A. SMITH y N. MACLEAN, 1998 Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Res.* **7**: 357-369.
- RAHMAN, M. A., G. L. HWANG, S. A. RAZAK, F. SOHM y N. MACLEAN, 2000 Copy number related transgene expression and mosaic somatic expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Res.* **9**: 417-427.
- RAHMAN, M. A., A. RONYAI, B. Z. ENGIDAW, K. JAUNCEY, G. L. HWANG *et al.* 2001 Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exo-genous fish growth hormone gene. *J. Fish Biol.* **59**: 62-78.
- RISE, M. L., S. E. DOUGLAS, D. SAKHRANI, J. WILLIAMS, K. V. EWART *et al.* 2006 Mul-tiple microarray platforms utilized for hepatic gene expression profiling of GH transgenic coho salmon with and without ration restriction. *J. Mol. Endocrinol.* **37**: 259-282.



- ROKKONES, E., P. ALESTROM, H. SKJERVOLD y K. M. GAUTVIK, 1989 Microinjection and Expression of A Mouse Metallothionein Human Growth-Hormone Fusion Gene in Fertilized Salmonid Eggs. *J. Comp. Physiol. B* **158**: 751-758.
- SARANGI, N., A. B. MANDALL, A. K. BANDYOPADHYAY, T. VENUGOPAL, S. MATHAVAN *et al.* 1999 Electroporated sperm mediated gene transfer in Indian major carps. *Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol.* **7**: 151-158.
- SARMASIK, A., G. WARR y T. T. CHEN, 2002 Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar. Biotechnol.* **4**: 310-322.
- SEEBURG, P. H., 1987 The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent Progr. Horm. Res.* **43**: 69-98.
- SEOK, S. H., J. H. PARK, M. W. BAEK, H. Y. LEE, D. J. KIM *et al.* 2006 Specific activation of the human HSP70 promoter by copper sulfate in mosaic transgenic zebrafish. *J. Biotechnol.* **126**: 406-413.
- SHEARS, M. A., G. L. FLETCHER, C. L. HEW, S. GAUTHIER, y P. L. DAVIES, 1991 Transfer, expression, and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1**: 58-63.
- SHEELA, S. G., J. D. CHEN, S. MATHAVAN y T. J. PANDIAN, 1998 Construction, electroporatic transfer and expression of Zp beta ypGH and Zp beta rtGH in zebrafish. *J. Biosci.* **23**: 565-576.
- SHEELA, S. G., T. J. PANDIAN y S. MATHAVAN, 1999 Electroporatic transfer, stable integration, expression and transmission of pZp beta ypGH and pZp beta rtGH in Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquac. Res.* **30**: 233-248.
- SHENTU, H., H. J. WEN, G. M. HER, C. J. HUANG, J. L. WU *et al.* 2003 Proximal upstream region of zebrafish bone morphogenetic protein 4 promoter directs heart expression of green fluorescent protein. *Genesis* **37**: 103-112.
- SIN, F. Y. T., A. L. BARTLEY, S. P. WALKER, I. L. SIN, J. E. SYMONDS *et al.* 1993 Gene-Transfer in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by Electroporating Sperm in the Presence of Prsv-LacZ Dna. *Aquaculture* **117**: 57-69.
- STUART, G. W., J. V. MCMURRAY y M. WESTERFIELD, 1988 Replication, Integration and Stable Germ-Line Transmission of Foreign Sequences Injected Into Early Zebrafish Embryos. *Development* **103**: 403-412.
- SUN, Y. H., S. P. CHEN, Y. P. WANG, W. HU y Z. Y. ZHU, 2005 Cytoplasmic impact on cross-genus cloned fish derived from transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) nuclei and goldfish (*Carassius auratus*) enucleated eggs. *Biol. Reprod.* **72**: 510-515.
- SUNDSTROM, L. F., M. LOHMUS, J. I. JOHNSON y R. H. DEVLIN, 2004 Growth hormone transgenic salmon pay for growth potential with increased predation mortality. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.* **271**: S350-S352.



- SUSSMAN, R., 2001 Direct DNA delivery into zebrafish embryos employing tissue culture techniques. *Genesis* **31**: 1-5.
- TAKAGI, S., T. SASADO, G. TAMIYA, K. OZATO, Y. WAKAMATSU *et al.* 1994 An efficient expression vector for transgenic medaka construction. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**: 192-199.
- TAKEUCHI, Y., G. YOSHIZAKI y T. TAKEUCHI, 2003 Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.* **69**: 1142-1149.
- THERMES, V., C. GRABHER, F. RISTORATORE, F. BOURRAT, A. CHOULIKA *et al.* 2002 I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech. Dev.* **118**: 91-98.
- TSAI, H. J., F. S. TSENG y I. C. LIAO, 1995 Electroporation of Sperm to Introduce Foreign Dna Into the Genome of Loach (*Misgurnus-Anguillicaudatus*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **52**: 776-787.
- UENO, T., S. YASUMASU, S. HAYASHI y I. IUCHI, 2004 Identification of choriogenin cis-regulatory elements and production of estrogen-inducible, liver-specific transgenic Medaka. *Mech. Dev.* **121**: 803-815.
- UZBEKOVA, S., J. CHYB, F. FERRIERE, T. BAILHACHE, P. PRUNET *et al.* 2000 Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *J. Mol. Endocrinol.* **25**: 337-350.
- VENUGOPAL, T., T. J. PANDIAN, S. MATHAVAN y N. SARANGI, 1998 Gene transfer in Indian major carps by electroporation. *Curr. Sci.* **74**: 636-638.
- VENUGOPAL, T., V. ANATHY, S. KIRANKUMAR y T. J. PANDIAN, 2004 Growth enhancement and food conversion efficiency of transgenic fish *Labeo rohita*. *J. Exp. Zool. Part A: Comp. Exp. Biology* **301A**: 477-490.
- VOLCKAERT, F. A., B. A. HELLEMANS, P. GALBUSERA, F. OLLEVIER, B. SEKKALI *et al.* 1994 Replication, expression, and fate of foreign DNA during embryonic and larval development of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**: 57-69.
- WAKAMATSU, Y., B. S. JU, I. PRISTYAZNHYUK, K. NIWA, T. LADYGINA *et al.* 2001a Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 1071-1076.
- WAKAMATSU, Y., S. PRISTYAZNHYUK, M. KINOSHITA, M. TANAKA y K. OZATO, 2001b The see-through medaka: A fish model that is transparent throughout life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 10046-10050.
- WANG, R., P. ZHANG, Z. GONG y C. L. HEW, 1995 Expression of the antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **4**: 20-26.



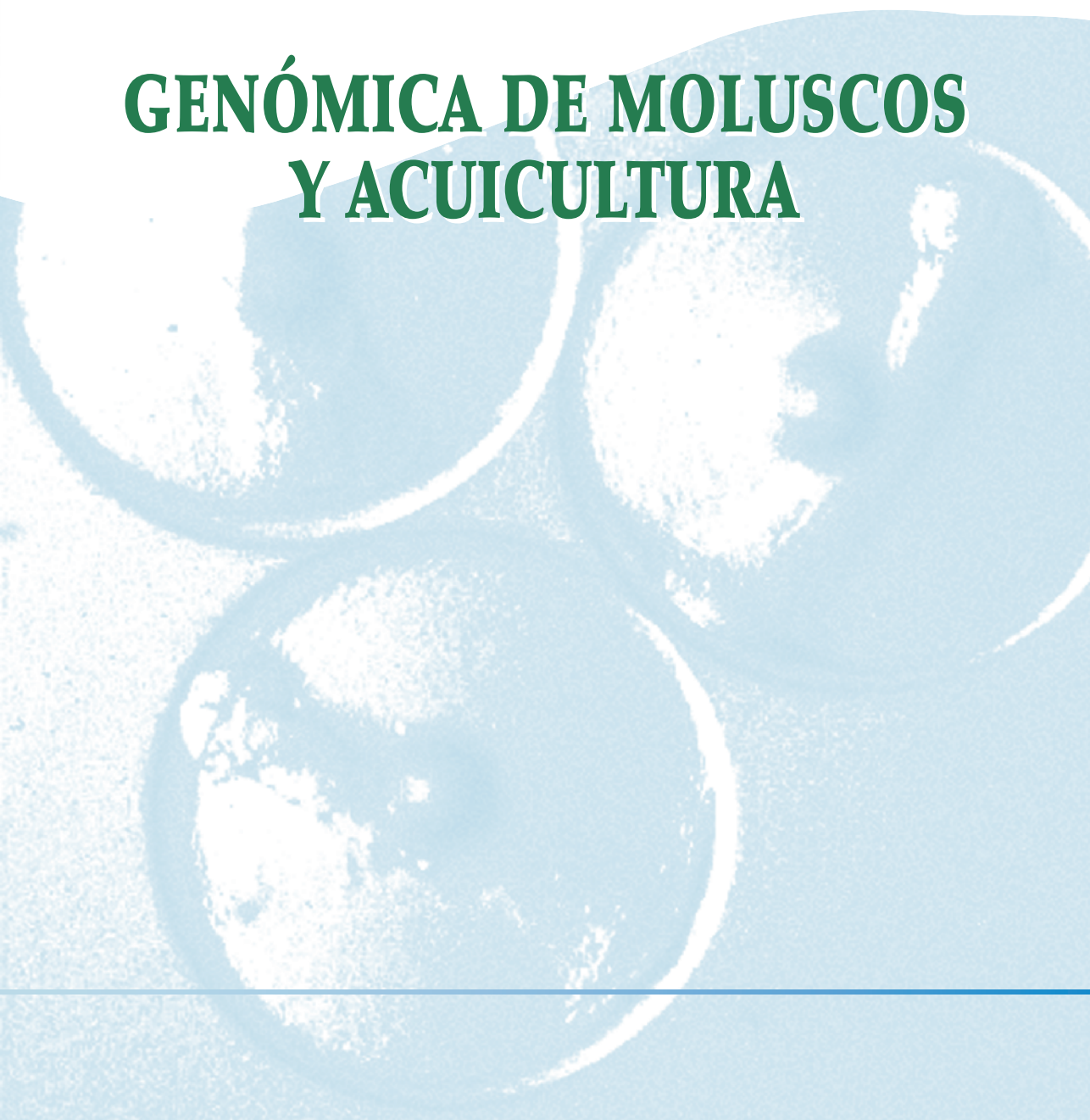
- WANG, T. M., Y. H. CHEN, C. F. LIU y H. J. TSAI, 2002 Functional analysis of the proximal promoter regions of fish rhodopsin and myf-5 genes using transgenesis. *Mar. Biotechnol.* **4**: 247-255.
- WANG, W. B., Y. P. WANG, W. HU, A. H. LI, T. Z. CAI *et al.* 2006 Effects of the «all-fish» growth hormone transgene expression on non-specific immune functions of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* **259**: 81-87.
- WANG, Y. P., 2001 Genetic analysis of «all-fish» growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus carpio* L.) and its F-1 generation. *Chin. Sci. Bull.* **46**: 1174-1178.
- WINKLER, C., J. R. VIELKIND, y M. SCHARTL, 1991 Transient Expression of Foreign Dna During Embryonic and Larval Development of the Medaka Fish (*Oryzias latipes*). *Mol. Gen. Genet.* **226**: 129-140.
- WINN, R. N., 2001 Transgenic fish as models in environmental toxicology. *ILAR J.* **42**: 322-329.
- WINN, R. N., M. B. NORRIS, K. J. BRAYER, C. TORRES y S. L. MULLER, 2000 Detection of mutations in transgenic fish carrying a bacteriophage lambda cII transgene target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 12655-12660.
- WITTBRODT, J., A. SHIMA y M. SCHARTL, 2002 Medaka - A model organism from the Far East. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 53-64.
- WRIGHT, J. R., y B. POHAJDAK, 2001 Cell therapy for diabetes using piscine islet tissue. *Cell Transplant.* **10**: 125-143.
- WU, G., Y. H. SUN y Z. Y. ZHU, 2003 Growth hormone gene transfer in common carp. *Aquat. Living Resourc.* **16**: 416-420.
- WU, S. M., P. P. HWANG, C. L. HEW y J. L. WU, 1998 Effect of antifreeze protein on cold tolerance in juvenile tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) and milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). *Zool. Stud.* **37**: 39-44.
- XIE, Y. F., D. LIU, J. ZOU, G. H. LI y Z. Y. ZHU, 1993 Gene-Transfer Via Electroporation in Fish. *Aquaculture* **111**: 207-213.
- YAMAUCHI, M., M. KINOSHITA, M. SASANUMA, S. TSUJI, M. TERADA *et al.* 2000 Introduction of a foreign gene into medakafish using the particle gun method. *J. Exp. Zool.* **287**: 285-293.
- YAZAWA, R., I. HIRONO, E. YAMAMOTO y T. AOKI, 2005 Gene transfer for Japanese flounder fertilized eggs by particle gun bombardment. *Fish. Sci.* **71**: 869-874.
- YAZAWA, R., I. HIRONO y T. AOKI, 2006 Transgenic zebrafish expressing chicken lysozyme show resistance against bacterial diseases. *Transgenic Res.* **15**: 385-391.



- YOSHIZAKI, G., S. SAKATANI, H. TOMINAGA y T. TAKEUCHI, 2000 Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.* **55**: 364-371.
- YOSHIZAKI, G., Y. TAKEUCHI, T. KOBAYASHI y T. TAKEUCHI, 2003 Primordial germ cell: a novel tool for fish bioengineering. *Fish Physiol. Biochem.* **28**: 453-457.
- YOSHIZAKI, G., Y. TAGO, Y. TAKEUCHI, E. SAWATARI, T. KOBAYASHI *et al.* 2005 Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in Salmonidae. *Biol. Reprod.* **73**: 88-93.
- ZELENIN, A. V., A. A. ALIMOV, V. A. BARMINTZEV, A. O. BENIUMOV, I. A. ZELENINA *et al.* 1991 The Delivery of Foreign Genes Into Fertilized Fish Eggs Using High-Velocity Microprojectiles. *FEBS Lett.* **287**: 118-120.
- ZENG, Z. Q., X. J. LIU, S. SEEBAH, y Z. Y. GONG, 2005a Faithful expression of living color reporter genes in transgenic medaka under two tissue-specific zebra-fish promoters. *Dev. Dyn.* **234**: 387-392.
- ZENG, Z. Q., T. SHAN, Y. TONG, S. H. LAM y Z. Y. GONG, 2005b Development of estrogen-responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 9001-9008.
- ZHONG, Q. W., y T. J. FAN, 2002 Advances in fish antifreeze protein research. *Acta Biochi. Bioph. Sin.* **34**: 124-130.
- ZHU, Z., 1992 Generation of fast growing transgenic fish: methods and mechanisms, pp. 92-119 in *Transgenic fish*, edited by C. L. Hew and G. L. Fletcher. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore.

12

GENÓMICA DE MOLUSCOS Y ACUICULTURA



GENÓMICA DE MOLUSCOS Y ACUICULTURA

C. Saavedra

Instituto de Acuicultura de Torre la Sal

C. Gestal

Instituto Investigaciones Marinas

B. Novoa

Instituto Investigaciones Marinas

A. Figueras

Instituto Investigaciones Marinas

Resumen

La aplicación de métodos genómicos en los moluscos está en sus comienzos, pero avanza decididamente debido a la importancia de estos organismos en la acuicultura y en las ciencias ambientales marinas. Cuatro especies de moluscos no comerciales son objeto en la actualidad de programas de secuenciación, y se ha formado un consorcio internacional para la secuenciación del genoma de la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*), el principal molusco cultivado, del que ya se están secuenciando los extremos de los clones de una genoteca en vectores BAC. Además, se han publicado mapas de ligamiento con marcadores genéticos moleculares en 8 especies de moluscos comerciales, de cara a la detección de genes implicados en la variabilidad para caracteres productivos. La aplicación de metodologías de transcriptómica está



permitiendo avanzar en el conocimiento del sistema inmune de los moluscos y de los genes implicados en la respuesta a organismos patógenos, y en las bases genéticas de la heterosis. Ya se han generado los primeros «chips» de DNA de moluscos, dirigidos a su utilización en el estudio de la respuesta a la contaminación marina en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, uno de los más importantes productos de la acuicultura marina europea. Además, las técnicas para el estudio masivo de proteínas (proteómica) se están aplicando a estos y otros problemas. Se puede prever que en los próximos años los enfoques genómicos contribuirán de forma relevante en diversos campos de gran importancia para el cultivo de los moluscos, tales como los ya citados de resistencia a enfermedades y otros no menos importantes como la depuración de toxinas marinas, la mejora de las dietas para el cultivo larvario y el acondicionamiento de reproductores, y los mecanismos moleculares de determinación del sexo y del control del crecimiento.

Abstract

*The use of genomic methodologies in molluscs is at an early stage, but grows steadily due to the importance of these organisms in aquaculture and marine environmental sciences. Whole-genome sequencing programs are going on in four species of non-commercial molluscs. The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), which is the main molluscan species in worldwide aquaculture, is the focus of an international consortium to sequence its genome that is now sequencing the ends of BAC clones. Moreover, genetic linkage maps have been published for 8 species of molluscs, with the aim of detecting genes responsible for variation in productive traits. Transcriptomic methodologies are facilitating the progress in the field of mollusc immunology, and helping the study of genes related to the response to pathogens, as well as giving insights in the genetic basis of heterosis. The first molluscan DNA chips have been already produced, with the aim of studying the response to marine pollution in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, which is the main product of European marine aquaculture. Proteomic methods are also being applied to the study of these topics. We can foresee that the application of genomic approaches will result in relevant contributions in the years to come in fields of major importance in*



mollusc aquaculture, such as the already quoted of disease resistance and depuration of marine toxins, diet design for larval culture and conditioning for reproduction, and the molecular mechanisms of sex determination and growth control.

1. INTRODUCCIÓN

La Genómica engloba un conjunto de técnicas y metodologías dirigidas al estudio de la estructura, función y evolución de los genomas de los seres vivos, que han resultado de los desarrollos recientes en la automatización de los métodos de análisis molecular de los sistemas biológicos y en la bioinformática. El denominador común de los métodos genómicos es el estudio de la estructura y la función del genoma al completo (o de una fracción grande del mismo), en contraposición a los enfoques clásicos de la biología molecular, que sólo permitían estudiar uno o unos pocos genes a la vez. La Genómica ha revolucionado la forma de enfocar el estudio de los fenómenos biológicos, y facilita el abordaje de problemas complejos mediante métodos relativamente fáciles de llevar a cabo (aunque de gran complejidad tecnológica).

El estudio de la biología de los moluscos se ha ido acrecentando durante las últimas décadas con la ayuda de métodos de biología molecular y celular, aunque el conocimiento actual de las bases moleculares de los aspectos básicos de la biología de estos organismos dista mucho de ser satisfactorio, y está a una gran distancia de otros grupos zoológicos de interés comercial como los peces. La genómica, sin embargo, está llamada a facilitar el estudio biológico de los moluscos e incrementar en varios órdenes de magnitud la cantidad de conocimiento que se puede extraer de los experimentos, en comparación con los enfoques moleculares tradicionales. Además, como veremos a continuación, los métodos genómicos tienen un gran potencial para resolver problemas relacionados directamente con el cultivo de los organismos acuáticos y facilitar el desarrollo de soluciones, biotecnológicas o de otro tipo, a estos problemas (SAAVEDRA y BACHÈRE 2006).



2. MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN GENÓMICA

La primera idea que viene a la mente cuando se menciona la palabra genómica, es la de los grandes proyectos de secuenciación de la especie humana y de los organismos modelo que se iniciaron en la última década del siglo xx. A raíz de las tecnologías desarrolladas en estos proyectos, ha sido posible secuenciar, cada vez con mayor celeridad y menor coste, los genomas de otros organismos de interés fundamental o aplicado. Estas secuencias se acaban almacenando en bases de datos públicas, a las que se puede acceder mediante herramientas informáticas, vía Internet. La base de datos del National Center for Biotechnology Information es la más utilizada (<http://www.ncbi.nlm.nih.org>), y en la actualidad almacena las secuencias genómicas completas de casi 200 especies de procariotas y 23 eucariotas. Además, están en marcha proyectos de secuenciación genómica de más de 200 procariotas y casi 300 eucariotas. Otra base de datos con gran cantidad de información sobre proyectos de secuenciación genómica es GOLD (<http://www.genomesonline.org>).

Los primeros proyectos de secuenciación utilizaron un enfoque basado en la clonación previa de todo el genoma en grandes fragmentos, utilizando vectores especiales de gran capacidad. Los más utilizados son los **BAC**, o cromosomas bacterianos artificiales (SHIZUYA *et al.* 1992). Una vez obtenidos los clones con los fragmentos del genoma en los BAC, se utiliza una combinación de técnicas de hibridación y secuenciación de los extremos para ordenarlos (Figura 1A). A continuación se puede progresar en la secuenciación de manera jerárquica, mediante subclonaje y secuenciación sucesiva de una serie de clones seleccionados de manera que contengan regiones contiguas del genoma. Esta metodología permite realizar la secuenciación de una forma ordenada. También permite dirigir el proceso hacia puntos concretos del genoma que se consideren de mayor interés, secuenciando éstos antes y completando el resto más tarde. Hoy en día sin embargo, la gran mayoría de los proyectos de secuenciación tienden a utilizar metodologías de tipo *shotgun*. Para ello, el genoma completo se fragmenta en numerosos trozos pequeños secuenciables (de unos 1000 pb) (Figura 1 B). A continuación, los millo-



nes de secuencias obtenidas se «ensamblan» mediante el uso de potentes ordenadores y programas informáticos que comparan las secuencias entre sí, buscando los fragmentos con extremos solapantes, y ordenando los fragmentos contiguos. Aún así, utilizando cualquiera de los dos métodos, no se obtiene la secuencia completa hasta haber llevado a cabo un largo proceso de rellenado de huecos, de comprobación de las secuencias obtenidas, y de revisión de su ensamblaje preliminar. Todo el proceso se apoya en la disponibilidad de potentes sistemas informáticos. A continuación comienza la fase de interpretación de la información obtenida, es decir, reconocer los distintos genes y secuencias reguladoras, para lo cual se pueden utilizar métodos bioinformáticos y echar mano de la información comparativa obtenida de los mapas genéticos y de las colecciones de secuencias codificantes disponibles en las bases de datos.

Cabría pensar que, dada la proliferación de proyectos de secuenciación genómica, y dada la importancia biológica y económica de muchas especies de moluscos, varios de los proyectos en marcha deberían implicar a especies de este grupo zoológico. Sin embargo, sólo 4 moluscos son objeto actualmente de un programa de secuenciación del genoma completo. Se trata de un bivalvo (el mejillón *Mytilus californianus*) y tres gasterópodos (el opisthobranchio *Aplysia californica*, un modelo en neurobiología, el pulmonado *Biomphalaria glabrata*, hospedador intermedio del agente causante de la esquistosomiasis, una enfermedad tropical, y la lapa *Lottia scutum*). Ya se han depositado en las bases de datos públicas secuencias genómicas parciales de estos organismos.

En cuanto a los moluscos comerciales, se ha planteado un proyecto de secuenciación de un **genoma completo**, el de la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*). Para ello se ha formalizado un consorcio internacional, el *Oyster Genome Consortium*, constituido por investigadores de 11 países (HEDGECOCK *et al.* 2005). Las razones por las que se ha elegido esta especie son tres. En primer lugar, se trata de la principal especie de molusco cultivada en el mundo. En segundo lugar, su genoma está entre los más pequeños de entre los moluscos (Figura 2), y es comparable en tamaño a los de otros organismos cuyo genoma ya se ha secuenciado completamente, lo que hace prever unos costes asumibles. Y finalmente, es la especie de molusco mejor estudiada

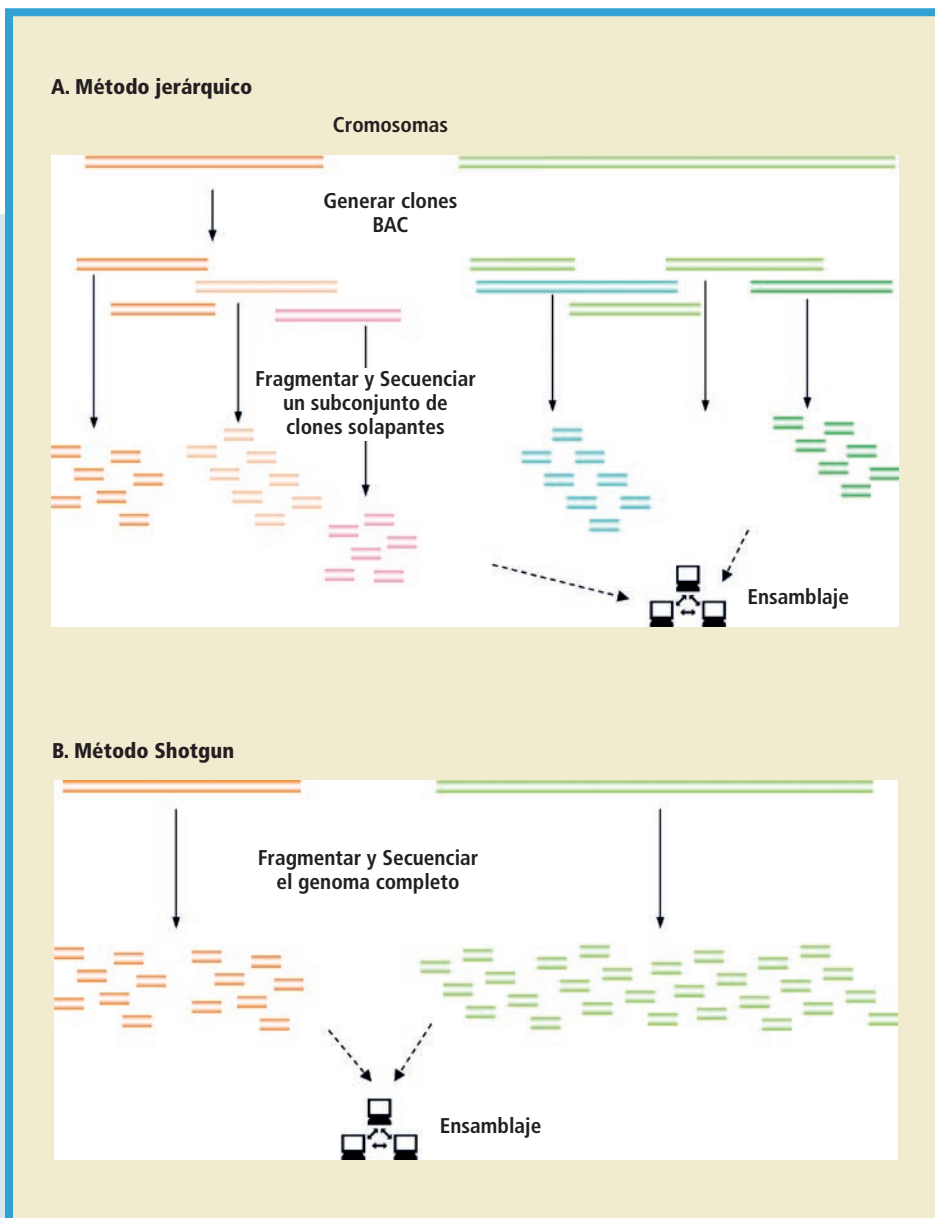
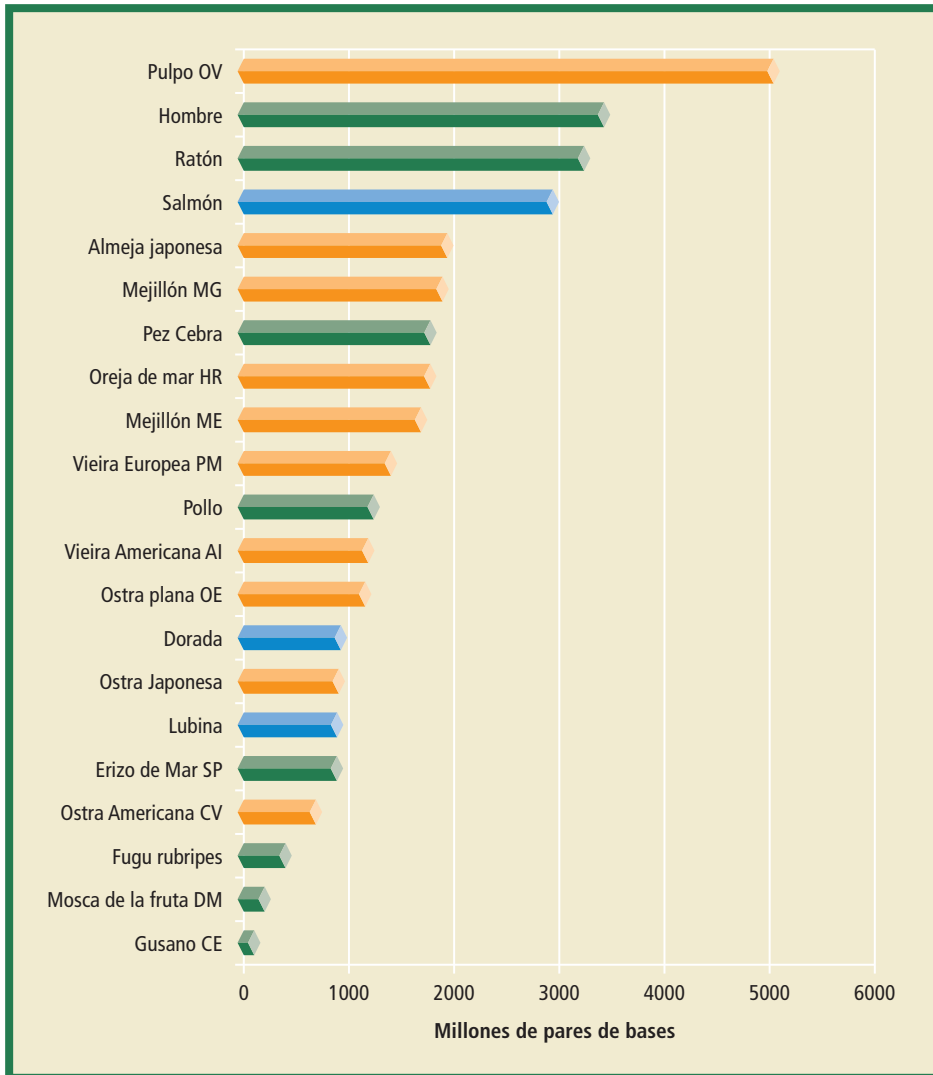


FIGURA 1.
Métodos de secuenciación genómica (según Gibson y Muse 2004).
Ver texto para explicación.



FIGURA 2.

Tamaño del genoma de moluscos cultivados (naranja) comparados con los de otros organismos marinos cultivados (azul) y los de organismos modelo secuenciados (verde). Los datos de organismos no secuenciados se obtuvieron de la base de datos de tamaños del genoma *Genome Size Data Base* (<http://www.genomesize.com>). Abreviaturas: AI, *Argopecten irradians*; CE, *Caenorhabditis elegans*; CV, *Crassostrea virginica*; DM, *Drosophila melanogaster*; HR, *Haliotis rufescens*; ME, *Mytilus edulis*; MG, *M. galloprovincialis*; OE, *Ostrea edulis*; OV, *Octopus vulgaris*; PM, *Pecten maximus*; SP, *Strongylocentrotus purpuratus*.





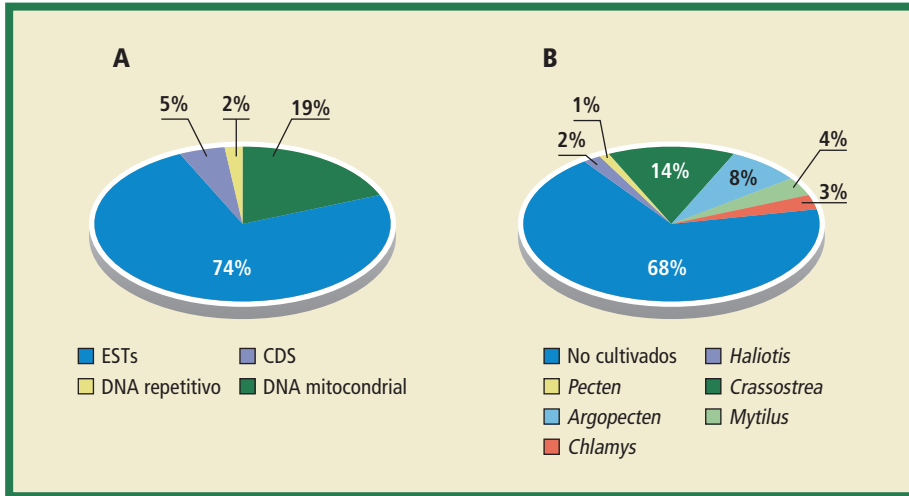
desde el punto de vista genético, lo que incluye la existencia de mapas de ligamiento (Li y Guo 2004; HUBERT y HEDGECOCK 2004), genotecas en vectores BAC (CUNNINGHAM *et al.* 2006), y una gran cantidad de información sobre secuencias genómicas codificantes (Figura 3). Como punto de partida, y de cara a facilitar la obtención de financiación para la secuenciación del genoma completo, se está procediendo a la secuenciación de los extremos de los clones BAC.

A pesar de los avances en las metodologías y técnicas de secuenciación genómica, del incremento de potencia de los sistemas de análisis bioinformáticos y de la reducción de costes, la secuenciación de un genoma completo sigue siendo muy cara. Una alternativa más barata es secuenciar sólo la fracción del genoma que se expresa, es decir, que se transcribe a RNA mensajero (mRNA). Esta fracción no suele superar el 5% del DNA genómico total, pero contiene información de gran interés, precisamente por su carácter codificante. Mediante la realización de genotecas de cDNA, se puede obtener la secuencia completa o parcial de los genes del organismo (excluyendo los intrones). Para ello se extrae el mRNA, y se copia a una cadena complementaria de DNA (cDNA), mediante la enzima transcriptasa inversa. Los cDNAs así obtenidos se clonan a continuación en un vector adecuado (normalmente derivado de un virus bacteriano o de un plásmido), y se secuencian. Dependiendo de los métodos de extracción del mRNA y de elaboración de la genoteca, se pueden clonar los mensajeros completos, o sólo fragmentos de ellos, y además elegir el extremo del mRNA que se prefiere clonar (3' ó 5'). A menudo se secuencia sólo un extremo del fragmento clonado y en un sólo sentido. Las secuencias así obtenidas se denominan ESTs (*Expressed Sequence Tags*), y son la principal fuente actual de datos genómicos en organismos no modelo. Existe una base de datos específica para ellas (BOGULSKI *et al.* 1993). Las colecciones de ESTs se someten a un proceso de anotación, consistente en la identificación del polipéptido o RNA potencialmente codificado por su secuencia de DNA. Para ello se comparan las secuencias obtenidas con las existentes en las bases de datos, mediante programas informáticos como BLAST (MCGINNIS y MADDEN 2004). De esta manera se puede asignar una potencial identidad al EST y una probabilidad asociada de que la identificación sea cierta.



FIGURA 3.

Abundancia de diferentes tipos de secuencias genómicas de moluscos en bases de datos públicas (A) y distribución de ESTs por géneros de interés en acuicultura (B). CDS: secuencias codificantes.



La obtención de colecciones de ESTs suele ser hoy en día el primer escalón de los proyectos de secuenciación genómica (e.g.: POUTSKA *et al.* 2003; RISE *et al.* 2004). Una ventaja añadida del enfoque basado en ESTs es que, como se explicará más adelante, los clones de cDNA pueden utilizarse para construir otras herramientas genómicas como las micromatrices o *microarrays*. Numerosas especies de moluscos han sido o están siendo objeto de proyectos orientados a la obtención de genotecas de cDNAs y colecciones de ESTs (Figura 3B). Entre ellas, especies tan importantes en la acuicultura europea como la ostra japonesa (*C. gigas*) y el mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Existen bases de datos específicas en las que se almacenan las secuencias producidas por proyectos concretos, como la GigasBase de ostra en Francia (<http://www.ifremer.fr/GigasBase>) o la base de datos Marine Genomics americana (www.marinegenomics.com). En breve estarán disponibles más de 9.000 ESTs de las almejas fina (*Ruditapes decussatus*) y japonesa (*R. philippinarum*), producidas a través de la colaboración de varios centros de investigación europeos en el marco de la red Marine Genomics Europe (<http://www.marine-genomics-europe.org>). Esta red



también está contribuyendo a incrementar las colecciones de ESTs de mejillón y de ostra japonesa.

3. MAPAS GENÉTICOS Y GENÓMICA CUANTITATIVA

La elaboración de un mapa genético es otro método de obtener información sobre el genoma. En este caso se trata de información posicional (dónde están localizados determinados genes o secuencias). La elaboración de mapas genéticos no es un método alternativo a la secuenciación de genomas completos, sino complementario. Además, la disponibilidad de mapas previamente a la secuenciación genómica facilita el ensamblaje de las secuencias genómicas, y por lo tanto es un requisito frecuente a la hora de priorizar una especie de cara a la financiación de un proyecto de secuenciación del genoma completo. Pueden distinguirse dos tipos de mapas genéticos: los mapas de ligamiento y los mapas físicos. Ambos tipos requieren metodologías de elaboración diferentes y generan distintos tipos de información.

3.1. Mapas de ligamiento

Los mapas de ligamiento fueron las primeras descripciones del genoma de que dispuso la biología. Se trata de esquemas que muestran la disposición lineal de los genes en los cromosomas, y sus distancias relativas. Orden y distancia pueden calcularse a partir de la frecuencia de recombinación observada en cruzamientos o pedigrís, o a través de otras técnicas más restringidas en cuanto al tipo de organismos a las que pueden aplicarse, como el mapeo híbrido por radiación en vertebrados. En la era pregenómica, se construyeron mapas de ligamiento en las principales especies modelo. Estos mapas se basaban en cruzamientos entre líneas mutantes para variantes morfológicas, fisiológicas, bioquímicas o de conducta, y en humanos, en el estudio de la segregación de variantes genéticas raras en familias o genealogías. Con el desarrollo de la biología molecular y celular, y especialmente con la expansión de los marcadores moleculares, la posibilidad de realizar mapas de ligamiento se ha extendido a casi cualquier organismo en el que se pueda controlar mínimamente el



proceso de reproducción. Utilizando un número suficientemente grande de marcadores moleculares, y estudiando su segregación conjunta en cruces entre individuos, variedades o líneas, pueden ordenarse en un mapa genético (ver capítulo 8).

Los marcadores más utilizados hasta la fecha para elaborar mapas de ligamiento han sido los microsatélites y los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Los microsatélites presentan un gran polimorfismo, pero son más difíciles de genotipar. Los AFLP sólo muestran 2 alelos, y suelen presentar dominancia, pero se pueden genotipar varias decenas simultáneamente. Otros marcadores que se están haciendo populares, por la facilidad de encontrar polimorfismos y de automatizar el genotipado de los individuos, son los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Se trata de polimorfismos de una posición concreta del DNA, que presenta nucleótidos alternativos. Los SNPs son fáciles de detectar secuenciando unos pocos individuos para regiones derivadas de ESTs, o de cualquier otro tipo de secuencia genómica de la que se disponga. Los SNPs son muy abundantes en moluscos. En la ostra japonesa se ha calculado que aparecen en uno de cada 40 pares de bases (CUROLE y HEDGECKOCK 2005), una frecuencia unas 10 veces mayor que en vertebrados.

Los marcadores genéticos se han utilizado en los últimos años para obtener mapas de ligamiento en varias especies de moluscos cultivados. Entre ellos se encuentran especies importantes para acuicultura como la ostra japonesa o la oreja de mar (Tabla 1). Están en marcha

TABLA 1.

Mapas de ligamento realizados en moluscos de interés en Acuicultura.
El número haploide de cromosomas de cada especie se indica en la columna «n».

Especie	n	Principales marcadores utilizados	Grupo de Ligamiento	Referencia
<i>Argopecten irradians</i>	16	AFLP	17	WANG <i>et al.</i> (2006)
<i>Chlamys farreri</i>	19	AFLP	19	LI <i>et al.</i> (2005)
<i>Crassostrea gigas</i>	10	AFLP	10	LI y GUO (2004)
	10	Microsatélites	10	HUBERT y HEDGECKOCK (2004)
<i>Crassostrea virginica</i>	10	AFLP	11	YU y GUO (2003)
<i>Haliotis discus hannao</i>	18	Microsatélites	18	SEKINO y HARA (2006)
		AFLP	18	LIU <i>et al.</i> (2004)
<i>Haliotis rubra</i>	18	Microsatélites	18	BARANSKI <i>et al.</i> (2006)



proyectos para obtener mapas de ligamiento en algunas especies de especial interés en Europa, como los mejillones (*Mytilus* sp.) y las almejas (*Ruditapes* sp.).

3.2. Genómica cuantitativa

Una vez se dispone de un mapa de ligamiento, se puede utilizar para detectar la localización en el genoma de los genes responsables de un carácter de interés para el cultivo. Normalmente se trata de caracteres cuantitativos que están determinados por varios genes en interacción con el ambiente, como la tasa de crecimiento o la resistencia a determinadas enfermedades. Los genes responsables de la variación cuantitativa se llaman «*loci* de caracteres cuantitativos», o QTL (por sus iniciales en inglés). La detección de los QTL se realiza estudiando la segregación conjunta de los marcadores moleculares y los valores del carácter de interés en cruzamientos o pedigrís. La base de esta metodología, que se ha denominado genómica estadística o genómica cuantitativa (LIU 1997), es que los marcadores que están situados más cerca de los genes responsables del carácter (QTL), deben presentar mayor desequilibrio de ligamiento con los QTL que los marcadores más alejados, lo que se reflejará en una asociación estadística de los alelos de estos marcadores con los fenotipos extremos (ver capítulo 9).

La realización de estudios de localización de QTL suele realizarse en paralelo a la realización de los mapas genéticos. Recientemente se han publicado los resultados de un estudio de detección de QTLs para la resistencia a las principales enfermedades de la ostra americana *C. virginica*, que son MSX (causada por *Haplosporidium nelsoni*) y Dermo (causada por *Perkinsus marinus*). La ostra americana fue objeto del primer programa de mejora genética que ha tenido lugar en acuicultura, y que consiguió disminuir la mortalidad debida a MSX a niveles muy bajos en 8 generaciones de selección (FORD y HASKIN 1987). Posteriormente se ha demostrado que esta línea seleccionada también tiene una resistencia moderada a Dermo. Utilizando 2 familias obtenidas del apareamiento entre individuos de la línea seleccionada e individuos salvajes sensibles, Yu y Guo (2006) han detectado 12 regiones genómicas potencialmente relacionadas con la supervivencia tras un episodio de mortalidad provocada por Dermo.



3.3. Mapas físicos

Los mapas físicos se obtienen mediante herramientas ya descritas en la sección 2, básicamente fragmentos genómicos clonados. El fundamento de un mapa físico es la ordenación de los fragmentos contiguos (contigs). Para ello se pueden utilizar diferentes metodologías. Un método que ha sido muy utilizado es el «paseo cromosómico» (*chromosome walking*). En este método, un conjunto de sondas marcadas, derivadas de las regiones terminales de los clones que se van a mapear, se hibridan sucesivamente con la colección de clones. El resultado es una matriz binaria que permite determinar qué clones solapan y el orden de los mismos. En otro enfoque, los clones se digieren con enzimas de restricción y los fragmentos se separan en geles de electroforesis. Las pautas de restricción observadas se analizan mediante métodos informáticos de análisis de imagen. De esta manera, se pueden detectar similitudes indicativas de regiones comunes que desvelan potenciales clones solapantes. En todos estos casos, los extremos de los clones alineados, u otros fragmentos genómicos de los mismos, se pueden secuenciar para generar STS (*Sequence Tagged Sites*), que se utilizarán para la descripción de las distancias a lo largo del mapa físico, de igual forma que los puntos kilométricos indican distancias en un mapa de carreteras. En los moluscos no se ha realizado aún ningún mapa físico del genoma. Para un ejemplo en una especie de interés en acuicultura, puede consultarse el trabajo de Ng *et al.* (2005), en el que se presenta un mapa físico del genoma del salmón (*Salmo salar*).

La utilidad de los mapas físicos está íntimamente relacionada con la facilitación del ensamblaje de secuencias en los proyectos de secuenciación de genomas completos, ya que los STS determinados en el mapa físico deben coincidir en orden y distancia con las mismas secuencias obtenidas en el proceso de ensamblaje genómico. Pero, además, los mapas físicos permiten la comparación entre genomas de diferentes especies. Una particularidad de los genomas es que el orden de los genes está conservado en mayor o menor medida en los diferentes organismos. En general, la conservación del orden, o sintenia, es mayor cuanto más próximo es el parentesco evolutivo entre especies. En este contexto, los mapas físicos son de gran utilidad para



localizar regiones conservadas que contengan genes relacionados con caracteres productivos en una especie a partir de los resultados conocidos en otra. Finalmente, los mapas físicos ayudan en los procesos de mapeo a nivel fino que se realizan con los mapas de ligamiento en las últimas fases de los estudios de genómica cuantitativa.

4. GENÓMICA FUNCIONAL

La genómica funcional tiene como objetivo generar un catálogo de todos los genes de un organismo, o de aquéllos seleccionados previamente, y estudiar su función. Esta disciplina engloba la transcriptómica (o estudio del conjunto completo de transcritos, es decir, del perfil de expresión del genoma), y la proteómica (o estudio del proteoma, es decir, el conjunto de proteínas codificadas por un genoma). Mediante la transcriptómica se analizan los patrones de expresión génica en distintos tejidos, órganos o tratamientos experimentales. Un ejemplo sobresaliente es el proporcionado por el trabajo de JACKSON *et al.* (2006), que mediante estos métodos han realizado un gran avance en el estudio de uno de los aspectos clave de la biología de los moluscos: la formación de la concha. Sin embargo, el objeto de la mayoría de estos estudios ha sido la respuesta inmune de los moluscos, especialmente en lo que respecta a las patologías comunes en moluscos cultivados, y por esta razón las principales metodologías empleadas en transcriptómica se describirán en esta sección en el contexto de estos estudios. La proteómica se tratará separadamente en la sección 5.

4.1. Genotecas de expresión y microarrays: aplicaciones en patología e inmunología de moluscos

Uno de los problemas de las poblaciones de moluscos cultivados, y de los cultivos de cualquier tipo en general, es que el confinamiento y el aumento de densidad de las poblaciones en cultivo desequilibran las interacciones hospedador-patógeno, y fomentan la aparición de enfermedades. Las principales especies de moluscos que se cultivan, como ostras (*C. gigas*, *C. virginica*, *Ostrea edulis*), mejillones (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*), almejas (*R. decussatus* y *R. philippinarum*), vieiras (*Pec-*



ten maximus, *Patinoecten yessoensis*, *Argopecten irradians*, *A. purpuratus* y orejas de mar (*Haliotis discus hanna*, *H. tuberculata*, *H. rufescens*, *H. midae*, *H. cracherodii*), han sufrido enfermedades drásticas que en muchas ocasiones han acabado con los stocks cultivados. La propagación de dos enfermedades causadas por protozoos parásitos, la marteiliosis, causada por *Marteilia refringens*, y la bonamiosis causada por *Bonamia ostreae* redujo la producción de la ostra europea *O. edulis* en la costa francesa y prácticamente en toda Europa (ALDERMAN *et al.* 1979; PICHOT *et al.* 1980; FIGUERAS y MONTES 1988; ROBERT *et al.* 1991; VIRVILIS *et al.* 2003; BERTHE *et al.* 2004; BURRESON y FORD 2004), siendo ahora estos protozoos especies de declaración obligatoria para la OIE (Office International des Epizooties). En todos estos lugares, el cultivo de *O. edulis* fue sustituido por la ostra del Pacífico *C. gigas*, por su resistencia ante estas enfermedades. En el mejillón del Mediterráneo *Mytilus galloprovincialis* y el mejillón azul *Mytilus edulis*, también se ha diagnosticado la marteiliosis (FIGUERAS y MONTES 1988; VILLALBA *et al.* 1993a y b; ROBLED0 y FIGUERAS 1995; FUENTES *et al.* 2002; NOVOA *et al.* 2005).

La haplosporidiosis causada por *H. nelsoni* produjo también un efecto devastador en *C. virginica* y *C. gigas* (SUNILA *et al.* 1999; STEPHENSON *et al.* 2003; KAMAISHI y YOSHINAGA 2002; BURRESON y FORD 2004). Otras especies de Haplosporidios han sido también asociadas a mortalidades en la oreja de mar *H. tuberculata* y *H. iris* (HINE *et al.* 2002; AZEVEDO *et al.* 2006). La perkinsiosis causada por los protozoos parásitos *Perkinsus marinus* y *P. olseni*, entre otras especies de *Perkinsus*, ha sido asociada también a grandes mortalidades en ostra y almeja fundamentalmente, aunque también se ha descrito en vieira y oreja de mar (VILLALBA *et al.* 2004). Además de protozoos parásitos, también hay descritas importantes infecciones por bacterias, fundamentalmente Vibrios, como *Vibrio splendidus* y *V. alginolyticus* (GÓMEZ-LEÓN *et al.* 2005), *V. tapetis*, el agente causante de la enfermedad del anillo marrón (PAILLARD 2004), entre otros (ver revisión de PAILLARD *et al.* 2004) y virus como el Irido-like virus, Herpesvirus y Birnavirus (NOVOA y FIGUERAS 2000; RENAULT y NOVOA 2004). Todos ellos son considerados algunos de los más potentes patógenos en el cultivos de moluscos, causando elevadas mortalidades (BOWER *et al.* 1994). Muchas de estas pérdidas fueron provocadas por la importación de individuos de otras



zonas (CULLOTY *et al.* 1999). Aunque los daños provocados por estos patógenos producen importantes pérdidas económicas en el sector, en la actualidad no existen herramientas efectivas para luchar contra estas enfermedades infecciosas.

Debido a la repercusión de los problemas asociados a estas patologías en el cultivo, la respuesta a los organismos patógenos, y en general los sistemas de defensa inmune de los moluscos, han sido objeto de una atención especial. Los moluscos no cuentan con un sistema inmune específico, y por lo tanto no poseen memoria inmune, pero han desarrollado un potente **sistema inmune innato** que consta de reacciones celulares y humorales diseñadas para reconocer y eliminar patógenos. En la hemolinfa se encuentran los componentes encargados de mediar la respuesta inmune. Los hemocitos son las células involucradas en la inflamación, reparación de daños, encapsulación y fagocitosis (PIPE 1990). Se sabe que los invertebrados son capaces de reconocer diversos patrones moleculares conservados asociados a patógenos (**PAMPs**) mediante los receptores de reconocimiento de patrones específicos de patógenos (PRRs) (MEDZHITOV y JANEWAY 2000), que activan la cascada de señalización de defensa, como los **Toll-like receptors**. Estos se han identificado expresados en la superficie de los hemocitos de la ostra *C. virginica* (TANGUY *et al.* 2004) y de la vieira *Chlamys farreri* (QIU *et al.* 2007). Además la hemolinfa libre de células contiene PRRs solubles específicos, como los péptidos antimicrobianos secretados por los hemocitos, así como diferentes tipos de lectinas, los cuales juegan también un papel fundamental en la respuesta inmune (KANG *et al.* 2006).

El conocimiento del sistema inmune de los moluscos se ha basado hasta ahora fundamentalmente en **ensayos funcionales** desarrollados principalmente en bivalvos (OTTAVIANI *et al.* 1993; ORDÁS *et al.* 1999, 2000, 2001; HAUTON *et al.* 2001; TAFALLA *et al.* 2002, 2003), aunque también hay publicados algunos trabajos en gasterópodos como la oreja de mar (HOOPER *et al.* 2007) y cefalópodos (MALHAM *et al.* 1998; NOVOA *et al.* 2002). Durante la última década ha aumentado el interés sobre este tema, suscitado por el desarrollo de los métodos genómicos y por la creciente importancia que los moluscos tienen en la acuicultura y en la ciencia medioambiental marina (SAAVEDRA y BACHÈRE 2006). Los enfoques genómicos, aunque en este tema actualmente están



todavía en su comienzo, ya están dando lugar a importantes avances en el conocimiento del sistema inmune de los moluscos (TANGUY *et al.* 2004; GUEGUEN *et al.* 2003; KANG *et al.* 2006; GESTAL *et al.* en prensa, PALLAVICINI *et al.* en 2007), y de su capacidad de respuesta inmune y resistencia a determinados patógenos.

En este contexto, las técnicas de transcriptómica se han utilizado para analizar los patrones de expresión en distintos tejidos diana, lo que permite identificar diferencias en la respuesta inmune frente a determinadas condiciones de estrés, infección ó exposición a contaminantes. Por lo tanto, las técnicas de transcriptómica ofrecen una potente herramienta para la identificación y caracterización de genes con un papel relevante en la defensa contra agresores. Esto abre las puertas a la identificación de genes que podrían ser utilizados en la selección asistida por marcadores para producir poblaciones de moluscos resistentes a determinadas infecciones, lo que sería de gran utilidad para la industria de la acuicultura.

Para llevar a cabo este objetivo, es necesario conocer los genes responsables de los caracteres de interés, y estudiar su regulación. Para ello existen distintas técnicas genómicas entre las que se encuentran las micromatrices o **microarrays**, es decir, una colección de sondas de DNA ordenadas en un soporte sólido. Los *microarrays* permiten el análisis simultáneo de la expresión de miles de genes, pudiendo detectar variaciones en la respuesta a determinadas condiciones experimentales, como puede ser la presencia de un patógeno, cambios en una determinada fase del desarrollo, y la identificación de genes relevantes relacionados con los mismos (YANG y SPEED 2002). Los *microarrays* pueden estar constituidos por cDNAs, obtenidos de una genoteca (Figura 4), o por oligos cortos, diseñados a partir de regiones específicas de los ESTs, como las regiones no traducidas del extremo 3' (3'UTRs). La gran cantidad de procesos implicados en el análisis por *microarrays* (creación de librerías, diseño del *array*, hibridación, cuantificación y normalización de la señal, y finalmente correcta clasificación y anotación funcional de los genes), requiere un cuidado especial en el control de errores en el diseño experimental (PASCHALL *et al.* 2004).

Otra técnica de gran potencial en el estudio del sistema inmune de los bivalvos es la obtención de genotecas de hibridación substractiva

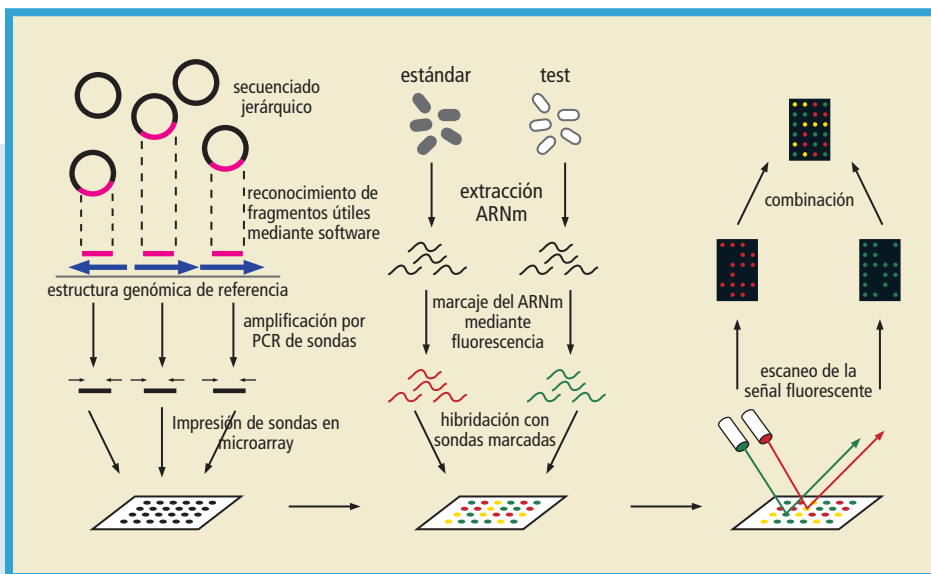
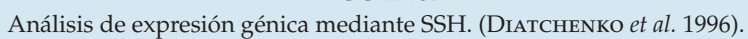


FIGURA 4.

Análisis de expresión génica mediante microarrays de DNA.
(http://www.user.gwdg.de/~aehrenr/arrays/c_arrays.html).

(SSH: Supression Subtractive Hybridization) (DIATCHENKO *et al.* 1996) (Figura 5). Esta técnica combina normalización y substracción en un único proceso. La normalización equipara la abundancia de cDNAs dentro de la población seleccionada, y la substracción excluye las secuencias comunes entre la población a estudiar y la población *driver* o control. La SSH permite seleccionar aquellos genes expresados diferencialmente en distintas poblaciones e incrementar su amplificación hasta 1.000 veces en una substracción.

Debido a la escasa información que existe en cuanto a genómica funcional en moluscos bivalvos, la anotación en las bases de datos y clasificación funcional de las ESTs resultantes de ambas técnicas resulta en muchas ocasiones difícil, teniendo en cuenta que esta clasificación se hace normalmente en base al análisis de similitud o grado de homología de las secuencias ya existentes en las bases de datos, como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).





4.2. Papel de la genómica funcional en la identificación de genes expresados como respuesta inmune frente a agresiones externas

El estudio molecular del sistema inmune de moluscos se restringe casi exclusivamente al análisis funcional de genes mediante secuenciación de ESTs en condiciones de infección, contaminación ambiental o cualquier tipo de estrés, y a la búsqueda de homologías con los genes posiblemente implicados en la respuesta inmune, ya descritos para otras especies, sean o no invertebrados, existentes en las bases de datos. Una vez que se dispone de genes clonados mediante genotecas de cDNA su SSH, o simplemente de una colección de ESTs, se puede estudiar expresión mediante la construcción de *microarrays* de cDNA. Aún así, son pocos los datos que existen en la bibliografía sobre el papel de muchos de los genes expresados en moluscos, por lo que la anotación e identificación que se realiza es únicamente de forma hipotética. En general los mayores esfuerzos en publicación de resultados de genómica se han llevado a cabo en dos especies de ostra. GUEGUEN *et al.* 2003, describió las ESTs generadas por SSH en hemocitos de *C. gigas* tras una infección bacteriana. Los resultados mostraron que de un total de casi 1300 clones secuenciados, un 5% de las ESTs analizadas pueden identificarse como genes implicados en respuesta inmune. Tanguy *et al.* 2004, describieron por este mismo método más de 1000 ESTs obtenidas a partir de los genes expresados en hemocitos y branquias, tanto en *C. virginica* como en *C. gigas*, en respuesta a una infección con *Perkinsus*, y destacaron la importancia del estudio de los genes identificados como posibles candidatos a genes de resistencia. En el caso de la almeja, solamente existen dos trabajos publicados sobre el estudio de ESTs expresadas frente a patógenos. KANG *et al.* 2006, en función de las ESTs analizadas a partir de una librería de cDNA de hemocitos de almeja japonesa (*R. philippinarum*), identificaron un total de 79 nuevas ESTs, de las que un 11% corresponden a genes relacionados con el sistema inmune (aunque un 45% se consideran no identificados), y describieron dos lectinas tipo C (MCL-3 y *mc-sialic acid binding lectin*). GESTAL *et al.* (en prensa), han descrito mediante SSH genes expresados diferencialmente en hemocitos de



almeja fina (*R. decussatus*) estimuladas mediante la inyección de una mezcla de bacterias muertas. Un total de 8,4% de las secuencias obtenidas y clasificadas se identificaron como relacionadas con la respuesta inmune, entre ellas dos nuevos péptidos antimicrobianos (3 miticinas y 1 mitilina), identificadas en almeja por primera vez. Los análisis de expresión mediante PCR cuantitativa confirman que la infección bacteriana induce la expresión de ambos péptidos.

En todos estos casos, entre el total de ESTs clasificadas se encuentran diferentes proteínas de choque térmico (HSP 70, HSP 90), lectinas tipo C, proteínas inducidas por estrés, como la ferritina, y diferentes péptidos antimicrobianos, entre otras. La interacción entre microorganismos y respuesta inmune del hospedador es la clave determinante para el conocimiento del proceso infeccioso, por lo que la identificación y estudio de la regulación de estos genes sería de gran importancia para la acuicultura. Aún así, un elevado porcentaje de ESTs se clasifican como desconocidas debido a la falta de datos comparativos en las bases de datos disponibles, lo que evidencia el gran desconocimiento que existe en lo referente al sistema inmune y mecanismos de resistencia de moluscos ante diferentes agresiones.

A partir de estos trabajos, se ha publicado un discreto número de estudios sobre la regulación de determinados genes implicados en mecanismos de defensa, y análisis de expresión diferencial en respuesta a distintos estímulos y situaciones de estrés.

Respuesta ante factores de estrés

Los moluscos bivalvos son organismos que por su fisiología acumulan grandes cantidades de metales en sus tejidos. Las **metalotioneínas** son pequeñas proteínas de unión a iones metálicos (*metal binding proteins*) cuya expresión es inducida a nivel de transcripción por iones de metales pesados, estrés oxidativo e inflamación. Estas proteínas han sido caracterizadas en el mejillón *M. edulis* (BARSYTE *et al.* 1999), describiéndose dos isoformas (MT10 y MT20). También han sido caracterizadas en *M. galloprovincialis* (CERATTO *et al.* 2002; DONDERO *et al.* 2005). En un trabajo publicado recientemente, JENNY *et al.* (2006) han caracterizado otras dos familias de esta metalotioneína en *C. virginica*, y han confirmado su sobreexpresión en branquias tras la



exposición a metales como cadmio o zinc, mostrando un importante papel en detoxificación y respuesta a condiciones de estrés por determinados metales. Estos autores también han comprobado, mediante SSH, la inhibición de la expresión de esta proteína en hemocitos en respuesta a condiciones de estrés, como la inmunoestimulación de las ostras mediante inyección intramuscular de una mezcla de bacterias muertas. MONTAGNANI *et al.* (2001; 2007) han caracterizado en ostra *C. gigas* otra proteína relacionada con factores de estrés y respuesta frente a patógenos, siendo ésta la primera **proteína inhibidora de metaloproteínasa** (Cg-TIMP) encontrada en moluscos. Estos autores han demostrado que la expresión de esta proteína está inducida por daño mecánico y por estimulación bacteriana, y han sugerido el importante papel de la expresión equilibrada de MT/TIMP en la respuesta inmune de estos moluscos.

Las proteínas de choque térmico (**Heat shock proteins, HSP**) se expresan constitutivamente en las células, y están relacionadas con el plegamiento de proteínas, ensamblaje y degradación, entre otras funciones. Sin embargo, su sobreexpresión constituye un mecanismo molecular relacionado con el estrés. El aumento de estas proteínas específicas fue descrito por primera vez en hemocitos de la ostra americana (*C. virginica*) y en el mejillón *M. trossulus* tras permanecer durante 1 hora a 41 °C (TIRARD *et al.* 1995; HOFMANN y SOMERO 1995). En moluscos bivalvos se han descrito tres grandes grupos o familias de HSP: HSP40, HSP70 y HSP90. Además de éstas, descritas en la ostra y el mejillón, se han encontrado proteínas con características similares a la HSP70 en la vieira *Argopecten irradians* (SONG *et al.* 2006) y en la zamburiña *Chlamys farreri* (WU *et al.* 2003). En el mejillón *M. galloprovincialis*, la expresión de la HSP70 se eleva tras su exposición durante 30-90 minutos a 30 °C, comenzando su estimulación entre 3 y 6 horas después de la exposición al calor, y continuando hasta al menos 24 horas después (CELLURA *et al.* 2006). Curiosamente, también se ha comprobado una sobreexpresión de la HSP70 tras la inyección de *V. anguillarum*, en contraste con *V. splendidus* o *Micrococcus lysodeikticus*, que no inducen una marcada expresión de esta proteína (CELLURA *et al.* 2006).



Péptidos antimicrobianos (AMP)

Los péptidos antimicrobianos son unos de los efectores más importantes de la inmunidad innata. Son universales, encontrándose desde bacterias a plantas o animales (ver revisión de BOMAN 1995). Los primeros péptidos antimicrobianos descritos en moluscos marinos fueron proteínas largas de 56-250 KDa encontrados en gasterópodos (KISUGI *et al.* 1992). Más tarde se purificaron pequeñas proteínas de 4 kDa en hemocitos de mejillón (CHARLET *et al.* 1996; HUBERT *et al.* 1996).

Los péptidos antimicrobianos se han identificado en las especies de ostra *C. virginica* y *C. gigas* (SEO *et al.* 2005; GONZÁLEZ *et al.* 2007), en los mejillones *M. galloprovincialis* y *M. edulis* (CHARLET *et al.* 1996; HUBERT, *et al.* 1996; MITTA *et al.* 1999a y b; PALLAVICINI *et al.* en 2007), y recientemente se han identificado y caracterizado también en almeja fina *R. decussatus* (GESTAL *et al.* en prensa). Estos AMPs se clasifican en cuatro grupos o familias teniendo en cuenta las características de su estructura primaria y su secuencia de cisternas consenso: i) mytilinas, originarias de mejillón, con seis isoformas (A, B, C, D y G1) (MITTA *et al.* 2000 a y b), y la recientemente descrita en almeja *Clam-mytilin* (GESTAL *et al.* en prensa); ii) myticinas, también originarias de mejillón, con seis isoformas: A, B (MITTA *et al.* 1999a), las recientemente descritas formas C del mejillón (PALLAVICINI *et al.* en 2007) y «*Clam-myticin*» isoformas 1, 2 y 3 de almeja (GESTAL *et al.* en prensa); iii) defensinas, encontradas en mejillones y ostras, con dos isoformas en *M. galloprovincialis* (MGD1 y MGD2), *M. edulis* (defensinas A y B), *C. gigas* (Cg-Def1 y Cg-Def2), y una en *C. virginica* (AOD, *American oyster defensin*) (CHARLET *et al.* 1996; MITTA *et al.* 2000a, GONZÁLEZ *et al.* 2007; SEO *et al.* 2005); y iv) mytimicina, parcialmente caracterizada en plasma de *M. edulis* (CHARLET *et al.* 1996).

Los péptidos antimicrobianos descritos en *M. galloprovincialis*, independientemente de la familia a la que pertenezcan, poseen 8 cisteínas conservadas ordenadas específicamente (MITTA *et al.* 2000c). Diferencias en otros aminoácidos determinan distintas isoformas, con diferentes actividades biológicas, lo cual indica posiblemente el grado de especificidad de este ancestral sistema de defensa innato. La secuenciación de los genes de estos AMPs, muestra un mismo patrón en todos ellos, con cuatro exones y dos intrones (MITTA *et al.*



2000b). La estructura de las defensinas en *M. galloprovincialis* (YANG *et al.* 2000) y *C. gigas* (GUEGUEN *et al.* 2006) parece muy próxima a la descrita en los artrópodos. Esta misma estructura es compartida por la nueva clase de miticina C descrita en *M. galloprovincialis* (PALLAVICINI *et al.* en 2007). En este mismo trabajo, y como resultado de una SSH y genoteca de cDNA obtenida tras la inmunoestimulación de mejillones con una mezcla de bacterias y con Poly I:C (compuesto químico sintético que simula la infección viral), se encontraron un total de 74 variantes del precursor de esta miticina C. Estas nuevas variantes, compuestas por 100 residuos aminoacídicos, a pesar de presentar una disposición típica para miticinas de 8 cisteínas, presentan una elevada variación en la región C-terminal (además de 4 residuos extras ausentes en miticinas A y B), lo que llevó a la identificación de esta nueva clase de miticinas, altamente polimórfica. Además, entre las secuencias identificadas con homología con AMP, se encontraron isoformas A y B de mitilina, y también, aunque en menor número, defensinas.

En la almeja japonesa *R. philippinarum*, solamente se ha identificado una EST con homología con la defensina MGD-1 (KANG *et al.* 2006). La secuencia está publicada en el GenBank bajo el número P80571, aunque actualmente no existe ningún trabajo adicional que profundice en el estudio de esta secuencia. En la ostra *C. gigas*, se ha aislado una forma peptídica similar a la defensina a partir de extracto de branquias (SEO *et al.* 2005). Posteriormente, y mediante técnicas de biología molecular, se identificaron 2 isoformas de péptidos similares a defensinas en este mismo hospedador (GUEGUEN *et al.* 2006; GONZÁLEZ *et al.* 2007).

La expresión de los genes de defensinas, miticinas y mitilinas en moluscos se había descrito, hasta ahora, únicamente en hemocitos, con excepción de la defensina de ostra, la cual se encuentra constitutivamente expresada también en manto. Sin embargo, recientemente, PALLAVICINI *et al.* (en 2007), han descrito la expresión constitutiva de la miticina C tanto en hemocitos como en branquia, manto y glándula digestiva. Aunque parece que los AMPs se expresan constitutivamente en mejillones, CELLURA *et al.* (2007) han indicado que las miticinas se expresan diez veces más que las mitilinas y las defensinas. Sin embargo, estos genes parecen estar regulados diferencialmente en función



del tipo de infección bacteriana a la que se sometían. Así, CELLURA *et al.* (2007) han descrito un incremento de la expresión de mitilina en mejillones infectados con *V. anguillarum* durante las 24 h siguientes a la infección, mientras que *M. lysodeikticus* provocaba una supresión de la expresión de defensina, y *V. splendidus* producía una supresión tanto de la miticina como de la mitilina. Por el contrario, la defensina de ostra parece no sufrir variaciones de expresión después de la infección bacteriana (GUEGUEN *et al.* 2006).

Otros genes implicados en respuesta inmune descritos recientemente en bivalvos son los que codifican las **Cg-TGF- β** (*Transforming growth factor- β*), unas proteínas similares a la citoquina TGF- β descrita en vertebrados, con múltiples funciones. Curiosamente esta proteína se encuentra sobreexpresada en hemocitos de *C. gigas* durante infecciones provocadas por bacterias Gram-negativas, lo que sugiere su actuación como una citoquina, descrita en moluscos por primera vez, e implicada en la respuesta inmune (LELONG *et al.* 2007).

4.3. Genómica funcional de la heterosis en los moluscos

El vigor híbrido o heterosis, el fenómeno por el cual los híbridos crecen más rápido o sobreviven más que las especies o linajes parentales, es un fenómeno común en los animales de granja y en las plantas cultivadas, y es la base de uno de los principales métodos de mejora genética. Las causas de la heterosis continúan siendo objeto de debate, pudiendo clasificarse en tres categorías no excluyentes: efectos de sobredominancia (ventaja de los heterocigotos), dominancia y epistasis (interacciones entre genes).

La heterosis fue descubierta en los moluscos hace unos 30 años de manera indirecta, en la forma de una relación entre la variabilidad alozímica y varios caracteres relacionados con la eficacia biológica. SING y ZOUROS (1978) y ZOUROS *et al.* (1983) encontraron que el número de genes alozímicos para los que un individuo era heterocigoto estaba correlacionado con la tasa de crecimiento y la viabilidad en la ostra americana (*C. virginica*). Este tipo de observaciones se repitió posteriormente en numerosos experimentos con diversas especies de



moluscos. Desde entonces, los bivalvos se encuentran entre los principales organismos empleados en la investigación sobre la heterosis.

El fenómeno de la heterosis en la ostra ha sido estudiado recientemente desde el punto de vista genómico por HEDGECOCK *et al.* (2007), mediante técnicas de transcriptómica. Estos autores estudiaron las pautas de expresión génica en dos líneas parcialmente consanguíneas de ostra japonesa (*C. gigas*) y en sus cruzamientos recíprocos, que mostraban heterosis para el crecimiento durante la fase larvaria (HEDGECOCK *et al.* 1995). En primer lugar se obtuvo una genoteca de expresión de cada una de las cuatro familias mediante la técnica de *Megacloning*, y a continuación se identificaron los transcritos mediante la técnica de secuenciación masiva de firmas (*Massive Parallel Signature Sequencing*, MPS) (BRENNER *et al.* 2000 a y b). La sensibilidad de estas técnicas es enorme, y permiten detectar y cuantificar RNA mensajeros transcritos con una frecuencia de tan sólo 3 copias por millón. De cada mensajero se obtiene una corta secuencia identificativa de 17 nucleótidos de longitud, denominada firma, característica del mismo. Al igual que una firma permite clasificar los libros en el catálogo de una biblioteca, HEDGECOCK *et al.* (2007) clasificaron los mensajeros mediante sus firmas y determinaron el número de copias de cada uno. A continuación compararon las diferencias de expresión de cada mensajero en los híbridos y las líneas parentales, contando el número de cada una de las firmas en cada familia. Las firmas se clasificaron luego en 6 pautas de acción génica, según mostraran sobredominancia, subdominancia o diferentes grados de dominancia para la expresión en los híbridos. En cada cruzamiento híbrido se hallaron más de 3.500 firmas (> 95%) con pautas de expresión que se desviaban del valor intermedio de las líneas parentales (expresión no aditiva), aunque éste número se reducía a 348 si sólo se tenían en cuenta las firmas que presentaban la misma pauta de acción génica en las dos familias híbridas y se realizaban ajustes adicionales. De estas 348 firmas, aproximadamente un tercio mostraban sobredominancia, y otro tercio dominancia en la dirección de la línea parental de menor nivel de expresión. Estos resultados sugieren una causa mixta para la heterosis en la ostra. También se observó que los cambios en la pauta de expresión de los híbridos dependían de la línea



que se utilizara como fuente de cada progenitor (efecto parental). Estos resultados poseen evidentes implicaciones de cara a la mejora genética de los moluscos.

4.4. Microarrays y su aplicación en la búsqueda de marcadores de contaminación en el mejillón

Los moluscos bivalvos, y específicamente los mejillones, por su condición de filtradores intermareales, acumulan componentes xenobióticos, y por tanto son buenos candidatos para su utilización como biosensores de contaminación costera. Recientemente, VENIER *et al.* (2006) han producido el primer *microarray* de cDNA de mejillón *M. galloprovincialis* (**MytArray 1.0**), y el único que está disponible hoy en día. Este *microarray* contiene un total de 1800 sondas diferentes, obtenidas de distintos tejidos, y cuidadosamente seleccionadas tras su identificación con ayuda de los sistemas de *software* BlastX y tBlastX (McGINNIS y MADDEN 2004). La posterior hibridación de los clones impresos en el *microarray* con cDNA de mejillón expuesto a diferentes metales y contaminantes orgánicos permitió la identificación de 27 genes potencialmente marcadores de contaminantes orgánicos, y 16 genes potencialmente marcadores de metales pesados. Además, y prácticamente en paralelo, DONDERO *et al.* (2006) produjeron también un *microarray* de oligonucleótidos de baja densidad (48 oligonucleótidos), denominado (**Mytox-chip**), para estudio de genes candidatos a marcadores de contaminación y genes relacionados con la respuesta al estrés producida por la acción de xenobióticos.

5. PROTEÓMICA Y SUS APLICACIONES

Los *microarrays* de DNA se han consolidado como una herramienta fundamental para el análisis de la expresión génica a nivel genómico. Sin embargo, la determinación de la cantidad de mRNA mediante *microarrays* de DNA no proporciona la información suficiente sobre las proteínas que se traducen a partir de esta molécula. Esto es debido a que las proteínas sufren una serie de modificaciones post-traduccionales a lo largo de su proceso de síntesis, que consisten fundamentalmente en procesamientos proteolíticos, glicosilaciones y formación de



complejos proteicos. Además, para que las proteínas sean funcionales, deben plegarse de forma correcta. Para completar esta información es necesario recurrir a la proteómica. El proteoma es el conjunto de proteínas expresadas por una célula en un momento concreto, siendo por tanto la proteómica la disciplina que estudia la expresión génica a nivel de las proteínas. Los estudios proteómicos son considerados de gran utilidad en diversos campos relacionados con la acuicultura. Por ejemplo, el estudio proteómico de las fases larvarias del mejillón y de otras especies de moluscos que coexisten en el mismo hábitat puede permitir el aislamiento de proteínas específicas que contribuyan a desarrollar métodos inmunológicos de identificación larvaria en muestras de plácton, de cara a la predicción de las pautas de fijación de semilla de mejillón en los colectores utilizados habitualmente por los cultivadores (LÓPEZ *et al.* 2005; LORENZO-ABALDE *et al.* 2005). Las técnicas más habituales en los estudios de proteómica son la electroforesis bidimensional y las basadas en espectrometría de masas, como MALDI-TOF.

Los primeros estudios desarrollados en moluscos comerciales mediante técnicas de proteómica estaban dirigidos hacia la caracterización de las diferencias en las pautas de expresión de proteínas entre especies de mejillón, filogenéticamente muy próximas, pero con requerimientos ecológicos muy diferentes (LÓPEZ *et al.* 2002, 2005; LÓPEZ, 2006). Estos estudios permitieron determinar mayores niveles de expresión en algunas proteínas relacionadas con la resistencia al estrés (HSP70, calreticulina) en mejillones (*M. galloprovincialis*) procedentes de la zona intermareal que en los procedentes de cultivo en batea, que supuestamente habitan un ambiente más homogéneo. Recientemente se ha ampliado el abanico de temas abordados mediante enfoques proteómicos. Uno de los aspectos que están despertando mayor interés es la identificación de grupos críticos de proteínas expresadas normalmente en moluscos tras la exposición a contaminantes tóxicos (RODRÍGUEZ-ORTEGA *et al.* 2003; APRAIZ *et al.* 2006). En este contexto se está utilizando con éxito la metodología del estudio de las firmas de expresión proteica (*Protein Expression Signature, PES*). El riesgo de las toxinas ambientales depende del balance metabólico entre bioactivación y enzimas de detoxificación. Por lo tanto, todos aquellos agen-



tes que puedan alterar la expresión enzimática son factores críticos en toxicidad. El estudio de estos cambios en la expresión y los análisis cuantitativos de determinadas proteínas en respuesta a contaminantes es ahora posible con la aplicación de una nueva tecnología denominada SELDI-TOF (*Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*), una técnica de espectrometría de masas variante del MALDI-TOF, con una gran eficiencia en la detección y medida de cambios en la transcripción proteica. La aplicación de estas técnicas, y el análisis de los datos que ofrecen, proporcionarán información crucial para el conocimiento de los mecanismos de toxicidad de xenobióticos en los ecosistemas marinos, y para el estudio de otros aspectos de la biología de los moluscos.

6. FUTURAS APLICACIONES DE LA GENÓMICA DE MOLUSCOS EN LA ACUICULTURA

Como se ha visto, los métodos genómicos ofrecen herramientas muy poderosas para el estudio de las bases moleculares de caracteres biológicos de interés en acuicultura, como la resistencia a enfermedades o al estrés. Otros aspectos de interés para el cultivo ya están empezando a ser abordados, o lo serán en un futuro próximo, mediante enfoques genómicos.

Uno de los aspectos más importantes desde el punto de vista del cultivo es la calidad sanitaria de cara a su salida al mercado. Uno de los factores determinantes de la calidad sanitaria en muchos moluscos, especialmente en las especies filtradoras como los bivalvos, es la presencia de toxinas de origen fitoplanctónico que se producen durante los episodios de «mareas rojas» (BRICELI y SHUMWAY 1998; BURGESS y SHAW 2001). Algunas toxinas afectan a los animales, y otras no afectan a los animales, pero sí a las personas que los ingieren. Debido a ello, la extracción de moluscos cultivados puede verse paralizada y resultar en pérdidas económicas importantes para los cultivadores. La tasa de acumulación y depuración de estas toxinas varía ampliamente según la especie. Las bases moleculares y celulares de la respuesta a las toxinas fitoplanctónicas en moluscos son mal conocidas. Recientemente, se ha



descubierto que las diferencias entre poblaciones de la almeja americana *Mya arenaria* respecto a la sensibilidad a la toxina paralizante (PSP) están relacionadas con el polimorfismo de un gen que codifica la subunidad α de un canal de sodio (BRICELI *et al.* 2005). Este polimorfismo resulta en la sustitución de un residuo de ácido glutámico presente en la región del poro exterior del canal de los animales sensibles a la toxina, por otro de ácido aspártico, presente en los animales resistentes. Aunque este trabajo arroja luz sobre la base molecular de la resistencia del molusco a la toxina, los fundamentos moleculares de las diferencias en las tasas de depuración entre individuos o especies siguen sin conocerse, y son un tema idóneo para la aplicación de metodologías genómicas.

Otro aspecto de gran importancia en el cultivo de moluscos es el diseño de dietas de calidad que garanticen la supervivencia larvaria óptima, el crecimiento de la semilla y la maduración sexual (WALNE 1974; KNAUER y SOUTHGATE 1999). Uno de los problemas asociados a este campo de investigación es el escaso conocimiento de la alimentación de las especies cultivadas en su medio natural, especialmente en los grupos filtradores como los bivalvos. Este problema puede abordarse mediante enfoques de «genómica ambiental» (VENTER *et al.* 2004) para el análisis de los contenidos estomacales. Esta metodología consiste en el aislamiento de los microorganismos del tracto digestivo mediante filtrado, la extracción del DNA total de la muestra, y la amplificación mediante PCR de uno o más genes diana con cebadores universales que funcionan en un amplio rango de organismos. Tras clonar los productos de PCR y secuenciar un gran número de clones, se puede realizar la identificación de las especies presentes en el contenido estomacal mediante la comparación de las secuencias con las existentes en las bases de datos. Esta metodología ya se ha utilizado para estudiar el contenido estomacal en el bivalvo *Lucinoma aequizonata* (DUPLESSIS *et al.* 2004; BLANKENSHIP y YAYANOS 2005). Un posible desarrollo posterior sería el uso de micromatrices que contengan secuencias de un gran número de organismos potencialmente constitutivos de la dieta, para estudiar la alimentación de los animales en diferentes localidades, y a partir de estos datos determinar las composiciones relativas que resultan en mejores características para el cultivo, o localizar los mejores lugares para el engorde.



Un área relacionada con la anterior es el estudio de la maquinaria digestiva de los moluscos. Aunque ya se ha realizado un gran esfuerzo en el estudio fisiológico, y se han llevado a cabo estudios de los principales enzimas implicados en la digestión, los aspectos moleculares aún no han sido abordados satisfactoriamente. Recientemente, se ha demostrado la relación de un polimorfismo en los genes de la amilasa con grandes diferencias en tasa de crecimiento entre familias de ostra japonesa (PRUDENCE *et al.* 2006), lo que demuestra el gran interés de este tipo de estudios de cara a la producción. Las técnicas de genómica funcional permitirán un enorme progreso en este campo. Por otra parte, el crecimiento es un carácter idóneo para abordar mediante estudios de genómica estadística, como también lo son los aspectos relacionados con la resistencia a enfermedades.

Las bases moleculares y genéticas de la determinación del sexo y la maduración sexual, son otros aspectos mal conocidos de la biología de moluscos, a pesar de ser de gran importancia para el control adecuado de la reproducción en criaderos y facilitar la aplicación de métodos genéticos de mejora de la producción. Los moluscos no poseen un sistema de determinación cromosómica del sexo. Se han propuesto diferentes mecanismos de determinación de sexo, con una gran variabilidad entre especies (para revisiones ver GUO *et al.* 1998 y AVISE *et al.* 2004), pero faltan estudios concluyentes. De la misma forma, los mecanismos moleculares de diferenciación de la gónada y de maduración gamética se desconocen, y son también problemas idóneos para ser tratados mediante métodos genómicos.

Finalmente, hay que resaltar que los aspectos discutidos hasta ahora en este artículo se han referido mayoritariamente a la fase adulta del ciclo biológico de los moluscos. Sin embargo, la biología de las fases larvarias es en gran medida desconocida, especialmente en el ámbito celular y molecular. Las metodologías genómicas son perfectamente aplicables incluso en larvas individuales (JENNY *et al.* 2002; LÓPEZ *et al.* 2005; HEDGECOCK *et al.* 2007), y debería hacerse un esfuerzo de investigación especial sobre esta fase del ciclo vital. De interés inmediato resulta saber si las fases larvarias y adulta se caracterizan por la expresión de bloques de genes comunes o existen grandes diferencias en los conjuntos de genes expresados en cada una. Experimentos en este



sentido ya se están llevando a cabo en la vieira americana *Argopecten irradians* (<http://www.mbl.edu/aquaculture/EST>).

BIBLIOGRAFÍA

- ALDERMAN, D.J., 1979 Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. Mar. Fish Rev. **41**: 67-69.
- APRAIZ, I., J. MI y S. CRISTÓBAL, 2006 Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). Mol. Cell. Proteomics **5**: 1274-1285.
- AVISE, J.C., A.J. POWER y D. WALKER, 2004 Genetic sex determination, gender identification and pseudohermaphroditism in the knobbed whelk, *Busycon carica* (Mollusca: Melongenidae). Proc. R. Soc. Lond. B **271** : 641-646.
- AZEVEDO, C., P. BALSEIRO, G. CASAL, C. GESTAL, R. ARANGUREN, N.A. STOKES, R.B. CARNEGIE, B. NOVOA, E.M. BURRESON y A. FIGUERAS, 2006 Ultrastructure and molecular characterization of *Haplosporidium montforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*. J. Invert. Pathol. **92**: 23-32.
- BARANSKI, M., S. LOUGHNAN, C.M. AUSTIN y N.A. ROBINSON, 2006 Microsatellite linkage map of the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. Animal Genet. **37**: 563-570.
- BARSYTE, D., K.N. WHITE y D.A. LOVEJOY, 1999 Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. Comp. Biochem. Physiol. C **122**: 287-296.
- BERTHE, F.C.J., F. LE ROUX, R.D. ADLARD y A. FIGUERAS, 2004 Marteiliosis in mollusks: A review. Aquat. Living resour. **17**: 433-448.
- BLANKENSHIP, L.E., y A.A. YAYANOS, 2005 Universal primers and PCR of gut contents to study marine invertebrate diets. Mol. Ecol. **14**, 891-899.
- BOGUSKI, M, T. LOWE y C. TOLSTOSHEV, 1993 dbEST: database for «expressed sequence tags». Nat. Genet. **4**: 332-333.
- BOMAN, H.G. 1995 Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annu. Rev. Immunol. **13**: 61-92.
- BOWER, S.M., S. E. MCGLADDERY e I.M. PRICE, 1994 Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Ann. Rev. Fish Dis. **4**: 1-199.
- BRENNER, S., S.R.WILLIAMS, E.H. VERMAAS, T. STORCK, K. MOON, C. MCCOLLUM, J.I. MAO, S. LUO, J.J. KIRCHNER, S. ELET, R.B. DUBRIDGE, T. BURCHAM y G. ALBRECHT, 2000a *In vitro* cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: physical separation of differentially expressed cDNAs. Proc. Natl. Acad. Sci.USA **97**: 1665-1670.



- BRENNER, S., M. JOHNSON, J. BRIDGHAM, G. GOLDA, *et al.*, 2000b Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat. Biotechnol.* **18**: 630-634.
- BRICELI, V.M., L. CONNELL, K. KONOKI, S.P. MACQUARRIE, T. SCHEUER, W.A. CATTERALL y V.L. TRAINER, 2005 Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increase risk of PSP. *Nature* **434**: 763-767.
- BRICELI, V.M., y S.E. SHUMWAY, 1998 Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.* **6**: 315-383.
- BURGESS, V., y G. SHAW, 2001 Pectenotoxins-an issue for public health: a review of their comparative toxicology and metabolism. *Environ. Int.* **271**: 275-283.
- BURRESON, E.M., y E. FORD, 2004 A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat. Living Resour.* **17**: 199-517.
- CELLURA, C.M., M. TOUBIANA, N. PARRINELLO y P. ROCH, 2006. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**: 984-997.
- CELLURA, C., M. TOUBIANA, N. PARRINELLO y P. ROCH, 2007 Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish Shellfish Immunol.* **22**: 340-350.
- CERATTO, N., F. DONDERO, J.W. VAN DE LOO, B. BURLANDO y A. VIARENGO, 2002 Cloning and sequencing of a novel metallothionein gene in *Mytilus galloprovincialis*. *Lam. Comp. Biochem. Physiol. C* **131**: 217-222.
- CHARLET, M, S. CHERNYSH, H. PHILIPPE, C. HETRUT, J. HOFFMANN y P. BULET, 1996 Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a molluscs, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**:340-350.
- CULLOTY, S. C., B. NOVOA, M. PERNAS, M. LONGSHAW, M.F. MULCAHY, S.W. FEIST y A. FIGUERAS, 1999 Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vector for this parasite. *Dis. Aquat. Org.* **37**: 73-80.
- CUNNINGHAM, C., J. I. HIKIMA, M.J. JENNY, R.W. CHAPMAN, G.C. FANG, C. SASKI, M.L. LUNDQVIST, R.A. WING, P.M. CUPIT, P.S. GROSS, G.W. WARR y J.P. TOMKINS, 2006 New resources for marine genomics: bacterial artificial chromosome libraries from the Eastern and Pacific oysters (*Crassostrea virginica* and *C. gigas*). *Mar. Biotechnol.* **8**: 521-33.
- CUROLE, J.P., y D. HEDGECOCK, 2005 High frequency of SNPs in the Pacific oyster genome, Plant and Animal Genomes XIII Conference, San Diego (http://www.intl-pag.org/13/abstracts/PAG13_W026.html).



- DIATCHENKO, L., Y.F. LAU, A.P. CAMPBELL, A. CHENCHIK, F. MOQADAM, B. HUANG, S. LUKYANOV, K. LUKYANOV, N. GURSKAYA, E.D. SVERDLOV y P.D. SIEBERT, 1996 Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 6025-6030.
- DONDERO, F., L. PIACENTINI, M. BANNI, M. REBELO, B. BURLANDO y A. VIARENGO, 2005 Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene* **345**: 259-270.
- DONDERO, F., L. PIACENTINI, F. MARSANO, M. REBELO, L. VERGANI, P. VENIER y A. VIARENGO, 2006 Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray. *Gene* **376**: 24-36.
- DUPLESSIS, M.R., S.C. DUFOUR, L.E. BLANKENSHIP, H. FELBECK y A.A. YAYANOS, 2004 Anatomical and experimental evidence for particulate feeding in *Lucinoma aequizonata* and *Parvilucina tenuisculpta* (Bivalvia: Lucinidae) from the Santa Barbara basin. *Mar. Biol.* **145**: 551-561.
- FIGUERAS, A.J., y J. MONTES, 1988 Aber disease of edible oysters caused by *Mar-teilia refringens*. *Am. Fish Soc. Spec. Publ.* **18**: 38-46.
- FORD, S.E., y H.H. HASKIN, 1987 Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *J. Parasitol.* **73**: 268-376.
- FUENTES, J., J.L. LÓPEZ, E. MOSQUERA, J. VÁZQUEZ, A. VILLALBA y G. ÁLVAREZ, 2002 Growth, mortality, pathological conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* crosses cultured in the Ría de Arousa (NW Spain). *Aquaculture* **213**: 233-251.
- GESTAL, C., M.M. COSTA, B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2007 Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: identification of new antimicrobial peptides. *Gene* (en prensa).
- GIBSON, G., y S.V. MUSE, 2004 *A primer of Genome Science*. 2nd ed. Sinauer, Sunderland.
- GÓMEZ-LEÓN, J., L. VILLAMIL, M.L. LEMOS, B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2005 Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 98-104.
- GONZÁLEZ, M., Y. GUEGUEN, G. DESSERRE, J. LORGERIL, B. ROMESTAND y E. BACHÈRE, 2007 Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **31**: 332-339.
- GUEGUEN, Y., J.P. CADORET, D. FLAMENT, C. BARREAU-ROUMIGUIÈRE, A.L. GIRARDOT, J. GARNIER, A. HOAREAU, E. BACHÈRE y A. ESCOUBAS, 2003 Immune gene discovery



- by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* **303**: 139-145.
- GUEGUEN Y, A. HERPIN, A. AUMELAS, J. GARNIER, J. FIEVET, J.M. ESCOUBAS, P. BULET, M. GONZALEZ, C. LELONG, P. FAVREL y E. BACHÈRE, 2006 Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*: recombinant production, holding, solution structure, antimicrobial activities and gene expression. *J. Biol. Chem.* **281**: 313-323.
- GUO, X., D. HEDGECOCK, W.K. HERSHBERGER, K.COOPER y S.K. ALLEN, JR., 1998 Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* **52**: 394-402
- HAUTON, C., L.E. HAWKINS y S. HUTCHINSON, 2001 Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* **11**: 143-153.
- HEDGECOCK, D., D.J. MCGOLDRICK y B.L. BAYNE, 1995 Hybrid vigor in Pacific oysters: an experimental approach using crosses among inbred lines. *Aquaculture* **137**: 285-298.
- HEDGECOCK, D., GAFFNEY, P. GOULLETQUER, X. GUO, K. REECE y G.W. WARR, 2005 The case for sequencing the oyster genome. *J. Shellfish Res.* **24**: 429-442.
- HEDGECOCK, D., J.-Z. LIN, S. DeCOLA, C.D. HAUDENSCHILD, E. MEYER, D.T. MANAHAN y B. BOWEN, 2007 Transcriptomic analysis of growth heterosis in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**: 2313-2318.
- HINE, P.M., S. WAKEFIELD, B.K. DIGGLES, V.L. WEBB y E.W. MASS, 2002 Ultrastructure of a haplosporidian containing Rickettsiae, associated with mortalities among cultured paua *Haliotis iris*. *Dis. Aquat. Org.* **49**: 207-219.
- HOFMANN, G.E., y G.N. SOMERO, 1995 Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel, *Mytilus trossulus*. *J. Exp. Biol.* **198**:1509-18.
- HOOPER, C., R. DAY, R. SLOCOMBE, J. HANDLINGER y K. BENKENDORFF, 2007 Stress and immune responses in abalone: imitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol.* **22**: 363-379.
- HUBERT, F., T. NOËL y P. ROCH, 1996 A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.*, **240**:302-306.
- HUBERT, S., y D. HEDGECOCK, 2004 Linkage maps for microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* **168**: 351-362.



- JACKSON, D.J., C.McDOUGALL, K. GREEN, F. SIMPSON, G.WÖRHEIDE y B.M. DEGNAN, 2006 A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biology* 4:40, doi:10.1186/1741-7007-4-40.
- JENNY, M.J., A.H. RINGWOOD, E.R. LACY, A.J. LEWITUS, J.W. KEMPTON, P.S.GROSS, G.W. WARR y R.W. CHAPMAN, 2002 Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.* **4**: 81-93.
- JENNY, M.J., G.W. WARR, A.H. RINGWOOD, D.A. BALZEGAR y R.W. CHAPMAN, 2006 Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): ontogeny and differential expression in response to different stressors. *Gene*, **379**: 156-165.
- KAMAISHI, T., y T. YOSHINAGA, 2002 Detection of *Haplosporidium nelsoni* in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Japan. *Fish Pathol.* **37**: 193-195.
- KANG, Y.S., Y.M. KIM, K.L. PARK, S.K. CHO, K.S. CHOI y M. CHO, 2006 Analysis of EST and lectin expression in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**: 1119-31.
- KISUGI, J., H. OHYE, H. KAMIYA y M. YAMAZAKI, 1992 Biopolymers from marine invertebrates. XIII. Characterization of an antibacterial protein, dolabellin A, from the albumen gland of the sea hare, *Dolabella auricularia*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**:1537-1539.
- KNAUER, J., y P.C. SOUTHGATE, 1999 A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Rev. Fish. Sci.* **7**: 241-280.
- LELONG, C., F. BADARIOTTI, H. LE QUÉRÉ, F. RODET, M.P. DUBOS y P. FAVREL, 2007 Cg-TGF- β , a TGF- β /activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev. Comp. Immunol.* **31**: 30-38.
- LI, L., y X. GUO, 2004 AFLP-based genetic linkage maps of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Mar. Biotechnol.* **6**: 26-36
- LIU, B.-H., 1997 *Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis*. CRC Pres, Boca Raton.
- LÓPEZ, J.L. 2006 Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J. Chromatogr. B.* (en prensa).
- LÓPEZ, J.L., A. MARINA, G. ALVAREZ y J. VÁZQUEZ, 2002 Application of proteomics for fast identification of species-specific peptides from marine species. *Proteomics* **2**: 1658-1665.
- LÓPEZ, J.L., S.L. ABALDE y J. FUENTES, 2005 Proteomic approach to probe for larval proteins of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biotechnol.* **7**: 396-404.



- LORENZO-ABALDE, S., A. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, E. DE MIGUEL-VILLEGAS y J. FUENTES, 2005 Two monoclonal antibodies for the recognition of *Mytilus* spp.larvae: studies on cultured larvae and tests on plankton samples. *Aquaculture* **250**: 736-7
- MALHAM, S.K., N. W. RUNHAM y C.J. SECOMBES, 1998 Lysozyme and antiprotease activity in the lesser octopus *Eledone cirrhosa* (Lam.) (Cephalopoda). *Dev. Comp. Immunol.* **22**: 27-37.
- MCGINNIS, S., y T.L. MADDEN, 2004 BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **32**: W20-W25. DOI: 10.1093/nar/gkh435.
- MEDZHITOV, R., y C. JANEWAY, 2000 Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* **173**: 89-97.
- MITTA, G., F. HUBERT y P. ROCH, 1999a Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* **265**: 71-78.
- MITTA, G., F. VANDENBULCKE, F. HUBERT y P. ROCH, 1999b Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* **112**: 4233-4242.
- MITTA, G., F. HUBERT, A. ELISABETH, DRYNDA, P. BOUDRY y P. ROCH, 2000a Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* **24**: 381-393.
- MITTA, G., F. VANDENBULCHES, F. HUBERT, M. SALZET y P. ROCH, 2000b Involvement of Mytilins in Mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* **275**: 12954-12962.
- MITTA, G., F. VANDERBULCKE y P. ROCH, 2000c Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. Minireview. *FEBS Letters* **486**: 185-190.
- MONTAGNANI, C., F. LE ROUX, F. BERTHE y J.M. ESCOUBAS, 2001 Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Letters* **500**: 64-70.
- MONTAGNANI, C., J.C. AVARRE, J. DE LORGERIL, M. QUIQUAND, V. BOULO y J.M. ESCOUBAS, 2007 First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of pacific oyster, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev. Comp. Immunol.* **31**: 1-11.
- NG, S.H., C.G. ARTIERI, I.E. BOSDET, R. CHIU, *et al.*, 2005 A physical map of the genome of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Genomics* **86**: 396-404.
- NOVOA, B., y A. FIGUERAS, 2000 Virus-like particles associated with mortalities of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*. *Dis. Aquat. Org.* **39**: 147-149.



- NOVOA, B., C. TAFALLA, A. GUERRA y A. FIGUERAS, 2002 Cellular immunological parameters of the octopus, *Octopus vulgaris*. J. Shellfish Res. **21**: 243-248.
- NOVOA, B., D. POSADA y A. FIGUERAS, 2005 Polymorphisms in the sequences of Marteilia internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. J. Fish Dis. **28**: 331-338.
- ORDÁS, M.C., B. NOVOA y A. FIGUERAS, 1999 Phagocytosis inhibition of clam and mussel haemocytes by *Perkinsus atlanticus* secretion products. Fish Shellfish Immunol. **9**: 491-503.
- ORDÁS, M.C., A. ORDÁS, C. BELOSO y A. FIGUERAS, 2000 Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. Fish Shellfish Immunol. **10**: 597-609.
- ORDÁS, M.C., B. NOVOA, M. FAISAL, S. McLAUGHLIN y A. FIGUERAS, 2001 Proteolytic activity of cultured *Pseudoperkinsus tapetis* extracellular products. Comp. Biochem. Physiol. Part B. **130**: 199-206.
- OTTAVIANI, E., L.R. PAEMEN, P. CADET y G.B. STEFANO, 1993. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bactericidal agent by invertebrate immunocytes. Eur. J. Pharmacol. **248**: 319- 324.
- PAILLARD, C., 2004 A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Aquat. Living Resour. **17**: 467-475.
- PAILLARD, C., F. LE ROUX y J. BORREGO, 2004 Bacterial diseases in marine bivalves, a review of recent studies: trend and evolution. Aquat. Living Resour. **17**: 477-498.
- PALLAVICINI A, M.M. COSTA, C. GESTAL, R. DREOS, B. NOVOA, P. VENIER y A. FIGUERAS, 2007 High sequence variability of myticin transcripts in haemocytes of immune-stimulated mussels supports adaptive host-pathogen interactions. Dev. Comp. Immunol. (en prensa).
- PASCHALL, J.E., M.F. OLEKSIK, J.D. VANWYE, J.L. ROACH, J.A. WHITEHEAD, G.J. WYCKOFF, K.J. KOLELL y D.L. CRAWFORD, 2004 FunnyBase: a systems level functional annotation of *Fundulus* ESTs for the analysis of gene expression BMC Genomics **5**: 96.
- PICHOT, Y., M. COMPS, G. TIGÉ, H. GRIZEL y M.A. RABOUIN, 1980 Recherche sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. Rev. Trav. Inst. Pêch Marit. **43**: 131-140.
- PIPE, R.K. 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem. J. **22**: 595-603.



- POUSTKA, A.J., D. GROTH, S. HENNIG, S. THAMM, A. CAMERON, A. BECK, R. REINHARDT, R. HERWIG, G. PANOPOULOU y H. LEHRACH, 2003 Generation, annotation, evolutionary analysis, and database integration of 20,000 unique sea urchin EST clusters. *Genome Res.* **13**: 2736–2746.
- PRUDENCE, M., J. MOAL, P. BOUDRY, J. Y. DANIEL, C. QUÉRÉ, F. JEFFROY, C. MINGANT, M. ROBERT, E. BÉDIER, A. VAN WORMHOUDT, J. F. SAMAIN y A. HUVET, 2006 An Amylase gene polymorphism is associated with growth differences in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*. *Anim. Genet.* **37**: 348–351.
- QIU, L., L. SONG, W. XU, D. NI y Y. YU, 2007 Molecular cloning and expression of a Tool receptor gene homologue from Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* **22**: 451–466.
- RENAULT, T., y B. NOVOA, 2004 Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat. Living Resour.* **17**: 397–409.
- RISE, M.L., K. R. SCHALBURG, G. D. BROWN, M. A. MAWER, *et al.*, 2004 Development and application of a salmonid EST database and sDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics. *Genome Res.* **14**: 478–490.
- ROBERT, R., M. BOREL, Y. PICHOT y G. TRUT, 1991 Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquat. Living Resour.* **4**: 265–274.
- ROBLEDO, J.A., y A. FIGUERAS, 1995 The effects of culture-site, depth, season, and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* LMK.) from Galicia, Spain. *J. Parasitol.* **81**: 354–363.
- RODRÍGUEZ-ORTEGA, M., B. E. GRØSVIK, A. RODRÍGUEZ-ARIZA, A. GOSKØYR y LÓPEZ-BAREA, J., 2003 Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics* **3**: 1535–1543.
- SAAVEDRA, C., y E. BACHÈRE, 2006 Bivalve Genomics. *Aquaculture* **256**: 1–14.
- SEKINO, M., y M. HARA, 2007 Linkage maps for the Pacific abalone (Genus *Haliotis*) based on microsatellite DNA markers. *Genetics* **175**: 945–958.
- SEO J.K., J.M. CRAWFORD, K.L. STONE y E.J. NOGA, 2005 Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**: 1998–2004.
- SHIZUYA, H., B. BIRREN, U.J. KIM, V. MANCINO, T. SLEPAK, Y. TACHIIRI y M. SIMON, 1992 Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 8794–8797.



- SINGH, R., y E. ZOUIROS, 1978 Genetic variation associated with growth rate in the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution* **32**: 342-353.
- SONG, L., L. WU, D. NI, Y. CHANG, W. XU, y K. XING, 2006 The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish Shellfish Immunol.* **21**: 335-45.
- STEPHENSON, M.F., S.E. MCGLADDERY, M. MAILLET, A. VENIOT y G. MEYER, 2003 First reported occurrence of MSX in Canada. *J. Shellfish Res.* **22**: 355.
- SUNILA, I., J. KAROLUS y J. VOLK, 1999 A new epizootic of *Haplosporidium Nelsoni* (MSX), a haplosporidian oyster parasite on Long Island Sound, Connecticut. *J. Shellfish Res.* **18**: 169-174.
- TAFALLA, C., B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2002 Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* **132**: 423-431.
- TAFALLA, C., J. GÓMEZ-LEÓN, B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2003 Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 197-205.
- TANGUY, A., X. GUO y S.E. FORD, 2004 Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* **338**: 121-131.
- TIRARD C.T, R.M. GROSSFELD, J.F. LEVINE y S. KENNEDY-STOSKOPF, 1995 Effect of hyperthermia *in vitro* on stress protein synthesis and accumulation in oyster haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **5**: 9-25.
- VENIER, P., C. DE PITTÀ, A. PALLAVICINI, F. MARSANO, L. VAROTTO, C. ROMUALDI, F. DONDERO, A. VIARENGO, y G. LANFRANCHI, 2006. Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutat. Res.* **602**: 121-134.
- VENTER, J.C., K. REMINGTON, J.K. HEIDELBERG, A.L. HALPERN, *et al.*, 2004 Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.
- VILLALBA, A., S.G. MOURELLE, M.J. CARBALLAL y M.C. LÓPEZ, 1993a Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.* **17**: 205-213.
- VILLALBA, A., S.G. MOURELLE, M.C. LÓPEZ, M.J. CARBALLAL y C. AZEVEDO, 1993b Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I. Etiology, phases of the infection and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.* **16**: 61-72.
- VILLALBA, A., K.S. REECE, M.C. ORDÁS, S. M. CASAS y A. FIGUERAS, 2004 Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.* **17**: 411-432.



- VIRVILIS, C., P. ANGELIDIS y G. PHOTIS, 2003 Presence of the parasite *Marteilia* sp. in the shellfish of the Thermaikos gulf in northern Greece. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. **23**: 157-161.
- WALNE, P.R., 1974 *Culture of Bivalve Molluscs: 50 Years' Experience at Conway*. Fishing News Books, Oxford.
- WU L, L. SONG, W. XU, H. LI, X. GUO y J. XIANG, 2003 Identification and cloning of heat shock protein 70 gene from scallop, *Chlamys farreri*. Gaojishu Tongxun. **13**:75-9.
- YANG, Y. S., G. MITTA, A. CHAVANIEU, B. CALAS, J.F. SANCHEZ, P. ROCH y A. AUMELAS, 2000 Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1). Biochemistry **39**: 14436-14447.
- YANG, Y.H., y T. SPEED, 2002 Design issues for cDNA microarray experiments. Nat. Rev. Genet. **3**: 579-588.
- YU, Z, y X. GUO, 2006 Identification and mapping of disease-resistance QTLs in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. Aquaculture **254**: 160-170
- ZOUROS, E., S.M. SINGH, D.W. FOLTZ y A. MALLET, 1983 Post-settlement viability in the American oyster (*Crassostrea virginica*): an overdominant phenotype. Genet. Res. **41**: 259-270.

13

APLICACIÓN DE LA GENÓMICA FUNCIONAL Y PROTEÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LOS GAMETOS DE TELEÓSTEOS

APLICACIÓN DE LA GENÓMICA FUNCIONAL Y PROTEÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LOS GAMETOS DE TELEÓSTEOS

J. Cerdà

Laboratorio IRTA-Instituto de Ciencias del Mar de Barcelona, CSIC

T. Maes

Oryzon Genomics, Barcelona

J. Bobe

INRA, Rennes, Francia

P. J. Babin

Génomique et Physiologie des Poissons,
Universidad de Burdeos, Francia

A. Admon

Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

E. Lubzens

Israel Oceanographic and Limnological Research,
National Institute of Oceanography, Haifa, Israel

Resumen

La producción industrial de alevines en acuicultura requiere un conocimiento profundo de los procesos biológicos que controlan la



gametogénesis, los cuales en última instancia determinarán la calidad de los gametos. Las tecnologías de genómica funcional y proteómica, recientemente desarrolladas, han aumentado el alcance de la investigación biológica desde el estudio de genes y proteínas individuales al estudio del modelo de expresión de todos los genes y proteínas simultáneamente de una forma sistemática. La aplicación de estos métodos en acuicultura todavía es muy reciente, especialmente en la investigación de la reproducción de teleósteos. No obstante, es muy posible que en los próximos años estas metodologías tengan un gran impacto por el potencial que poseen para descubrir el complejo control genético de la formación de gametos. En este capítulo, se analizan estudios recientes que han empleado estrategias genómicas y proteómicas para investigar el modelo global de expresión génica y de proteínas durante la gametogénesis de teleósteos. Los resultados de estos primeros trabajos ya han identificado un gran número de genes, moléculas de origen materno y proteínas que parecen ser esenciales durante la oogénesis, espermatogénesis y el desarrollo embrionario inicial de teleósteos. Estos hallazgos están contribuyendo de forma muy importante al conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en la formación de los huevos y espermatozoides en peces. Sin embargo, la explotación de todo el potencial de la genómica para descubrir la base molecular de la gametogénesis de teleósteos está a punto de ser una realidad con la secuenciación del genoma y transcriptoma de especies de interés comercial y el desarrollo de métodos para identificar la función de los genes.

Abstract

The sustained mass production of alevins in finfish aquaculture requires a deep understanding of the biological processes controlling gametogenesis which ultimately will determine the quality of eggs and sperm. Functional genomics and proteomics technologies have been recently developed expanding the scope of biological investigation from studying single genes or proteins to studying potentially all genes and proteins at once, in a systematic manner. The application of these methods in aquaculture is still in its infancy, especially with regard to the study of fish reproduction, but in



the near future its impact is envisaged because of the potential to uncover the complex genetic control of gamete formation in finfish. Here, we review recent studies employing high-throughput genomic and proteomic approaches that have been carried out to investigate the global pattern of gene and protein expression during finfish gametogenesis. The results of these initial works have already identified a number of novel genes, maternal molecules and proteins that are essential during fish spermatogenesis, oogenesis and early embryogenesis, thus greatly contributing to our current knowledge of the molecular mechanisms underlying egg and sperm formation. However, the full potential of genomics to uncover the molecular basis of finfish gametogenesis is about to be unleashed with the sequencing of the genome and transcriptome of additional species and the development of methods to elucidate gene function.

1. INTRODUCCIÓN

La investigación sobre fisiología de la reproducción de teleósteos de interés en acuicultura tradicionalmente se ha dirigido al mejoramiento de dos aspectos: el control de la puesta y el cultivo y nutrición larvaria. A medida que se incorporan nuevas especies para su producción industrial, se siguen encontrando problemas en ambas áreas, y por tanto, se requieren laboriosos experimentos empíricos para optimizar los distintos procedimientos. Para el control de la puesta, por ejemplo, la temperatura y el fotoperíodo se manipulan para imitar las condiciones bajo las cuales se produce la reproducción en el medio natural (e.g., BROMAGE *et al.* 2001). Si la puesta espontánea no se produce, se administran diferentes tratamientos hormonales y/o se ensayan dietas apropiadas que puedan contribuir a la obtención de puestas fiables.

Una vez se ha conseguido la reproducción, el éxito de los métodos empleados se cuantifica determinando la «calidad» de los huevos y el esperma. El concepto «calidad de gametos» se refiere a una mezcla de distintas determinaciones cuantitativas que incluye la capacidad de fertilización del esperma y la competencia de los huevos para ser fertilizados, características morfológicas, contenido bioquímico, propie-



dades biofísicas, tasas de eclosión y la viabilidad del desarrollo larvario hasta la alimentación exógena (KJØRSVIK *et al.* 1990; BROMAGE *et al.* 1994). No obstante, la base fisiológica relacionada con la alta o baja calidad de los gametos es difusa y permanece muy desconocida. Ello es desafortunado ya que la variabilidad en la calidad (viabilidad) de los gametos es un factor que sigue limitando la producción en masa de larvas y alevines en acuicultura.

Para optimizar los métodos actuales de control de la reproducción de peces en acuicultura, así como para desarrollar nuevas tecnologías, es necesario entender los mecanismos biológicos y bioquímicos básicos que están relacionados con la producción de gametos viables. Esto es especialmente importante en especies marinas, sobre las cuales nuestro conocimiento es todavía escaso. Por este motivo, la regulación endocrina de la producción de gametos ha recibido una considerable atención, y ello ha proporcionado guías muy útiles para la inducción artificial de la reproducción en cautividad (ZOHAR y MYLONAS 2001). Sin embargo, a pesar de que la reproducción se puede obtener ahora en bastantes especies, a menudo la calidad de los gametos no es la deseada, especialmente en peces marinos. Este hecho ha llevado a enfatizar en los últimos años el desarrollo de protocolos para la administración hormonal en el momento óptimo, para que, por ejemplo, oocitos «inmaduros» no sean ovulados prematuramente o se pueda obtener esperma con suficiente capacidad de fertilización. No obstante, los procesos moleculares e intracelulares que ocurren en las células germinales durante la oogenesis y espermatogénesis están todavía lejos de ser bien entendidos, y ello continúa siendo un importante obstáculo.

En los últimos años se ha llevado a cabo la secuenciación del genoma de pequeños peces de laboratorio, como el pez cebra (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*), peces globo (*Takifugu rubripes* y *Tetraodon nigroviridis*) y espinoso (*Gasterosteus aculeatus*), los cuales se emplean principalmente para estudios de biología del desarrollo, toxicología, comportamiento y biología evolutiva. Más recientemente, estas tecnologías se están empleando para la secuenciación parcial del genoma y transcriptoma, i.e., el repertorio de ARN mensajeros (ARNm) en un tejido, de peces cultivados. Este trabajo está posibilitando el desarrollo



de métodos muy potentes para el análisis global de los genes y proteínas que se expresan en un tejido determinado, conocidos como genómica funcional y proteómica, respectivamente. La aplicación de estos métodos en especies de interés comercial facilitará la identificación de genes y proteínas clave implicados en la formación de los gametos, y contribuirá a definir los efectos biológicos de factores ambientales y genéticos. En este capítulo, se describe someramente nuestro conocimiento actual sobre los mecanismos moleculares implicados en la oogenesis y espermatogénesis de teleósteos. Seguidamente, se analizan una serie de estudios genómicos y proteómicos llevados a cabo en los últimos años para investigar los mecanismos fisiológicos que controlan la formación y la calidad del huevo y el espermatozoides en peces.

2. CONTROL MOLECULAR DE LA REPRODUCCIÓN Y FORMACIÓN DE GAMETOS EN TELEÓSTEOS

2.1. Formación del huevo

Los oocitos de teleósteos, una vez diferenciados a partir de las oogonias, pasan por una serie de estadios diferentes que culminan en la producción del gameto femenino maduro o huevo. Estos procesos están regulados por la interacción entre distintos factores tanto endocrinos como intraováricos (Figura 1).

Durante el periodo inicial de crecimiento, los oocitos se encuentran detenidos en la profase I de la primera división meiótica, y la energía se concentra en la síntesis y captación de varias sustancias que son esenciales para la supervivencia del oocito, así como para el embrión una vez haya ocurrido la fertilización. Las más importantes de estas sustancias son los precursores del vitelo, vitelogeninas (Vgs), los cuales son sintetizados en el hígado e incorporados al oocito desde la circulación sanguínea por medio de endocitosis mediada por receptor (WALLACE, 1985). En el oocito las Vgs son procesadas en moléculas más pequeñas (lipovitelininas, fosvitinas y componente β) las cuales son almacenadas en glóbulos de vitelo (WALLACE 1985; SELMAN y WALLACE 1989; TYLER y SUMPTER 1996). La hormona folículo estimulante (FSH) regula este proceso actuando sobre las células foliculares que rodean

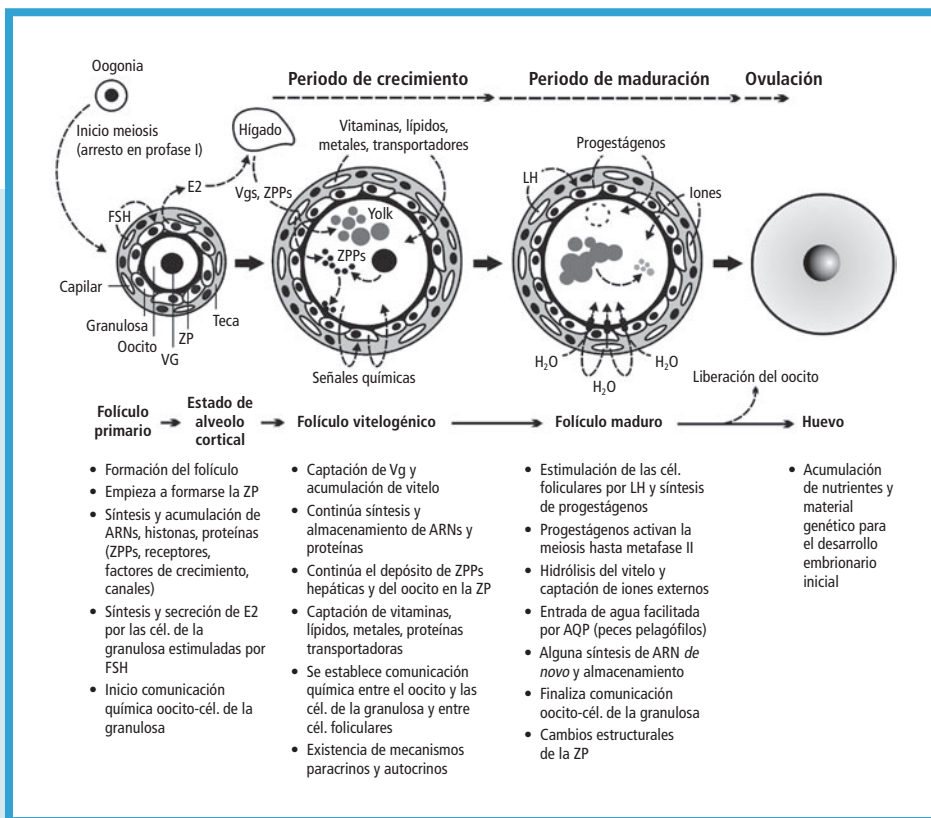


FIGURA 1.

Diagrama esquemático de los principales mecanismos moleculares implicados durante el crecimiento y maduración del oocito de teleósteos. AQP, acuaporina; E2, 17 β -estradiol; FSH, hormona estimuladora de folículos; LH, hormona luteinizante; Vgs, vitelogeninas; ZP, zona pelúcida; ZPPs, proteínas de la zona pelúcida.

al oocito, células de la teca y de la granulosa, estimulando la producción de 17 β -estradiol (E2), el cual a su vez activa la producción de Vgs y de algunas proteínas de la zona pelúcida (ver más adelante) en el hígado (NAGAHAMA *et al.* 1995; TYLER y SUMPTER 1996; POLZONETTI-MAGNI *et al.* 2004). Una vez finalizada la vitelogénesis, una segunda estimulación hormonal permite a los oocitos continuar la meiosis hasta la metafase II, donde la meiosis se detiene otra vez. Este proceso, el cual se denomina «maduración meiótica» o simplemente «maduración»,



está regulado por la hormona luteinizante (LH). Esta hormona actúa sobre las células de la granulosa para que produzcan progestágenos, los cuales activarán la meiosis del oocito (NAGAHAMA *et al.* 1995; YAMASHITA 1998; THOMAS *et al.* 2002). La ovulación, es decir, la liberación del oocito de las células foliculares que lo envuelven, tiene lugar cuando finaliza la maduración, y como resultado el oocito adquiere la capacidad de ser fertilizado, i.e., se convierte en huevo.

En peces marinos que producen huevos pelágicos (pelagófilos) el oocito sufre un aumento de tamaño considerable durante la maduración debido a la entrada masiva de agua (ver FABRA *et al.* 2006 y referencias citadas). La entrada de agua es provocada por el incremento de la presión osmótica en el oocito como resultado de la acumulación de iones inorgánicos y la hidrólisis de las proteínas del vitelo, lo que aumenta la concentración de aminoácidos libres y pequeños péptidos, y es facilitada por canales moleculares de agua o acuaporinas (FABRA *et al.* 2005, 2006). La hidratación del oocito contribuye a la flotabilidad positiva de los huevos en agua de mar, necesaria para su supervivencia y dispersión en el océano. Así, los huevos flotantes muestran un desarrollo mejor y tasas de supervivencia más altas que los huevos no flotantes, y de acuerdo con esto, la flotabilidad de los huevos se emplea como un marcador de buena calidad en criaderos de peces marinos (KJØRSVIK *et al.* 1990; CARNEVALI *et al.* 2001). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la proteólisis del vitelo y en la regulación de la función de las acuaporinas durante la maduración del oocito, incluyendo aquellos procesos más susceptibles a perturbaciones dietarias, fisiológicas o ambientales, son completamente desconocidos.

Debido a que la vitelogénesis es la principal causante del crecimiento del oocito, puede pensarse que este proceso es el que mayormente afecta a la calidad del huevo. Sin embargo, los embriones de peces parecen utilizar muy poco vitelo antes de la eclosión (e.g., OHKUBO y MATSUBARA 2002). Por tanto, aunque los procesos vitelogénicos pueden ser muy importantes para el desarrollo larvario normal antes de la alimentación exógena (cuando se emplean las reservas de vitelo), estos no parece que afecten la fertilización o la eclosión, que son parámetros que normalmente se emplean para evaluar la calidad de



los huevos. De hecho, además del vitelo existen otras moléculas en el oocito, acumuladas a partir de fuentes externas, como lípidos (algunos de estos formando complejos con las Vgs), vitaminas, metales y hormonas (hormonas tiroideas, cortisol, esteroides sexuales), que, aunque en concentraciones mucho más bajas que las proteínas del vitelo, son igualmente necesarias para la producción de embriones y larvas viables (BROOKS *et al.* 1997). En general, no obstante, las vías bioquímicas implicadas en la acumulación de estos compuestos, así como su contribución al desarrollo embrionario, todavía no están resueltas.

Durante el crecimiento del folículo ovárico (i.e., el oocito más las células foliculares), el oocito se va recubriendo de una envoltura acelular llamada zona pelúcida (ZP), compuesta de proteínas (ZPPs) producidas por el hígado y el mismo oocito (HYLLNER *et al.* 2001; MODIG *et al.* 2006). La ZP juega un papel importante durante la fertilización del huevo y el desarrollo embrionario; cuando esta se endurece después de la fertilización protege al embrión de daños mecánicos, una posible desecación y cambios químicos rápidos en el ambiente, y además ejerce una actividad bactericida y fungicida (YAMAGAMI *et al.* 1992).

Otras importantes moléculas acumuladas por el oocito de peces durante la oogenesis son los ARNm maternos. Tanto en vertebrados como en invertebrados, la localización de ARNm maternos en el oocito supone un mecanismo para influenciar el desarrollo embrionario posterior, incluyendo el establecimiento del eje dorsal/ventral y anterior/posterior y la línea germinal (PELEGRI 2003). Datos obtenidos a partir de la caracterización de mutantes genéticos de pez cebra indican que los factores maternos tienen importantes funciones durante los estadios más tempranos del desarrollo, antes de la activación del genoma del cigoto en la transición de midblastula, así como en estadios posteriores (PELEGRI y MULLINS 2004). En especies marinas cultivadas no se han llevado a cabo todavía estudios similares y por tanto no se conoce con detalle la importancia fisiológica de los ARNm maternos en estas especies.

2.2. Formación del esperma

El esperma se forma a partir de las células germinales a través de la espermatogénesis, cuya parte final es la espermiogénesis. La espermatogénesis implica la proliferación inicial de espermatogonias a través



de divisiones mitóticas, y puede dividirse en dos fases: la renovación de espermatogonias y la proliferación de espermatogonias hacia la meiosis (Figura 2). En la anguila, la primera fase se encuentra regulada por un factor de crecimiento («spermatogonial renewal factor», SRF) producido por las células de Sertoli en respuesta a estrógenos (MIURA y MIURA 2003). Durante la segunda fase, las espermatogonias sufren mitosis para formar espermatogonias tipo B y espermatocitos primarios, los cuales iniciarán la meiosis para formar espermatocitos secundarios, espermatidas, y después de la metamorfosis, espermatozoides. En teleósteos con testículos de tipo lobular, esta fase acompaña la formación de los lóbulos seminíferos rodeados por las células de Sertoli. A medida que avanza la espermatogénesis, los lóbulos crecen de tamaño para romperse más tarde y liberar los espermatozoides (o espermatidas en algunas especies) al interior del lumen de los lóbulos. Después de un periodo de tiempo variable en el interior del lumen necesario para la maduración de los espermatozoides, estos son liberados al conducto espermiente (espermiación).

En teleósteos la espermatogénesis está controlada principalmente por la FSH y la LH, y por el andrógeno 11-ketotestosterona (11-KT), producido por las células de Leydig en respuesta a la FSH (Figura 2). La 11-KT activa a las células de Sertoli para que produzcan factores de crecimiento, factor de crecimiento insulina I (IGF-I) y activina B, los cuales estimulan la síntesis de ADN y la mitosis de las espermatogonias (SCHULZ *et al.* 2001; MIURA y MIURA 2003). En la anguila, el inicio de la espermatogénesis también parece requerir la inhibición de una sustancia que previene la espermatogénesis (MIURA y MIURA 2003). Los mecanismos que regulan la entrada en meiosis de los espermatocitos no se conocen bien, aunque recientemente se ha sugerido el papel de algunos progestágenos (MIURA *et al.* 2006). Estos esteroides, no obstante, si que intervienen durante la fase de espermiación, durante la cual se produce el líquido seminal necesario para que el espermatozoides adquiera la motilidad y para que los espermatozoides circulen por el conducto espermiente (NAGAHAMA 1994; MIURA y MIURA 2003; VERMEIR-SEN *et al.* 2004). El efecto de los progestágenos sobre la motilidad del espermatozoides parece que es mediado por un incremento del pH del conducto espermiente, lo que hace aumentar la concentración intra-

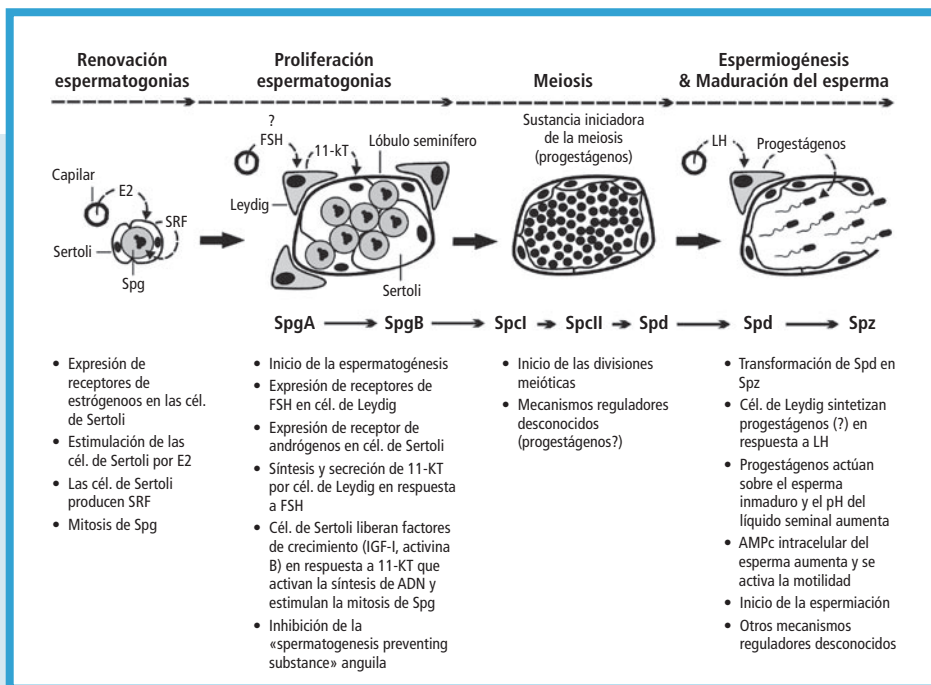


FIGURA 2.

Diagrama esquemático de los principales mecanismos moleculares implicados durante la espermatogénesis de teleósteos. E2, 17 β -estradiol; FSH, hormona estimuladora de folículos; IGF-I, factor de crecimiento insulina I; aa-KT, aa-ketotestosterona; LH, hormona luteinizante; Spg espermatogonia; SgA, espermatogonia tipo A; SgB, espermatogonia tipo B; SpcI, espermatocono tipo I; SpcII, espermatocono tipo II; Spd, espermatocono; Spz, espermatozoide; SRF, factor renovador de espermatogonias («spermatogonia renewal factor»).

celular de AMPc en el esperma (MIURA *et al.* 1992; NAGAHAMA 1994), y/o por la hidratación del líquido seminal (VERMEIRSEN *et al.* 2004). Sin embargo, los espermatozoides no son móviles hasta que se liberan al medio acuoso externo (especies ovíparas) o al conducto genital femenino (especies vivíparas y ovovivíparas) (BILLARD y COSSON 1990). La concentración iónica, osmolaridad y pH del medio acuoso es crucial para la adquisición de la motilidad, aunque otros factores, como el pH y la concentración intracelular de ATP, Ca²⁺ y AMPc en los esper-



matosoides, también afectan la motilidad (COWARD *et al.* 2002; ALAVI y COSSON 2005, 2006).

En acuicultura la motilidad de los espermatozoides y su capacidad de fertilización, y en menor grado la concentración de espermatozoides, son los parámetros que se emplean para valorar la calidad del espermato (COWARD *et al.* 2002). La motilidad o velocidad de los espermatozoides es el aspecto más comúnmente empleado (ALAVI y COSSON 2005). La capacidad de fertilización del espermato puede ser más concluyente que la motilidad, pero los datos de este parámetro pueden estar sesgados por variaciones en la calidad de los huevos que se utilizan. El porcentaje de fertilización es otro parámetro que se emplea a menudo y se refiere al porcentaje de huevos fertilizados que eclosionan o que se desarrollan hasta un estado larvario determinado (COWARD *et al.* 2002).

2.3. Influencia de las condiciones ambientales sobre la calidad de los gametos

El fotoperiodo y la temperatura bajo los cuales se mantienen los reproductores y la calidad del manejo, como los niveles de estrés y los procedimientos para inducir la reproducción y la fertilización, afectan la viabilidad de los huevos (BROOKS *et al.* 1997; FORNIÉS *et al.* 2001; BROWN *et al.* 2006; BONNET *et al.* 2007). No obstante, el efecto de la ingesta y la composición de la dieta sobre la calidad de los huevos son los factores que han sido más estudiados (IZQUIERDO *et al.* 2001; WATANABE y VASSALLO-AGIUS 2003). Estos estudios indican que la fracción lipídica polar y no polar de la dieta, así como su composición en ácidos grasos, afecta la síntesis de esteroides y la maduración gonadal, la fecundidad y la calidad del huevo. La presencia de vitaminas en la dieta, como vitamina E y C, aumenta la fecundidad y reduce el porcentaje de huevos anormales en algunas especies (IZQUIERDO *et al.* 2001). Sin embargo, aunque se ha demostrado en mamíferos que los retinoides juegan un papel importante en la maduración del oocito y el desarrollo embrionario (CLAGETT-DAME y DELUCA 2002; BROWN *et al.* 2003; IKEDA *et al.*, 2005), y que en el pez cebra estos compuestos son importantes durante la embriogénesis (LAMPERT *et al.* 2003; ISKEN *et al.* 2006), no existe información precisa sobre el papel de los retinoides



durante el desarrollo y maduración de los oocitos de peces. El contenido de la dieta en carotenoides parece que también afecta el desarrollo embrionario de peces, pero la relación entre el contenido del huevo en carotenoides y la calidad de este es todavía motivo de controversia (ver TORRISSEN y CHRISTIANSEN 1995).

En salmónidos y algunos peces planos la variabilidad en la calidad del huevo se debe también a los efectos postovulatorios que se producen cuando los oocitos ovulados se encuentran en la cavidad celómica, inmersos en el fluido ovárico, esperando a ser liberados por señales ambientales (BROMAGE *et al.* 1994; AEGERTER y JALABERT 2004). Bajo condiciones de cultivo, estos estímulos a menudo no se producen, y por tanto, los huevos permanecen en la cavidad celómica hasta que son extraídos manualmente. Si los huevos no son extraídos de la cavidad, estos degeneran y son progresivamente reabsorbidos. Durante este periodo postovulatorio o de «superovulación», el cual puede durar desde varios días hasta unas pocas semanas, ocurren una serie de modificaciones en el huevo que afectan su viabilidad (ESCAFFRE *et al.* 1976; KJÖRSVIK *et al.* 1990), tamaño (SAKAI *et al.* 1975) y composición bioquímica (CRAIK y HARVEY 1984; LAHNSTEINER 2000; LAHNSTEINER *et al.* 1999, 2001).

En relación a la calidad del esperma, muchos estudios indican que el fotoperiodo, la temperatura y las condiciones de confinamiento de los reproductores pueden afectar la cantidad total de esperma producido y/o la motilidad de los espermatozoides (COWARD *et al.* 2002). La composición de la dieta, particularmente los niveles de lípidos, influyen en la composición en ácidos grasos del esperma, lo cual puede determinar su viabilidad y la activación de los huevos, e incluso afectar el desarrollo embrionario y la supervivencia larvaria (BELL *et al.* 1996; ASTURIANO *et al.* 2001). La suplementación de la dieta con vitamina C mantiene la motilidad y fertilizabilidad del esperma, lo que puede ser debido a la protección que confiere este compuesto a la oxidación del ADN de los espermatozoides manteniendo de este modo su integridad genética (COWARD *et al.* 2002). Algunas hormonas esteroideas y otros componentes bioquímicos del esperma y líquido seminal, como la actividad aspartato aminotransferasa, también pueden afectar la producción de esperma y la fertilidad (COWARD *et al.* 2002).



3. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DURANTE LA GAMETOGÉNESIS

La investigación que se ha llevado a cabo hasta la fecha indica de forma consistente que las condiciones ambientales y de manejo pueden influenciar la calidad de huevos y esperma. Sin embargo, los mecanismos moleculares e intracelulares implicados en estos procesos son muy desconocidos. Además, la posible influencia del genotipo de los reproductores sobre la viabilidad y supervivencia de los gametos no ha sido todavía determinada en peces.

La descripción de los procesos biológicos a nivel genético subyacentes a la función de los gametos de peces, al igual que en cualquier otro organismo, se sustenta en el conocimiento de los genes implicados y en los mecanismos existentes para la regulación de su expresión. La genómica funcional permite el análisis de la expresión génica (transcriptoma) de una forma global, lo cual es posiblemente más relevante que al análisis convencional de genes individuales, ya que permite descubrir nuevas conexiones biológicas entre genes y vías metabólicas. Este conocimiento es esencial ya que la mayoría de factores que afectan la viabilidad de los gametos lo hacen influenciando directa o indirectamente la expresión de los genes y la traducción de ARNs en el gameto. Esto es especialmente importante en los oocitos, en los cuales los mecanismos para la regulación de la transcripción de ARNm y traducción influyen la diferenciación del oocito y sustentan el desarrollo del embrión hasta que se activa el genoma del cigoto (PELEGRI 2003). Una expresión inapropiada de estos ARNm, o en un momento incorrecto, conduce a problemas durante la embriogénesis, y por tanto, a la producción de huevos de mala calidad. Si bien la caracterización del transcriptoma de las gónadas de peces sólo se ha iniciado recientemente, en esta sección se resumirán los estudios llevados a cabo hasta la fecha, así como los métodos empleados, para investigar la regulación transcripcional durante la oogenesis y espermatogénesis en teleósteos.

3.1. Chips de ADN

La caracterización de la porción expresada del genoma de peces mediante la secuenciación masiva parcial de ADNc clonados (ADN



copiado a partir de ARNm), llamados también «expressed sequence tags» (ESTs), a partir de genotecas normalizadas o substraídas permite un primer análisis del transcriptoma de las gónadas (e.g., ZENG y GONG 2002). El aislamiento de ESTs también permite la construcción de plataformas para el análisis a gran escala de la expresión génica utilizando micromatrices de ADN («microarrays»). Los chips de ADN generalmente poseen miles de sondas de ácidos nucleicos (ADNc o oligonucleótidos) adheridas a una superficie inerte permitiendo el análisis de la expresión de miles de genes simultáneamente en un tejido mediante la evaluación de los niveles de ARNm. Por tanto, este sistema permite el análisis simultáneo de diferentes procesos biológicos en la misma muestra. Los chips de ADN se emplean también para descubrir nuevos genes, el genotipado de polimorfismos genéticos y el estudio de hibridación interespecífica (SMITH y GREENFIELD 2003; LEUNG y CAVALIERI 2003).

Los chips de ADN se están empleando para la identificación de genes importantes durante el desarrollo de los folículos ováricos y la esteroidogénesis testicular en ganado porcino (YAO *et al.* 2004; CAETANO *et al.* 2004; STEWART *et al.* 2005; AGCA *et al.* 2006). Este sistema también es efectivo para detectar ARNm maternos almacenados durante la maduración del oocito necesarios para el desarrollo embrionario hasta la activación zigótica (MOUROT *et al.* 2006), genes específicos del oocito (VALLEE *et al.* 2005), y genes clave implicados en la embriogénesis temprana (WHITWORTH *et al.* 2005). El análisis del transcriptoma de folículos ováricos de líneas seleccionadas de porcino con diferentes índices de ovulación y supervivencia de los embriones mediante micromatrices ha demostrado cambios en la expresión génica en los folículos como resultado de la selección a largo plazo (GLADNEY *et al.* 2004). Algunos de los genes identificados se han mapeado en regiones del genoma que contienen QTLs («quantitative trait loci») que afectan la tasa de ovulación en porcino (CAETANO *et al.* 2005), lo que muestra la aplicación de la genómica funcional para la disección de la base genética de caracteres complejos de interés productivo.

En la trucha (*Oncorhynchus mykiss*), mediante la construcción y secuenciación de genotecas específicas de ovario y posterior análisis mediante un chip de ADN, se han identificado una colección de



genes potencialmente importantes durante el desarrollo ovárico (VON SCHALBURG *et al.* 2005). Aproximadamente 5.800 ARNm específicos de tejido y sexo han sido aislados a partir de genotecas substraídas de ovario y testículo, la mayoría de los cuales permanecen todavía sin identificar. En este estudio, se empleó un chip con 3.557 ADNc de salmónidos (RISE *et al.* 2004) para comparar el transcriptoma de ovarios precoces (de hembras de un año de edad) en tres estadios de desarrollo distintos. Los resultados indican que unos 240 ARNm se regulan de forma distinta durante el periodo estudiado, mientras que el resto mantienen una expresión constante. Entre estos últimos están ARNm relacionados con el control de la remodelación de tejidos, inmunoregulación, progresión del ciclo celular, apoptosis y crecimiento. La expresión simultánea de genes reguladores del ciclo celular y la proteólisis mediada por ubiquitina indica la utilidad de este chip para monitorizar la maduración del ovario en peces. Este estudio también ha identificado la expresión en el ovario adulto de la trucha de genes con actividad morfogenética, como miembros de la familia de proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), Notch, Frizzled y Wnt, los cuales son esenciales en varios procesos embrionarios de vertebrados (VON SCHALBURG *et al.* 2006). El significado fisiológico de este hallazgo en la trucha, no obstante, todavía no ha sido descubierto.

En otro estudio, BOBE *et al.* (2006) han investigado el modelo global de expresión génica en ovarios de trucha en vitelogénesis, postvitelogénesis y maduración mediante el empleo de matrices de nylon con 9.152 ESTs. Este estudio muestra la activación o represión de unos 300 genes en el ovario preovulatorio, aunque para la mayoría de estos no se conoce cual puede ser su función en el ovario. Justo antes de la maduración del oocito se ha observado que los niveles de varios ARNm relacionados con la síntesis de estrógenos disminuyen, mientras que otros ARNm que codifican proteínas relacionadas con el transporte de agua e iones y la inflamación/coagulación y vasodilatación, así como proteasas, aumentan. Estas observaciones confirman la progresiva reducción de la expresión de genes relacionados con la síntesis de estrógenos en el ovario antes de la maduración meiótica, y son además consistentes con el proceso de hidratación que parece ocurrir en el oocito de la trucha durante la maduración (MILLA *et al.*



2006). Asimismo, los datos parecen apoyar la hipótesis de que el proceso de ovulación puede parecerse desde el punto de vista molecular a una reacción inflamatoria (BOBE *et al.* 2006).

En la trucha, MAZURAS *et al.* (2005) también han empleado membranas de nylon con 1.152 ESTs procedentes de testículo (macromatrices) para analizar el modelo de expresión génica global durante la espermatogénesis. Este estudio describe la expresión diferencial de 207 genes que se pueden agrupar en 5 clusters que presentan un perfil de expresión diferente. Uno de estos clusters se encuentra sobreexpresado en el estado I (proliferación lenta de espermatogonias) y podría estar implicado en los estadios iniciales de la espermatogénesis, como la formación de los túbulos seminíferos. Un segundo cluster muestra una elevación transitoria al principio del estado II (recrudescencia testicular). Los otros 3 clusters agrupan varios genes implicados en la proliferación celular y la síntesis y modificación de proteínas. La expresión de uno de estos clusters se reprime durante el estado I, mientras que los dos restantes se activan durante el estado III (aparición de espermatocitos y espermatidas) y IV (aparición de los primeros espermatozoides). Esta observación puede sugerir el papel de estos genes durante la proliferación de espermatogonias y la meiosis y durante el metabolismo de proteínas asociado al crecimiento celular. Este estudio inicial, por tanto, ha proporcionado indicios de los genes diana implicados en la maduración testicular, y muestra que para algunos genes determinados los resultados obtenidos están de acuerdo con los datos de expresión previamente observados utilizando métodos moleculares tradicionales. No obstante, son necesarios estudios adicionales para determinar la implicación funcional de los genes identificados en este trabajo durante la espermatogénesis.

Las investigaciones mencionadas demuestran la aplicabilidad de los chips de ADN para descubrir genes implicados en el control de la reproducción y la fertilidad en peces. Más estudios están siendo llevados a cabo actualmente, todavía no publicados, sobre especies marinas comerciales, como la dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*). En el lenguado se han desarrollado chips con oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos de la región 3'UTR de los ARNm.



Estos chips se están empleando para definir el modelo transcripcional durante el desarrollo ovocitario y la espermatogénesis y durante su control hormonal (CERDÀ *et al.* 2005). Algunos de los experimentos llevados a cabo han identificado, por ejemplo, algunos genes testiculares potencialmente implicados en la adquisición de la motilidad espermática (CERDÀ *et al.* datos no publicados), lo cual es uno de los aspectos que deben de ser optimizados en el control de la reproducción de esta especie en cautividad (AGULLEIRO *et al.* 2006; CABRITA *et al.* 2006).

3.2. Análisis seriado de la expresión génica

Como se ha mencionado anteriormente, la secuenciación a gran escala de genotecas de ADNc puede ser empleada para investigar el perfil de expresión génica de un tejido. No obstante, estos métodos pueden producir una visión sesgada del transcriptoma ya que los genes que se expresan a niveles altos normalmente se encuentran sobre representados en una base de datos de ESTs (CHEN *et al.* 2002; KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006). Además, la comparación cuantitativa de distintas genotecas de ESTs debe considerar sesgos sistemáticos durante la síntesis *in vitro* de ADNc (LIU y GRABER 2006).

Los métodos de análisis seriado de la expresión génica (SAGE), los cuales se basan en la enumeración de ADNc cortos y direccionales (tags), proporcionan una estimación cuantitativa y cualitativa de los genes expresados en un tejido (VELCULESCU *et al.* 1995; GOWDA *et al.* 2004), y son reproducibles (DINEL *et al.* 2005). Los resultados de estos métodos puede ser además correlacionados con datos obtenidos a partir de chips de ADN (IBRAHIM *et al.* 2005; VAN RUISSEN *et al.* 2005), y pueden ser más eficientes para descubrir nuevos genes y formas alternativas de ARNm específicos que los métodos basados en ESTs (CHEN *et al.* 2002). No obstante, una limitación de los métodos SAGE es la obtención de ARNm que producen múltiples tags (ver KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006). En cualquier caso, esta técnica ha sido muy utilizada. Por ejemplo, varias genotecas SAGE, producidas a partir de oocitos de humanos (NEILSON *et al.* 2000; STANTON *et al.* 2002), han servido para identificar genes expresados de forma diferencial en carcinomas de ovario (PETERS *et al.* 2005).

El análisis por SAGE de tejidos gonadales de especies de teleósteos no han sido publicado. Sin embargo, recientemente se ha llevado a



cabo un análisis por SAGE de folículos ováricos maduros de pez cebra con el objetivo de definir el juego completo de ARNm maternos almacenados en el oocito (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006). Este catálogo, que se ha denominado ZEBRAOV, contiene 11.399 tags distintos clasificados en 3.437 clusters (ARNm distintos), de los cuales 3.329 están representados más de una vez. El análisis comparado de ZEBRAOV con genotecas de ESTs disponibles en bases de datos públicas indica un nivel similar de abundancia de algunos ESTs. Sin embargo, cuando se compara ZEBRAOV con algunas de estas genotecas se obtiene un perfil cuantitativo diferente, posiblemente debido a la sobrerepresentación de ESTs asociados a un número bajo de ARNm diferentes. De este modo, algunos de los ARNm que son abundantemente detectados mediante SAGE son detectados a niveles muy bajos, o no detectados en absoluto, en algunas de estas genotecas. Como ejemplos de este fenómeno, se puede citar un ARNm moderadamente similar al factor para el arresto zigótico 1 (ZAR1), o el ARNm que codifica la secuencia señal del receptor beta (*ssr2*), el cual forma parte del complejo proteico para la traslocación de polipéptidos al lumen del retículo endoplasmático, y que es proporcionado al embrión maternalmente (MANGOS *et al.* 2000). La base de datos ZEBRAOV es aproximadamente 1,8 veces más sensible para detectar ARNm maternos que las genotecas de ESTs, incluso teniendo en cuenta que el número de clones de ADNc que se han secuenciado para el ZEBRAOV es aproximadamente 21 veces menor (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006). Sin embargo, este número puede no ser suficiente para detectar algunos ARNm, como el *vasa*, el cual se expresa en oocitos y embriones tempranos de pez cebra (BRATT *et al.* 1999; KROVEL y OLSEN 2004), pero no se encuentra en ZEBRAOV. A pesar de ello, el análisis por SAGE es capaz de identificar ARNm y formas alternativas que no han sido identificadas previamente, proporcionando de este modo una visión más completa del transcriptoma de los folículos ováricos.

La comparación del catálogo ZEBRAOV con el transcriptoma del ovario/huevo de otras especies animales indica tanto similitudes como diferencias (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006). El análisis SAGE muestra la presencia de varios ARNm nuevos, algunos de ellos altamente expresados en el folículo y que se encuentran bien conservados en el transcripto-



ma de otros vertebrados. Algunos de estos corresponden a proteínas ribosómicas, β -actinas y tubulinas, o a proteínas que se conoce están bien representadas en el ovario, como ZPPs o ciclinas (proteínas del ciclo celular) (ZENG y GONG 2002; WEN *et al.* 2005). Homólogos de estos ARNm se encuentran altamente expresados en el transcriptoma de huevos de mamíferos y anfibios (*Xenopus laevis*), y en menor medida, de invertebrados. Otros genes que también se encuentran altamente expresados son los genes de claudina, los cuales codifican para proteínas que forman parte de las uniones ocluyentes y que median la adhesión y migración celular (TSUKITA y FURUSE 2002). En el pez cebra se han identificado numerosos genes de claudinas, pero sólo el *cl دنب* se ha encontrado altamente representado en ZEBRAOV. Algunos de los ARNm de claudinas son de origen maternal y sus niveles disminuyen al inicio de la embriogénesis (Lo *et al.* 2003). Otro ARNm muy abundante en el folículo ovárico maduro del pez cebra pertenece a una extensa familia de proteínas que muestra un dominio muy similar al dominio lectina de unión a galactosa/ramnosa que se encuentra en muchas proteínas con propiedades de unión a azúcares (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006). Este dominio, llamado SUEL, fue inicialmente caracterizado en la lectina de huevos de estrella de mar (*Anthocidaris crassispina*) (OZEKI *et al.* 1991), y más tarde en lectinas de unión a galactosa/ramnosa de huevos de pez gato (*Parasilurus asotus*; HOSONO *et al.* 1999) y trucha (TATENO *et al.* 1998), donde se ha sugerido que podría intervenir durante la maduración del oocito y la fertilización posterior (TATENO *et al.* 1998).

El análisis mediante SAGE también revela numerosos ARNm altamente expresados en el folículo del pez cebra que no han sido previamente identificados en genotecas de ADNc (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006). Ello puede ser debido a la pérdida de pequeños ARNm durante la construcción de la genoteca, o a un enriquecimiento de ciertos ARNm en los últimos estadios de la foliculogénesis. Ejemplos de estos ARNm son metalotioneina 2 (*mt2*), proteína de shock térmico 90-b (*hsp90b*) y ferritina. En el caso de *mt2*, experimentos de hibridación in situ demuestran su localización citoplasmática en uno de los polos del oocito (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006), lo cual es consistente con la actividad metalotioneina de estas células (RIGGIO *et al.* 2003) y la presencia de



mt2 en embriones antes de la transición de midblástula (CHEN *et al.* 2004). ARNm codificante de cadenas pesadas de ferritinas, incluyendo *fth1*, las cuales están implicadas en la unión a metales, se encuentran también en genotecas de ADNc de ovarios/huevos no fertilizados de otros vertebrados, y es consistente con la presencia de ferritina en huevos de anfibios (BROWN y CASTON 1962; KANDROR *et al.* 1992) y caracoles (VON DARL *et al.* 1994). ARNm homólogos codificantes de proteínas de shock térmico 90 (HSP90), como *hsp90b*, cuya proteína está implicada en diversos mecanismos reguladores posttraduccionales mediante la interacción con moléculas de señal y factores de transcripción (KRONE *et al.* 1997), también se expresan a niveles altos en el ovario de mamíferos. Finalmente, otros ARNm que se expresan de forma elevada y consistente en el transcriptoma del ovario de vertebrados son aquellos que codifican para la ATP sintasa mitocondrial transportadora de H⁺ (*atp5g*), la proteína de unión a ARN inducida por frío (*cirbp*) y la lactato deshidrogenasa B4 (*ldhb*). El ARNm *atp5g* se expresa de forma elevada en el ovario de peces y la proteína correspondiente es una de la cadenas del componente de membrana no enzimático de la ATPasa mitocondrial. El producto de *cirbp* aparentemente juega un papel esencial durante la supresión de la proliferación celular inducida por frío (FUJITA 1999), y la proteína derivada de uno de los ARNm *cirbp* parece que está implicada en la regulación traduccional en el oocito de anfibios (MATSUMOTO *et al.* 2000). Los ARNm *ldhb* se encuentran en el transcriptoma del ovario de todos los vertebrados, observándose niveles altos en oocitos de ratón (ROLLER *et al.* 1989) los cuales parecen disminuir durante la maduración y después de la fertilización (CASCIO y WASSERMAN 1982).

3.3. Perfiles de expresión de genes diana

La anotación de ESTs después de la construcción de genotecas de ADNc y secuenciación, así como después de análisis mediante micromatrices, puede identificar ARNm potencialmente relevantes durante la gametogénesis de peces. La expresión de estos transcritos puede ser determinada mediante métodos cuantitativos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real utilizando transcripción inversa (RT-qPCR). A diferencia de métodos clásicos para evaluar



la expresión génica (e.g., Northern blot, Dot blot, RT-PCR semicuantitativo), el RT-qPCR permite una cuantificación rápida y precisa de los niveles de ARNm. El número de genes a determinar puede ser relativamente elevado, en algunos casos hasta unos 100 (e.g., BARON *et al.* 2005), y por ello los resultados pueden analizarse mediante métodos bioinformáticos similares a los que se emplean para el análisis con micromatrices de ADN.

El método de RT-qPCR ha sido empleado en la trucha para investigar los cambios de expresión de 37 genes distintos en folículos ováricos durante la adquisición de la competencia para la maduración del oocito y durante la maduración del oocito propiamente (BOBE *et al.* 2004). El mecanismo de adquisición de competencia para la maduración («follicle maturational competence», FMC) comprende toda una serie de procesos que ocurren en el folículo ovárico que permiten que las células de la granulosa sintetizen el progestágeno inductor de la maduración, y que el oocito sea capaz de responder a este activando la meiosis detenida en profase I (PATIÑO *et al.* 2001). Aunque se piensa que la LH es la principal responsable del FMC, los mecanismos moleculares involucrados son todavía poco conocidos. En el estudio llevado a cabo por BOBE *et al.* (2005) se seleccionaron 37 ARNm, previamente clonados, que codifican varios factores de crecimiento, miembros de la superfamilia de factores de crecimiento de transformación (TGF β), enzimas esteroideogénicos y proteínas reguladoras, receptores de FSH y LH, catepsinas (proteasas) y proteínas que forman las uniones íntimas de comunicación celular (conexinas). Este estudio muestra que entre los ARNm acumulados, algunos lo son claramente al final del proceso de FMC, mientras que otros, como el *igf-1* e *igf-2*, exhiben un progresivo incremento durante todo el periodo preovulatorio. Por el contrario, otros ARNm, como el que codifica la aromatasa, muestran una marcada disminución específicamente durante la maduración del oocito. Estos datos en conjunto sugieren la existencia de importantes cambios moleculares en el folículo durante todo el periodo previo a la ovulación, lo que puede indicar una progresiva diferenciación del folículo ovárico desde el final de la vitelogénesis hasta la ovulación. Además, algunos cambios de expresión parecen coincidir con el instante en que se activa la meiosis.



AEGERTER *et al.* (2005) también han empleado el método RT-qPCR para estudiar el efecto de la superovulación en huevos de trucha no fertilizados sobre la expresión de 39 genes distintos. El objetivo de este estudio ha sido determinar si existe una relación directa entre los niveles de estos ARNm y la calidad del huevo. Los genes estudiados fueron seleccionados en base a su posible implicación en el desarrollo embrionario temprano según estudios realizados en otras especies. Este estudio ha demostrado que realmente existen diferencias en los niveles de algunos ARNm en huevos con distinta viabilidad debida a la superovulación. Así, defectos en la viabilidad del huevo aparecen asociados con niveles bajos de ARNm de *igf1*, β -tubulin (*tubb*) y nucleoplasmina (*npm2*), la cual es crítica para la organización nuclear y nucleolar durante el desarrollo embrionario (BURNS *et al.*, 2003). En huevos con baja viabilidad se observa por el contrario una ligera acumulación de ARNm codificantes para filamentos intermediarios (keratinas 8 y 18), catepsina Z y prostaglandina sintasa 2 (*ptgs2*). Los datos de este trabajo también sugieren que la acumulación de algunos ARNm, como aquellos que codifican ciclina A1 y A2, esenciales para mantener los ciclos celulares en las células embrionarias iniciales (TAIEB *et al.* 1997), no se completa al final de la ovulación, sino que requiere de un tiempo adicional después de la ovulación. Curiosamente, este periodo incrementa la viabilidad de los huevos, lo que indica que los oocitos no están completamente «maduros» después de la ovulación. Estos hallazgos sugieren por tanto que varios procesos celulares, como el ciclo celular y la organización maternal de la cromatina, se encuentran potencialmente asociados con defectos en la calidad de los huevos provocados por la superovulación.

4. REGULACIÓN POSTTRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR MICROARN

Los microARN (miARN) son pequeñas moléculas de ARN, de unos 21 pares de nucleótidos de longitud, capaces de regular la expresión de genes diana mediante la unión a los ARNm complementarios (Figura 3). Los miARN proceden de la transcripción de miARN precur-

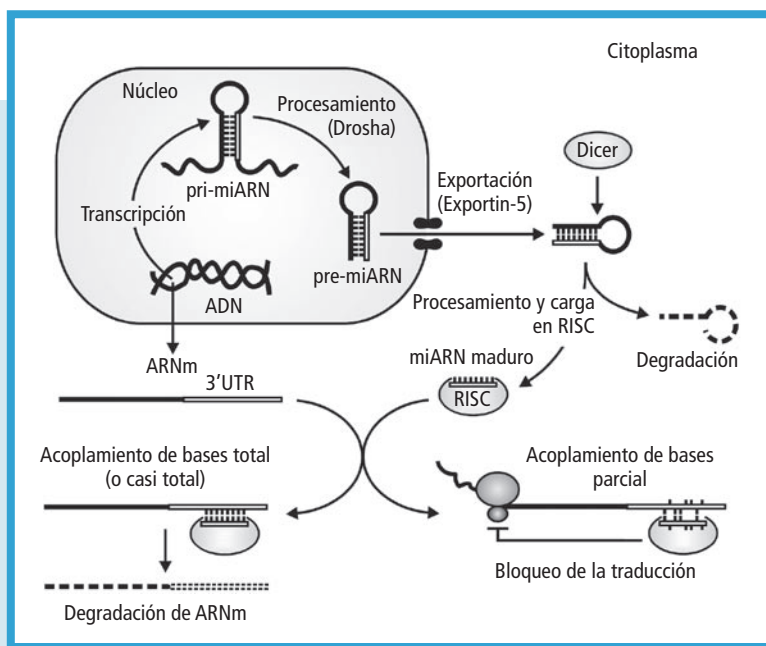


sores, unos transcritos especiales que forman una horquilla mediante la unión de bases complementarias presentes en la misma secuencia (HUTVAGNER *et al.* 2001). En el núcleo, los transcritos son procesados por un complejo proteico que contiene una ARNasa III endonucleasa (Drosha) y son exportados al citoplasma mediante la proteína exportin-5 localizada en la envoltura nuclear. Una vez en el citoplasma, otra ARNasa III endonucleasa (Dicer) digiere la horquilla y genera ARN de doble cadena. Una de estas cadenas se incorpora en el complejo de proteínas RISC («RNA-induced silencing complex»), y el miARN, que entonces ya es maduro, se dirige a sus genes diana (SCHWARTZ *et al.* 2003). Los miARN pueden actuar a nivel de la estabilidad del ARNm en el citoplasma o impedir o atenuar su traducción a proteínas. Dado que un miARN suele tener homología con diferentes secuencias del transcriptoma, se considera que los miARN poseen la capacidad de regular múltiples genes dianas. Aunque los miARN son muy pequeños, la mayoría están muy conservados entre los vertebrados, lo que indica que la regulación por miARN es una estrategia universal en estos organismos para coordinar la expresión de grandes grupos de genes.

WIENHOLDS *et al.* (2005) han analizado la distribución espacial y temporal de 115 miARN conservados entre vertebrados en embriones del pez cebra mediante el análisis por micromatrices de ADN e hibridación *in situ*. Estos autores han observado que la mayoría de los miARN son expresados en tejidos específicos solamente durante la segmentación y estadios posteriores del desarrollo embrionario, pero no antes. Estos hallazgos sugieren por tanto un papel importante de los miARN en la diferenciación o mantenimiento de la identidad de los diferentes tejidos.

Los miARN también juegan un papel importante para establecer patrones de expresión génica en células germinales primordiales («primordial germ cells», PGC), así como en su diferenciación a partir de las células somáticas. Desde hace varios años, se conoce que la expresión del ARNm *nanos1*, el cual codifica para una proteína «zinc finger» de unión a ARN, es necesaria para el desarrollo de la línea germinal del pez cebra, y su expresión se encuentra restringida a las PGC por medio de diferentes mecanismos de control posttranscripcional (KOPRUNNER *et al.* 2001). Recientemente, se ha demostrado que la zona 3'UTR

FIGURA 3. Representación esquemática de la biogénesis de miARN y posible mecanismo de acción para el silenciamiento de genes. Pri-miARN, miARN primario: pre-miARN, miARN precursor. Modificado de TSUCHIYA *et al.* (2006).



de *nanos1* y de otro gen específico de PGCs, *TDRD7*, son dianas del miARN denominado miR-430. El miR-430 actúa tanto en PGCs como en células somáticas. No obstante, sólo se observa una inhibición eficiente de *nanos1* y *TDRD7* por miR-430 en células somáticas, limitando así la expresión de estos ARNm en la línea germinal (MISHIMA *et al.* 2006). El miR-430 es por tanto esencial para la correcta diferenciación de las PGC, pero también es de primordial importancia durante el desarrollo del embrión. En el embrión, el miR-430 se expresa al principio de la transcripción zigótica, y como consecuencia, cientos de genes cambian su patrón de expresión, lo que sugiere que miR-430 es responsable de la eliminación del ARN materno en una fase temprana del desarrollo embrionario (GIRALDEZ *et al.* 2006).

El papel de miARN durante la gametogénesis de vertebrados, después de la diferenciación de PGC, todavía no es bien conocido. En la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), mediante la comparación del proteoma (ver más adelante) de oocitos normales con el de oocitos que no expresan Dicer-1, se han identificado una serie de



proteínas cuya traducción podría ser controlada por miARN durante la maduración del oocito (NAKAHARA *et al.* 2005). La fracción de genes que podría estar bajo regulación por miARN es baja (4%), y la mayoría de estos genes están implicados en la biogénesis y ciclo de renovación de proteínas. En espermatozoides de ratón también se han encontrado miARN mediante micromatrices de ADN cuyos ARNm diana están presentes en oocitos en metafase II, los cuales también expresan el ARNm de la subunidad catalítica de RISC (OSTERMEIER *et al.* 2005; AMANAI *et al.* 2006). Sin embargo, los miARN del espermato, una vez liberados en el oocito durante la fertilización, no parecen afectar la activación nuclear o el desarrollo preimplantacional de los embriones (AMANAI *et al.* 2006). Por tanto, el papel de miARN de origen paterno durante la fertilización o el desarrollo embrionario es incierto.

Finalmente, aunque no se han descrito aún ejemplos en teleósteos, los miARN también pueden jugar un papel importante en la interacción huésped-virus. Varios virus emplean miARN para regular la expresión de sus propios genes y evitar la respuesta inmunitaria (SULLIVAN *et al.* 2005), mientras que las células de mamíferos emplean miR-32 para controlar la replicación del retrovirus primate foamy virus tipo I (PFV-1) (LECELLIER *et al.* 2005). Por el contrario, PFV-1 produce una proteína capaz de suprimir el silenciamiento por ARN de interferencia (ARNi) y compensar el efecto protector de miR-32 (LECELLIER *et al.* 2005).

5. PROTEÓMICA

La proteómica es una herramienta analítica relativamente nueva que se dirige a la identificación de las diferentes proteínas en una muestra biológica, sus modificaciones posttraduccionales, y su cantidad relativa entre diferentes muestras. Este método se basa en la combinación de sistemas de electroforesis de una o dos dimensiones (2-DE), cromatografía en capilar y espectrometría de masas (AEBERSOLD y MANN 2003). El uso de estas tecnologías permite la caracterización del proteoma (i.e., el repertorio de proteínas) de un tejido, pudiendo identificar en algunos casos hasta miles de proteínas en un solo experimento. La proteómica cuantitativa comparada está tomando un protagonismo central en la identificación de pequeñas diferencias en muestras bio-



lógicas, como por ejemplo las que ocurren durante ciertas patologías o como resultado de la activación de una vía de señal específica en la célula (ONG y MANN 2005).

5.1. Tecnologías para el análisis proteómico

Debido a la gran complejidad de la mayoría de muestras biológicas, las tecnologías de proteómica necesitan la separación de proteínas en la muestra seguida de la hidrólisis de cada una de ellas, o bien la hidrólisis de todas las proteínas en pools de péptidos seguida de la resolución de los péptidos en fracciones diferentes (AEBERSOLD y MANN 2003). La técnica más potente para la separación de proteínas intactas es 2-DE. Desde la introducción de los geles de gradiente con enfoque del pH isoelectrico para la primera dimensión de 2-DE, la resolución, reproducibilidad y capacidad de 2-DE ha aumentado considerablemente, y actualmente este método puede resolver miles de proteínas en un solo experimento (BJELLQVIST *et al.* 1982; GORG *et al.* 2004). Los sistemas de análisis de imagen se emplean normalmente para comparar diferentes 2-DE y las manchas teñidas (proteínas) de interés son diseccionadas del gel e hidrolizadas. Los péptidos resultantes son entonces extraídos y separados mediante cromatografía en capilar en fase reversa conectada a un espectrógrafo de masas (μ LC-MS/MS). De este modo se obtiene información sobre las masas exactas de péptidos individuales así como su secuencia de aminoácidos y las posibles modificaciones posttraduccionales (STEEN y MANN 2004). Los datos de microsecuencia se comparan con bases de datos genómicas y de proteínas para identificar los péptidos obtenidos. Estas secuencias se pueden también emplear para sintetizar oligonucleótidos que serán utilizados para clonar los ADNc de los péptidos mediante RT-PCR y de este modo obtener los ARNm completos que codifican la proteína de interés (e.g., COONROD *et al.* 2002). En algunos casos, no obstante, cuando las proteínas son difíciles de resolver mediante 2-DE, estas pueden ser separadas mediante electroforesis de una dimensión seguida de hidrólisis y μ LC-MS/MS (GORG *et al.* 2004). La proteólisis se puede realizar también sobre proteínas en solución seguida de la separación de los péptidos resultantes en subfracciones mediante cromatografía de intercambio iónico, que son después analizadas como péptidos individuales



utilizando μ LC-RP-MS/MS (LINK *et al.* 1999). Las muestras biológicas complejas normalmente se analizan con más de uno de estos métodos para la obtención de datos lo más exactos posibles.

5.2. Proteómica del ovario de teleósteos y comparación del transcriptoma y proteoma

Los diferentes estadios durante el desarrollo ovocitario de peces están asociados a cambios en el repertorio de proteínas. Estas proteínas son necesarias para la maquinaria fisiológica del oocito, y algunas de ellas son almacenadas para ser utilizadas durante la fertilización y el posterior desarrollo embrionario. Condiciones nutricionales y de confinamiento de los reproductores inadecuadas pueden inducir cambios en el proteoma de los oocitos, y a su vez afectar la calidad del huevo. Por tanto, el análisis proteómico de oocitos puede ser muy útil para identificar proteínas que se acumulan o desaparecen durante el desarrollo normal o anormal del oocito, y de este modo ser utilizadas como biomarcadores de calidad del oocito/huevo. En ganado porcino, los métodos de proteómica se han empleado para establecer el repertorio de proteínas de los oocitos durante la maduración meiótica y para identificar factores maternos de interés (ELLEDEROVA *et al.* 2004; NOVAK *et al.* 2004).

El análisis del proteoma se ha empleado en peces para evaluar el efecto fisiológico de las condiciones nutricionales (e.g., MARTIN *et al.* 2001, 2003) y ambientales (e.g., KULTZ y SOMERO 1996; ZHU *et al.* 2006; PROVAN *et al.* 2006) sobre tejidos somáticos. El análisis del proteoma de oocitos, huevos o embriones tempranos de peces es sin embargo más complejo debido a la presencia de grandes cantidades de vitelo (ver arriba) que puede enmascarar otros componentes proteicos durante el análisis. Este problema puede ser solucionado en embriones mediante la separación del vitelo por métodos físicos antes del análisis por 2-DE, de modo que los cambios de proteínas que se expresan en pequeña cantidad puedan ser identificados (LINK *et al.* 2006; TAY *et al.* 2006). No obstante, la separación física del vitelo puede causar la pérdida de proteínas importantes fuertemente adheridas a los glóbulos de vitelo, y así obtenerse un proteoma incompleto. Un método alternativo para folículos ováricos es utilizar grandes cantidades de proteínas totales en



los geles 2-DE para compensar la cantidad ingente de proteínas del vitelo (GATTEGNO *et al.* 2007).

Hasta la fecha se han publicado muy pocos estudios sobre el proteoma de oocitos o huevos de peces, incluyendo especies modelo como el pez cebra o el medaka. No obstante, recientemente se han llevado a cabo análisis proteómicos a gran escala de folículos ováricos de dorada (*Sparus aurata*) y pez cebra en diferentes estadios de desarrollo (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006; GATTEGNO *et al.* 2007). Estos estudios han identificado un gran número de proteínas, pero solamente algunas de ellas parecen aumentar en los estadios de desarrollo más tardíos. La principal excepción son las proteínas del vitelo cuya concentración aumenta durante el crecimiento del oocito como resultado de la incorporación de Vg. Respecto a las proteínas menos abundantes, la mayoría de los cambios que se han observado corresponden a modificaciones postraduccionales mas que incrementos de concentración.

En el pez cebra, el análisis combinado de folículos ováricos maduros mediante SAGE y proteómica ha permitido comparar el transcriptoma y proteoma de oocitos por primera vez en peces (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006). Este aspecto es de gran interés ya que los oocitos maduros y huevos son inactivos desde el punto de vista transcripcional, y como tales, son células de almacén de ARNm y proteínas necesarias para la fertilización y el desarrollo embrionario. En el folículo ovárico del pez cebra se han identificado proteínas ribosómicas, ZPPs, componentes del citoesqueleto, chaperones, proteínas de shock térmico y proteínas del vitelo, pero también algunas proteínas que no han sido descritas previamente, como la proteína homóloga del antígeno B del síndrome de Sjogren y una proteína de unión a ARN que puede prevenir su degradación (DEUTSCHER *et al.* 1988). La comparación de los datos de proteómica con los obtenidos por SAGE indica que al menos 8 proteínas, de un total de 38 con ARNm expresados sobre el 0.15% según SAGE, son identificadas mediante análisis proteómico. La observación de la presencia de abundantes ARNm sin el correspondiente péptido puede ser debido a un insuficiente análisis proteómico o a la presencia de ARNm específicos que son almacenados y traducidos más tarde durante el desarrollo embrionario. No obstante, esta comparación también ha revelado la presencia de abundantes ARNm, no identificados previamente, los cua-



les muestran su correspondiente proteína. Este es el caso de la lactato deshidrogenasa y la proteína ribosómica PO.

El crecimiento del oocito se caracteriza por una intensa deposición de ARNs y proteínas no necesariamente de la misma naturaleza y con el mismo origen. Estas moléculas maternas pueden ser almacenadas durante largos periodos de tiempo hasta que son empleadas por el embrión. La comparación del transcriptoma y proteoma de folículos ováricos del pez cebra indica que los niveles de ARNm proporcionan de hecho muy poca predicción sobre la abundancia de las proteínas correspondientes, teniendo en cuenta que la proteómica normalmente detecta péptidos relativamente abundantes mientras que la abundancia de ARNm varía sobre dos órdenes de magnitud (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006). Esto es debido a que la determinación del perfil de ARNm puede estar afectado no sólo por los mecanismos transcripcionales sino también por mecanismos de procesamiento y degradación de ARNs. Además, no todos los ARNm son traducidos a proteínas, y de este modo la abundancia de un ARNm determinado puede no corresponder con los niveles de su proteína. De hecho, durante la foliculogénesis y el crecimiento del oocito se observan altas tasas de transcripción y traducción, a las cuales le siguen mecanismos diferenciales de inhibición de la traducción de muchos ARNm (EICHENLAUB-RITTER *et al.* 2002; SCHULTZ 2002). En el pez cebra, las proteínas piruvato quinasa y enolasa I son dos ejemplos de este fenómeno, ya que los correspondientes ARNm parecen disminuir al mismo tiempo que las proteínas son almacenadas al final de la foliculogénesis (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006). En otros casos, se puede encontrar una proteína específica sin el correspondiente ARNm, lo que sugiere que esta molécula es incorporada en el oocito desde la circulación en algún momento del desarrollo ovocitario. Un ejemplo de estas proteínas puede ser la notepsina, una proteasa específica del hígado (RIGGIO *et al.* 2002) que se ha detectado en el folículo del pez cebra (KNOLL-GELLIDA *et al.* 2006).

El análisis del proteoma de los folículos ováricos del pez cebra también sugiere que el proteoma de los oocitos de peces podría parecerse en muchos de sus componentes al proteoma de otros organismos. Muchas de las proteínas presentes en el oocito del pez cebra son no sólo similares a las de otros peces sino que también se asemejan a



las que aparecen en otras especies evolutivamente muy distanciadas, como mamíferos e insectos (GATTEGNO *et al.* 2007). Esta conservación interespecífica con respecto al repertorio de proteínas y moléculas de origen materno en el oocito es también de gran interés práctico ya que puede contribuir a la identificación de factores esenciales durante el desarrollo embrionario en especies de peces de interés comercial. Asimismo, una posibilidad de la proteómica moderna muy remarcable para esta investigación es el análisis de oocitos individuales (GATTEGNO *et al.* 2007). Esta estrategia puede ser útil para identificar cambios moleculares entre oocitos que, en base a caracteres fenotípicos, podría juzgarse que se encuentran en estadios de desarrollo equivalentes.

5.3. Análisis proteómico del líquido celómico

Como ya se ha comentado, los oocitos ovulados (huevos) de muchos teleósteos se mantienen en la cavidad celómica de la hembra inmersos en un fluido llamado líquido celómico antes de ser liberados al exterior. En la trucha, las hembras pueden mantener los huevos en el líquido celómico a 10-12 °C durante al menos una semana sin pérdida de su capacidad de desarrollo; tiempos más largos producen la superovulación de los huevos y una progresiva disminución de su viabilidad (SPRINGATE *et al.* 1984; AEGERTER y JALABERT 2004). El líquido celómico de la trucha tiene un pH de 8 y contiene iones inorgánicos, azúcares, colesterol, fosfolípidos y aminoácidos libres (SATIA *et al.* 1974; LAHNSTEINER *et al.* 1995). Sin embargo, aunque se ha demostrado la presencia de proteasas y antiproteasas en este fluido (COFFMAN *et al.* 2000), así como de fosfatasas, colagenasa, gelatinasa y lactato deshidrogenasa (LAHNSTEINER 2000), su composición proteica es muy desconocida.

El análisis proteómico del líquido celómico se ha realizado recientemente con la intención de identificar proteínas que se acumulan o desaparecen durante la superovulación simultáneamente con la progresiva disminución de la calidad del huevo (RIME *et al.* 2004). En este trabajo se han detectado aproximadamente 200 péptidos de 10-105 kDa de masa aparente y 3-10 de punto isoeléctrico (pI) en el fluido celómico. Algunos de estos péptidos no son detectados en el líquido celómico en el momento de la ovulación, pero exhiben una progresiva y elevada acumulación a medida que avanza la superovulación.



La secuenciación de algunos de estos péptidos más relevantes los ha identificado como fragmentos de lipovitelina (proteína del vitelo), aunque también se ha encontrado lectina del tipo C de unión a manosa y apolipoproteína A-I-1. Estas observaciones sugieren el escape de componentes del oocito durante la superovulación los cuales se acumulan en el fluido ovárico. Por tanto, estas moléculas podrían ser empleadas como biomarcadores de calidad del huevo antes de realizar los procedimientos de fertilización in vitro (RIME *et al.* 2004).

5.4. Proteómica del espermatozoide

El análisis del proteoma de teleósteos durante la espermatogénesis no ha sido publicado. No obstante, en la lubina el análisis del perfil proteico se ha empleado para evaluar el efecto de la criopreservación sobre la integridad de proteínas celulares del espermatozoide (ZILLI *et al.* 2005). Bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio se han detectado 163 proteínas en espermatozoide fresco con masas moleculares entre 10 y 190 kDa y pI entre 3,5 y 8,0. La congelación y posterior descongelación del espermatozoide parece causar la degradación de 21 proteínas. El análisis por espectrografía de masas ha revelado que una de estas proteínas es similar a la proteína del pez cebra homóloga a SKB1 de mamíferos, la cual es una proteína muy conservada con actividad metiltransferasa que interacciona con tirosina quinasas de la familia Janus (JAK) (POLLACK *et al.* 1999). Recientemente se ha demostrado la presencia de proteínas JAK/STAT en el espermatozoide humano y se ha sugerido que estas proteínas podrían estar implicadas en la fusión del oocito y el espermatozoide, así como en la transmisión de la señal al núcleo del oocito (D'CRUZ *et al.* 2001). Por tanto, la reducción de la proteína SBK1 en espermatozoide criopreservado podría ser la responsable del desarrollo anormal de los embriones y las bajas tasas de eclosión que se observa cuando se fertilizan huevos con espermatozoide criopreservado. Otra proteína que parece ser degradada durante la descongelación del espermatozoide es la ciclina E2 G1/S específica la cual está implicada en la activación de quinasas dependientes de ciclina (cdk2) durante el ciclo celular (ZILLI *et al.* 2005). La cdk2 fosforila la fosfatasa PP1 gamma2 que es un enzima clave para la adquisición y regulación de la motilidad del espermatozoide (HUANG y VIJAYARAGHAVAN 2004). De este modo, la reducción



de la motilidad del espermatozoide que se detecta después de la criopreservación podría estar relacionado con la degradación de la ciclina E en los espermatozoides.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Aunque todavía se han publicado muy pocos estudios, la aplicación de la genómica funcional y la proteómica en peces posiblemente tendrá un profundo impacto en acuicultura. Como sugieren los trabajos que se han analizado en este capítulo, el empleo de estas tecnologías posee el potencial para descubrir nuevas conexiones biológicas entre genes y vías metabólicas, y de este modo estas pueden ser herramientas muy potentes para comprender la base genética y molecular de la formación de gametos. La producción de gametos de alta calidad en peces depende de diferentes procesos moleculares, muchos de ellos todavía desconocidos, y por ello el conocimiento de los mecanismos implicados es esencial. Además, después de la fase descriptiva de los genes y proteínas asociados a los gametos, será posible entender los mecanismos reguladores que actúan en las redes de expresión génica y traducción revelando así las interrelaciones entre los distintos componentes implicados. En este momento estos estudios sólo pueden llevarse a cabo en muy pocas especies. El descubrimiento de genes, proteínas y vías reguladoras conservadas entre especies llevará en último término a la optimización de la producción de alevines en acuicultura, y asimismo proporcionará métodos más eficaces para controlar el estado reproductor de poblaciones salvajes.

El desarrollo con éxito de la genómica funcional en peces cultivados, no obstante, requiere aumentar la información actual sobre el genoma y el transcriptoma de estas especies, juntamente con el desarrollo de herramientas bioinformáticas adecuadas. Esta información permitirá la construcción de chips de ADN o de oligos específicos para cada especie, y beneficiará a las técnicas de proteómica gracias a la rápida identificación de péptidos con funciones conocidas así como de nuevas proteínas. Un esfuerzo adicional también debe de ser dirigido para combinar los estudios de genómica funcional con estrategias genéticas, fisiológicas y bioquímicas más tradicionales, y con el análisis detallado de proteomas



y fenotipos específicos. Todo ello podrá contribuir a la identificación del modelo de expresión génica asociado con la producción de gametos viables, así como de aquellas proteínas que puedan ser empleadas como biomarcadores tempranos de calidad de gametos y larvas. Estos marcadores pueden ser extremadamente importantes para no malgastar esfuerzos produciendo larvas de baja calidad en los criaderos.

Finalmente, otro importante desafío es el desarrollo de metodologías que permitan identificar la función fisiológica de ARNm específicos y proteínas en los gametos y embriones de peces cultivados. Sistemas de mutagénesis inducida y de silenciamiento de genes han sido desarrollados para especies modelo de agua dulce, como el pez cebra y el medaka (DAHM y GEISLER 2006). Sin embargo, aunque estas especies pueden proporcionar importantes pistas sobre procesos biológicos fundamentales, estas no poseen algunos de los mecanismos fisiológicos que son esenciales en teleósteos marinos cultivados (e.g., hidratación del oocito). Por tanto, el desarrollo de métodos para identificar la función de genes en peces marinos es todavía necesario. Estas estrategias serán esenciales para explotar todo el potencial que posee la genómica para comprender los mecanismos biológicos implicados en la formación de gametos en peces cultivados.

BIBLIOGRAFÍA

- AEBERSOLD, R. y M. MANN, 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**: 198-207.
- AEGERTER, S., y B. JALABERT, 2004. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **231**: 59-71.
- AEGERTER, S., B. JALABERT, y J. BOBE, 2005. Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Mol. Reprod. Dev.* **72**: 377-385.
- AGCA, C., J. E. RIES, S. J. KOLATH, J. H. KIM, L. J. FORRESTER, E. ANTONIOU, K. M. WHITWORTH, N. MATHIALAGAN, G. K. SPRINGER, R. S. PRATHER y M. C. LUCY, 2006. Luteinization of porcine preovulatory follicles leads to systematic changes in follicular gene expression. *Reproduction* **132**: 133-45.
- AGULLEIRO, M.J., V. ANGUIS, J. P. CAÑAVATE, G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C. C. MYLONAS y J. CERDÀ, 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea*



- senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* **257**: 511-524.
- ALAVI, S. M., y J. COSSON, 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature y pH: a review. *Cell Biol. Int.* **29**: 101-110.
- ALAVI, S. M., y J. COSSON, 2006. Sperm motility in fishes. II. Effects of ions y osmolality: a review. *Cell Biol. Int.* **30**: 1-14.
- AMANAI, M., M. BRAHMAJOSYULA y A. C. PERRY, 2006. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biol. Reprod.* **75**: 877-884.
- ASTURIANO, J. F., L. A. SORBERA, M. CARRILLO, S. ZANUY, J. RAMOS, J. C. NAVARRO y N. BROMAGE, 2001. Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture* **194**: 173-190.
- BARON, D., R. HOULGATTE, A. FOSTIER y Y. GUIGUEN, 2005. Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol. Reprod.*, **73**: 959-966.
- BELL, M.V., J. R. DICK, M. THRUSH y J. C. NAVARRO, 1996. Decreased 20:4n-6/20:5n-3 ratio in sperm from cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, broodstock compared with wild fish. *Aquaculture* **144**: 189-199.
- BILLARD, R., y M. P. COSSON, 1990. The energetics of fish sperm motility, pp 153-173. En: *Control of Sperm Motility, Biological and Clinical Aspects*. (Gagnon, C., Ed.). CRC Press, Florida.
- VBJELLQVIST, B., K. EK, P. G. RIGHETTI, E. GIANAZZA, A. GORG, R. WESTERMEIER y W. POSTEL, 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* **6**: 317-39.
- BOBE, J., T. NGUYEN y B. JALABERT, 2004. Targeted gene expression profiling in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary during maturational competence acquisition and oocyte maturation. *Biol. Reprod.* **71**: 73-82.
- BOBE, J., J. MONTFORT, T. NGUYEN y A. FOSTIER, 2006. Identification of new participants in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte maturation and ovulation processes using cDNA microarrays. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **4**: 39.
- BONNET, E., A. FOSTIER y J. BOBE, 2007. Characterization of rainbow trout egg quality: a case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. *Theriogenology*, en prensa.
- BRATT, A. K, T. ZYBERGEN, S. VAN DE WATER, H. J. T. H. GOOS y D. ZIVKOVIC, 1999. Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev. Dyn.* **216**: 153-167.



- BROMAGE, N. R., M. BRUCE, N. BASAVARAYA, K. RANA, R. SHIELDS, C. YONG, J. DYE, P. SMITH, M. GILLEPSIE y J. GAMBLE, 1994. Egg quality determinants in finfish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. J. World Aquac. Soc. **25**: 13-21.
- BROMAGE, N., M. PORTER y C. RYALL, 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture **197**: 63-98.
- BROOKS, S., C. R. TYLER y J. P. SUMPTER, 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? Rev. Fish Biol. Fish. **7**: 387-416.
- BROWN, A. J., D. M. EBERHARDT, F. N. SCHRICK, M. P. ROBERTS y J. D. GODKIN, 2003. Expression of retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein in the bovine ovary. Mol. Reprod. Dev. **64**: 261-269.
- BROWN, D. D., y J. D. CASTON, 1962. Biochemistry of amphibian development. III. Identification of ferritin in the egg and early embryos of *Rana pipiens*. Dev. Biol. **5**: 445-451.
- BROWN, N. P., R. J. SHIELDS, y N. R. BROMAGE, 2006. The influence of water temperature on spawning patterns and egg quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture **262**: 993-1002.
- BURNS, K. H., M. M. VIVEIROS, Y. REN, P. WANG, F. J. DEMAYO, D. E. FRAIL, J. J. EPPIG y M. M. MATZUK, 2003. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes y embryos. Science **300**: 633-636.
- CABRITA, E., F. SOARES y M. T. DINIS, 2006. Characterization of Senegal sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. Aquaculture **261**: 967-975.
- CAETANO, A. R., R. K. JOHNSON, J. J. FORD y D. POMP, 2004. Microarray profiling for differential gene expression in ovaries and ovarian follicles of pigs selected for increased ovulation rate. Genetics **168**: 1529-1537.
- CAETANO, A. R., J. B. EDEAL, K. BURNS, R. K. JOHNSON, C. K. TUGGLE y D. POMP, 2005. Physical mapping of genes in the porcine ovarian transcriptome. Anim. Genet. **36**: 322-330.
- CARNEVALI, O., G. MOSCONI, M. CARDINALI, I. MEIRI y A. POLZONETTI-MAGNI, 2001. Molecular components related to egg viability in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. Mol. Reprod. Dev. **58**: 330-335.
- CASCIO, S. M., y P. M. WASSERMAN, 1982. Program of early development in the mammals: post-translational control of a class of proteins synthesized by mouse oocytes y early embryos. Dev. Biol. **89**: 397-408.
- CERDÀ, J., S. E. DOUGLAS, C. BUESA, J. P. CAÑAVATE, J. LÓPEZ-BAREA, M. MANCHADO, G. MARTÍNEZ, J. I. NAVAS, F. PIFERRER, J. PLANAS, F. PRAT, M. REITH, M. RUÍZ-REJÓN, y



- M. YÚFERA, 2005. PLEUROGENE: flatfish genomics and proteomics for aquaculture. Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Experimental Biology, 11th-15th July 2005, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. Comp. Biochem. Physiol. 141A, No. 3/Suppl.: S87.
- CHEN, J., M. SUN, S. LEE, G. ZHOU, J. D. ROWLEY y S. M. WANG, 2002. Identifying novel transcripts and novel genes in the human genome by using novel SAGE tags. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**: 12257-12262.
- CHEN, W. Y., J. A. JOHN, C. H. LIN, H. F. LIN, S. C. WU, C. H. LIN y C. Y. CHANG, 2004. Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. Aquat. Toxicol. **69**: 215-227.
- CLAGETT-DAME, M., y H. F. DeLUCA, 2002. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. Annu. Rev. Nutr. **22**: 347-381.
- COFFMAN, M. A., J. H. PINTER y F. W. GOETZ, 2000. Trout ovulatory proteins: site of synthesis, regulation, and possible biological function. Biol. Reprod. **62**: 928-938.
- COONROD, S. A., P. W. WRIGHT y J. C. HERR, 2002. Oolemmal proteomics. J. Reprod. Immunol. **53**: 55-65.
- COWARD, K., N. R. BROMAGE, O. HIBBITT y J. PARRINGTON, 2002. Gamete physiology and egg activation in teleost fish. Rev. Fish Biol. Fish. **12**: 33-58.
- CRAIK, J. C. A., y S. M. HARVEY, 1984. Biochemical changes associated with overripening of the eggs of rainbow trout *Salmo gairdneri*. Aquaculture **37**: 347-357.
- DAHM, R., y R. GEISLER, 2006. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. Mar. Biotechnol. **8**: 329-345.
- D'CRUZ, O. J., A. O. VASSILEV y F. M. UCKUN, 2001. Members of the Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway are present and active in human sperm. Fertil. Steril. **76**: 258-266.
- DEUTSCHER, S. L., J. B. HARLEY y J. D. KEENE, 1988. Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 9479-9483.
- DINEL, S., C. BOLDUC, P. BELLEAU, A. BOVIN, M. YOSHIOKA, E. CALVO, B. PIEDBOEUF, E. E. SNYDER, F. LABRIE y J. ST-AMY, 2005. Reproducibility, bioinformatic analysis and power of the SAGE method to evaluate changes in transcriptome. Nucleic Acids Res. **33**: e26.
- EICHENLAUB-RITTER, U., y M. PESCHKE, 2002. Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. Hum. Reprod. Update **8**: 21-41.



- ELLEDEROVA, Z., P. HALADA, P. MAN, M. KUBELKA, J. MOTLIK y H. KOVAROVA, 2004. Protein patterns of pig oocytes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* **71**: 1533-1539.
- ESCAFFRE, A.M., J. PETIT y R. BILLARD, 1976. Evolution de la fécondabilité des ovules de truite arc en ciel laissés dans la cavité coelomique après ovulation. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* **40**: 561-562.
- FABRA, M., D. RALDÚA, D. M. POWER, P. M. T. DEEN y J. CERDA, 2005. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated. *Science* **307**: 545.
- FABRA, M., D. RALDÚA, M. G. BOZZO, P. M. T. DEEN, E. LUBZENS y J. CERDA, 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-10 play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. *Dev. Biol.* **295**: 250-262.
- FORNIÉS, M. A., E. MAÑANÓS, M. CARRILLO, A. ROCHA, S. LAUREAU, C. C. MYLONAS, Y. ZOHAR, y S. ZANUY, 2001. Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* **202**: 221-234.
- FUJITA, J., 1999. Cold shock response in mammalian cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 243-255.
- GATTEGNO, T., V. CHAPOVETSKY, H. WOLF, E. BARNEA, T. ZIV, E. LUBZENS y A. ADMON, 2007. Comparative proteomics of the developing zebrafish and gilthead seabream fish oocytes. *Comp. Biochem. Physiol. D* (en prensa).
- GIRALDEZ, A. J., Y. MISHIMA, J. RIHEL, R. J. GROCOCK, S. VAN DONGEN, K. INOUE, A. J. ENRIGHT, A. F. SCHIER, 2006. Zebrafish miR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**: 75-79.
- GLADNEY, C. D., G. R. BERTANI, R. K. JOHNSON y D. POMP, 2004. Evaluation of gene expression in pigs selected for enhanced reproduction using differential display PCR and human microarrays: I. Ovarian follicles. *J. Anim. Sci.* **82**: 17-31.
- GORG, A., W. WEISS y M. J. DUNN, 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**: 3665-3685.
- GOWDA, M., C. JANTASURIYARAT, R. A. DEAN y G. WANG, 2004. Robust-Long SAGE (RL-SAGE): a substantially improved LongSAGE method for gene discovery and transcriptome analysis. *Plant Physiol.* **134**: 890-897.
- HOSONO, M., K. ISHIKAWA, K. MINEKI, K. MURAYAMA, C. NUMATA, Y. OGAWA, Y. TAKAYANAGI y K. NITTA, 1999. Tyem repeat structure of rhamnose-binding lectin from catfish (*Silurus asotus*) eggs. *Biochim. Biophys. Acta* **1472**: 668-675.
- HUANG, Z., y S. VIJAYARAGHAVAN, 2004. Increased phosphorylation of a distinct subcellular pool of protein phosphatase, PP1gamma2, during epididymal sperm maturation. *Biol. Reprod.* **70**: 439-447.



- HUTVAGNER, G., J. McLACHLAN, A. E. PASQUINELLI, E. BALINT, T. TUSCHL, P. D. ZAMORE, 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**: 834-838.
- HYLLNER, S. J., L. WESTERLUND, P. E. OLSSON y A. SCHOPEN, 2001. Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: members of a unique group of structural proteins. *Biol. Reprod.* **64**: 805-811.
- IBRAHIM, A. F. M., P. E. HEDLEY, L. CARDLE, W. KRUGER, D. F. MARSHALL, G. J. MUEHLBAUER y R. WAUGH, 2005. A comparative analysis of transcript abundance using SAGE y Affymetrix arrays. *Funct. Integr. Genomics* **5**: 163-174.
- IKEDA, S., M. KITAGAWA, H. IMAI y M. YAMADA, 2005. The roles of vitamin A for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *J. Reprod. Dev.* **51**: 23-35.
- ISKEN, A., J. HOLZCHUH, J. M. LAMPERT, L. FISCHER, V. OBERHAUSER, K. PALCZEWSKI y J. VON LINTIG, 2007. Sequestration of retinyl esters is essential for retinoid signaling in the zebrafish embryo. *J. Biol. Chem.* **282**: 1144-1151.
- IZQUIERDO, M.S., H. FERNÁNDEZ-PALACIOS y A. G. J. TACON, 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* **197**: 25-42.
- KYROR, K. V., V. L. TSUPRUN y A. S. STEPANOV, 1992. The main adenosine triphosphate-binding component of amphibian oocytes is ferritin. *Mol. Reprod. Dev.* **31**: 48-54.
- KJØRSVIK, E., A. MANGOR-JENSEN y I. HOMEFJORD, 1990. Egg quality in fishes. *Adv. Mar. Biol.* **26**: 71-113.
- KNOLL-GELLIDA, A., M. YRÉ, T. GATTEGNO, J. FORGUE, A. ADMON y P. J. BABIN, 2006. Molecular phenotype of zebrafish ovarian follicle by serial analysis of gene expression and proteomic profiling, and comparison with the transcriptomes of other animals. *BMC Genomics* **7**: 46.
- KOLLMAR, R., S. K. NAKAMURA, J. A. KAPPLER y A. J. HUDSPETH, 2001. Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 10196-10201.
- KOPRUNNER, M., C. THISSE, B. THISSE y E. RAZ, 2001. A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* **15**: 2877-2885.
- KRONE, P. H., J. B. SASS y Z. LELE, 1997. Heat shock protein gene expression during embryonic development of the zebrafish. *Cell Mol. Life Sci.* **53**: 122-129.
- KROVEL, A. V., y L. C. OLSEN, 2004. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish *vasa* during gonadal development. *Dev. Biol.* **271**: 190-197.



- KULTZ, D., y G. N. SOMERO, 1996. Differences in protein patterns of gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis* after osmotic and thermal acclimation. J. Comp. Physiol. B **166**: 88-100.
- LAHNSTEINER, F., 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterising the over-ripening of rainbow trout eggs. Fish Physiol. Biochem. **23**: 107-118.
- LAHNSTEINER, F., T. WEISMANN y R. A. PATZE, 1995. Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f lacustris*, *Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho*. Reprod. Nutr. Dev. **35**: 465-474.
- LAHNSTEINER, F., T. WEISMANN y R.A. PATZE, 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. Fish Physiol. Biochem. **20**: 375-378.
- LAHNSTEINER, F., B. URBANYI, A. HORVATH y T. WEISMANN, 2001. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. Aquaculture **195**: 331-352.
- LAMPERT, J. M., J. HOLZSCHUH, S. HESSEL, W. DRIEVER, K. VOGT y J. VON LINTIG, 2003. Provitamin A conversion to retinal via the , -carotene-15,15'-oxygenase (bcox) is essential for pattern formation and differentiation during zebrafish embryogenesis. Development **130**: 2173-2166.
- LECELLIER, C.H., P. DUNOYER, K. ARAR, J. LEHMANN-CHE, S. EYQUEM, C. HIMBER, A. SAIB y O. VOINNET, 2005. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. Science **308**: 557-560.
- LEUNG, Y. F., y D. CAVALIERI, 2003. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. Trends Genet. **19**: 649-659.
- LINK, A. J., J. ENG, D. M. SCHIELTZ, E. CARMACK, G. J. MIZE, D. R. MORRIS, B. M. GARVIK y J. R. YATES 3rd, 1999. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. Nature Biotechnol. **17**: 676-682.
- LINK, V., A. SHEVCHENKO y C. P. HEISENBERG, 2006. Proteomics of early zebrafish embryos. BMC Dev. Biol. **6**: 1.
- LIU, D., y J. H. GRABER, 2006. Quantitative comparison of EST libraries requires compensation for systematic biases in cDNA generation. BMC Bioinformatics **7**: 77.
- LO, J., S. LEE, M. XU, F. LIU, H. RUAN, A. EUN, Y. HE, W. MA, W. WANG, Z. WEN y J. PENG, 2003. 15,000 unique zebrafish EST clusters and their future use in microarray for profiling gene expression patterns during embryogenesis. Genome Res. **13**: 455-466.
- MANGOS, S., R. KRAWETZ y G. M. KELLY, 2000. The Translocon-Associated Protein beta (TRAPbeta) in zebrafish embryogenesis. I. Enhanced expression of transcripts in notochord and hatching gly precursors. Mol. Cell. Biochem. **215**: 93-101.



- MARTIN, S. A. M., P. CASH, S. BLANEY y D. F. HOULIHAN, 2001. Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation. *Fish Physiol. Biochem.* **24**: 259-270.
- MARTIN, S. A., O. VILHELMSSON, F. MEDALE, P. WATT, S. KAUSHIK y D. F. HOULIHAN, 2003. Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. *Biochim. Biophys. Acta* **1651**: 17-29.
- MATSUMOTO, K., K. AOKI, N. DOHMAE, K. TAKIO y M. TSUJIMOTO, 2000. CIRP2, a major cytoplasmic RNA-binding protein in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* **28**: 4689-4697.
- MAZURAIS, D., J. MONTFORT, C. DELALYE y F. J. LE GAC, 2005. Transcriptional analysis of testis maturation using trout cDNA macroarrays. *Gen. Comp. Endocrinol.* **142**: 143-154.
- MILLA, S., B. JALABERT, H. RIME, P. PRUNET y J. BOBE, 2006. Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and in vitro regulation by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol. *J. Exp. Biol.* **209**: 1147-1156.
- MISHIMA, Y., A. J. GIRALDEZ, Y. TAKEDA, T. FUJIWARA, H. SAKAMOTO, A. F. SCHIER y K. INOUE, 2006. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr. Biol.* **16**: 2135-2142.
- MIURA, T., K. YAMAUCHI, H. TAKAHASHI y Y. NAGAHAMA, 1992. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *J. Exp. Zool.* **261**: 359-363.
- MIURA, T. y C. I. MIURA, 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol. Biochem.* **28**: 181-186.
- MIURA, T., M. HIGUCHI, Y. OZAKI, T. OHTA y C. MIURA, 2006. Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenetic cells of the eel. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **103**: 7333-7338.
- MODIG, C., T. MODESTO, A. CANARIO, J. CERDÀ, J. VON HOFSTEN y P. E. OLSSON, 2006. Molecular characterization and expression pattern of zona pellucida proteins in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biol. Reprod.* **75**: 717-725.
- MOUROT, M., I. DUFORT, C. GRAVERL, O. ALGRIANY, S. DIELEMAN y M. A. SIRARD, 2006. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol. Reprod. Biol.* **73**: 1367-1379.
- NAGAHAMA, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* **38**: 217-229.
- NAGAHAMA, Y., M. YOSHIKUNI, M. YAMASHITA, T. TOKUMOTO y Y. KATSU, 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish, pp. 398-403. En: *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 30. (R.A. Pedersen y G. P. Schatten, Eds.). Academic Press, New York.



- NAKAHARA, K., K. KIM, C. SCIULLI, S. R. DOWD, J. S. MINDEN y R. W. CARTHEW, 2005. Targets of microRNA regulation in the *Drosophila* oocyte proteome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**: 12023-12028.
- NEILSON, L., A. D. YALIBI, C. KANG, C. COUTIFARIS, J. F. 3RD STRAUSS, J. A. STANTON y D. P. GREEN, 2000. Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. Genomics **63**: 13-24.
- NOVAK, S., F. PARADIS, C. SAVARD, K. TREMBALY y M. A. SIRARD, 2004. Identification of porcine oocyte proteins which are associated with somatic cell nuclei after co-Incubation. Biol. Reprod. **71**: 1279-1289.
- OHKUBO, N., y T. MATSUBARA, 2002. Sequential utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of barfin flounder *Verasper moseri*. Mar. Biol. **140**: 187-196.
- ONG, S. E., y M. MANN, 2005. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. Nat. Chem. Biol. **1**: 252-262.
- OSTERMEIER, G. C., R. J. GOODRICH, J. S. MOLDENHAUER, M. P. DIAMOND y S. A. KRAWETZ, 2005. A suite of novel human spermatozoal RNAs. J. Androl. **26**: 70-74.
- OZEKI, Y., T. MATSUI, M. SUZUKI y K. TITANI, 1991. Amino acid sequence and molecular characterization of a D-galactoside-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) eggs. Biochemistry **30**: 2391-2394.
- PATÍÑO, R., G. YOSHIZAKI, P. THOMAS y H. KAGAWA, 2001. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept y its mechanisms. Comp. Biochem. Physiol. **129B**: 427-439.
- PELEGRI, F., 2003. Maternal factors in zebrafish development. Dev. Dyn. **228**: 535-554.
- PELEGRI, F., y M. C. MULLINS, 2004. Genetic screens for maternal-effect mutations. Methods Cell Biol. **77**: 21-51.
- PETERS, D. G., D. M. KUDLA, J. A. DELOIA, T. J. CHU, L. FAIRFULL, R. P. EDWARDS y R. E. FERREL, 2005. Comparative gene expression analysis of ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium by serial analysis of gene expression. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **14**: 1717-1723.
- POLLACK, B. P., S. V. KOTENKO, W. HE, L. S. IZOTOVA, B. L. BARNOSKI y S. PESTKA, 1999. The human homologue of the yeast proteins Skb1 y Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. J. Biol. Chem. **274**: 31531-31542.
- POLZONETTI-MAGNI, A. M., G. MOSCONI, L. SOVERCHIA, S. KIKUYAMA y O. CARNEVALI, 2004. Multihormonal control of vitellogenesis in lower vertebrates. Int. Rev. Cytol. **239**: 1-46.



- PROVAN, F., A. BJORNSTAD, D. M. PAMPANIN, E. LYNG, R. FONTANILLAS, O. K. YERSEN, W. KOPPE y S. BAMBER, 2006. Mass spectrometric profiling - a diagnostic tool in fish? *Mar. Environ. Res.* **62**: S105-108.
- RIGGIO, M., R. SCUDIERO, S. FILOSA y E. PARISI, 2002. Oestrogen-induced expression of a novel liver-specific aspartic proteinase in *Danio rerio* (zebrafish). *Gene* **295**: 241-246.
- RIGGIO, M., S. FILOSA, E. PARISI y R. SCUDIERO, 2003. Changes in zinc, copper y metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish). *Comp. Biochem. Physiol.* **135C**: 191-196.
- RIME, H., N. GUITTON, C. PINEAU, E. BONNET, J. BOBE y B. JALABERT, 2004. Post-ovulatory ageing and egg quality: a proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2**: 26-35.
- RISE, M. L., K. R. VON SCHALBURG, G. D. BROWN, M. A. MAWER, R. H. DEVLIN, N. KUIPERS, M. BUSBY, M. BEETZ-SARGENT, R. ALBERTO, A. R. GIBBS, P. HUNT, R. SHUKIN, J. A. ZEZNICK, C. NELSON, S. R. JONES, D. E. SMAILUS, S. J. JONES, J. E. SCHEIN, M. A. MARRA, Y. S. BUTTERFIELD, J. M. STOTT, S. H. NG, W. S. DAVIDSON y B. F. KOOP, 2004. Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics. *Genome Res.* **14**: 478-490.
- ROLLER, R. J., R. A. KINLOCH, B. Y. HIRAOKA, S. S. LI y P. M. WASSARMAN, 1989. Gene expression during mammalian oogenesis and early embryogenesis: quantification of three messenger RNAs abundant in fully grown mouse oocytes. *Development* **106**: 251-262.
- SAKAI, K., M. NOMURA y H. OTO, 1975. The over-ripening phenomenon of rainbow trout: II. Changes in the percentage of eyed eggs, hatching rate and incidence of abnormal alevins during the process of over-ripening. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **41**: 855-860.
- SATIA, B. P., L. R. DONALSON, L. S. SMITH y J. N. NIGHTINGALE, 1974. Composition of ovarian fluid and eggs of the university of Washington strain of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* **31**: 1796-1799.
- SELMAN, K., y R. A. WALLACE, 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* **6**: 211-231.
- SCHULTZ, R. M., 2002. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum. Reprod. Update* **8**: 323-331.
- SCHULZ, R.W, H. F. VISCHER, J. E. B. CAVACO, E. M. SANTOS, C. R. TYLER, H. J. Th. GOOS y J. BOGERD, 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **129B**: 407-417.



- SCHWARTZ, D. S., G. HUTVAGNER, T. DU, Z. XU, N. ARONIN y P. D. ZAMORE, 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**: 199-208.
- SMITH, L., y A. GREENFIELD, 2003. DNA microarrays y development. *Hum. Mol. Genet.* 12 Spec. No. 1: R1-8.
- SPRINGATE, J. R. C., N. R. BROMAGE, J. A. K. ELLIOTT y D. L. HUDSON, 1984. The timing of ovulation y stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* **43**: 313-322.
- STANTON, J. L., M. BASCY, L. FISHER, M. QUINN, A. MACGREGOR y D. P. GREEN, 2002. Gene expression profiling of human GV oocytes: an analysis of a profile obtained by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *J. Reprod. Immunol.* **53**: 193-201.
- STEEN, H., y M. MANN. The ABC's (y XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 699-711 (2004).
- STEWART, J. D., Y. LOU, E. J. SQUIRES y P. M. COUSSENS, 2005. Using human microarrays to identify differentially expressed genes associated with increased steroidogenesis in boars. *Anim. Biotechnol.* **16**: 139-151.
- SULLIVAN, C.S., A.T. GRUNDHOFF, S. TEVETHIA, J. M. PIPAS y D. GANEM, 2005. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* **435**: 682-686.
- TAIEB, R., C. THIBIER y C. JESSUS, 1997. On cyclins, oocytes, and eggs. *Mol. Reprod. Dev.* **48**: 397-411.
- TATENO, H., A. SANEYOSHI, T. OGAWA, K. MURAMOTO, H. KAMIYA y M. SANEYOSHI, 1998. Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologous to low density lipoprotein receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**: 19190-19197.
- TAY, T. L., Q. LIN, T. K. SEOW, K. H. TAN, C. L. HEW y Z. GONG, 2006. Proteomic analysis of protein profiles during early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Proteomics* **6**: 3176-3188.
- THOMAS, P., Y. ZHU y M. PACE, 2002. Progesterone membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids* **67**: 511-517.
- TORRISSEN, O. J., y R. CHRISTIANSEN, 1995. Requirements for carotenoids in fish diets. *J. Appl. Ichthyol.* **11**: 225-230.
- TSUCHIYA, S., O. YASUSHI y G. TSUJIMOTO, 2006. MicroRNA: Biogenetic and functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer. *J. Pharmacol. Sci.* **101**: 267-270.



- TSUKITA, S., y M. FURUSE, 2002. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 531-536.
- TYLER, C. R., y J. P. SUMPTER, 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish. Biol. Fish.* **6**: 287-318.
- VALLEE, M., C. GRAVEL, M. F. PALIN, H. REGHENAS, P. STOTHARD, D.S. WISHART y M. A. SIRARD, 2005. Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and microarray analysis in three different species. *Biol. Reprod.* **73**: 63-71.
- VAN RUISEN, F., J. M. RUIJTER, G. J. SCHAAF, L. ASGHARNEGAD, D. A. ZWIJENBURG, M. KOOL y F. BASS, 2005. Evaluation of the similarity of gene expression data estimated with SAGE and Affymetrix GeneChips. *BMC Genomics* **6**: 91.
- VELCULESCU, V. E., L. ZHANG, B. VOGELSTEIN y K. W. KINZLER, 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* **270**: 368-369.
- VERMEIRSEN, E.L.M., C. MAZORRA DE QUERO, R. J. SHIELDS, B. NORBERG, D. E. KIME y A. P. SCOTT, 2004. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotropin-releasing hormone agonist implant. *Aquaculture* **230**: 547-567.
- VON DARL, M., P. M. HARRISON y W. BOTKE, 1994. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: soma ferritin and yolk ferritin, from the snail *Lymnaea stagnalis* L. *Eur. J. Biochem.* **222**: 353-366.
- VON SCHALBURG, K. R., M. L. RISE, G. D. BROWN, W. S. DAVIDSON y B. F. KOOP, 2005. A comprehensive survey of the genes involved in maturation and development of the rainbow trout ovary. *Biol Reprod.* **72**: 687-699.
- VON SCHALBURG, K.R., S. P. MACCARTHY, M. L. RISE, J. C. HUTSON, W. S. DAVIDSON, y B.F. KOOP, 2006. Expression of morphogenic genes in mature ovarian and testicular tissues: potential stem-cell niche markers and patterning factors. *Mol. Reprod. Dev.* **73**: 142-152.
- WALLACE, R.A., 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates, pp. 127-177. En: *Developmental Biology*, Vol. 1: Oogenesis. (Browder, L.W., Ed.). Plenum Press, New York.
- WATANABE, T., y R. VASSALLO-AGIUS, 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture* **227**: 35-61.
- WEN, C., Z. ZHANG, W. MA, M. XU, Z. WEN y J. PENG, 2005. Genome-wide identification of female-enriched genes in zebrafish. *Dev. Dyn.* **232**: 171-179.
- WHITWORTH, K. M., C. AGCA, J. G. KIM, R. V. PATEL, G. K. SPRINGER, N. J. BIVENS, L. J. FORRESTER, N. MATHIALAGAN, J. A. GREEN y R. S. PRATHE, 2005. Transcriptional profiling of pig embryogenesis by using a 15-K member unigene set specific for pig reproductive tissues and embryos. *Biol. Reprod.* **72**: 1437-1451.



- WIENHOLDS, E., W. P. KLOOSTERMAN, E. MISKA, E. ALVAREZ-SAAVEDRA, E. BEREZIKOV, E. DE BRUIJN, H. R. HORVITZ, S. KAUPPINEN y R. H. PLASTERK, 2005. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* **309**: 310-311.
- YAMAGAMI, K., T. S. HAMAZAKI, S. YASUMASU, K. MASUDA y I. IUCHI, 1992. Molecular and cellular basis of formation, hardening, and breakdown of the egg envelope in fish. *Int. Rev. Cytol.* **136**: 51-92.
- YAMASHITA, M., 1998. Molecular mechanisms of meiotic maturation and arrest in fish and amphibian oocytes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**: 569-579.
- YAO, J., X. REN, J. J. IRELY, P. M. COUSSENS, T. P. SMITH y G. W. SMITH, 2004. Generation of a bovine oocyte cDNA library and microarray: resources for identification of genes important for follicular development and early embryogenesis. *Physiol. Genomics* **19**: 84-92.
- ZENG, S., y Z. GONG, 2002. Expressed sequence tag analysis of expressed profiles of zebrafish testis and ovary. *Gene* **294**: 45-53.
- ZHU, J. Y., H. Q. HUANG, X. D. BAO, Q. M. LIN y Z. CAI, 2006. Acute toxicity profile of cadmium revealed by proteomics in brain tissue of *Paralichthys olivaceus*: potential role of transferrin in cadmium toxicity. *Aquat. Toxicol.* **78**: 127-135.
- ZILLI, L., R. SCHIAVONE, V. ZONNO, R. ROSSANO, C. STORELLI y S. VILELLA, 2005. Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biol. Reprod.* **72**: 1262-1267.
- ZOHAR, Y., y C. C. MYLONAS, 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* **197**: 99-136.

14

APROXIMACIONES GENÓMICAS AL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN EN PECES

APROXIMACIONES GENÓMICAS AL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN EN PECES

J. Roher

Universitat de Barcelona

M. Díaz

Universitat de Barcelona

S. MacKenzie

Universitat Autònoma de Barcelona

A. Krasnov

Akvaforsk, Noruega

J. V. Planas

Universitat de Barcelona

1. INTRODUCCIÓN AL CRECIMIENTO EN PECES

En la explotación de especies de peces teleósteos en acuicultura, uno de los principales objetivos es la consecución de un óptimo crecimiento. El crecimiento en especies cuyo destino es principalmente la alimentación humana tiene dos componentes importantes. El primero es la generación de animales de características físicas adecuadas, en cuanto a tamaño (longitud y peso) y aspecto visual (por ejemplo, ausencia de malformaciones). El segundo es la generación de animales que, al estar destinados al consumo humano, adquieran una calidad adecuada, en cuanto a composición, textura y palatabilidad.



El crecimiento es un proceso extremadamente complejo que depende, por un lado, de los componentes hereditarios y, por otro lado, de la interacción entre el pez y el medio externo en el que se encuentra. En términos biológicos, el crecimiento puede considerarse un proceso multiplicativo en el que el número y el volumen de las células aumenta y que representa el balance final de una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento que se inician con la ingesta del alimento y finalizan con la deposición de material animal o energía (BRETT 1979). El medio externo que influencia el crecimiento puede radicar propiamente en el alimento, el cual es necesario para financiar el coste del crecimiento, pero también es importante para el crecimiento el ambiente externo físico y químico en el que está inmerso el pez. El ambiente físico, ya sea en cuanto a temperatura, oxigenación del ambiente, salinidad, etc., es particularmente relevante en especies heterotérmicas acuáticas, como los peces teleósteos. El ambiente químico externo también influye sobre el crecimiento, ya sea en forma de contaminantes o patógenos, puesto que éstos provocan la activación de procesos biológicos (detoxificación hepática, desarrollo de una respuesta inmune, etc.) que muy probablemente repercutirán de forma negativa sobre el crecimiento.

Desde un punto de vista fisiológico, el crecimiento es un proceso complejo que a su vez depende de otros procesos fisiológicos que se influyen mutuamente, tales como el desarrollo, la nutrición y el metabolismo (Figura 1). Normalmente entendemos crecimiento en peces como el aumento del tamaño longitudinal del animal y, concretamente, de la masa muscular, aunque de forma paralela a la estructura ósea y a los órganos. El músculo esquelético, al ser el tejido del pez que se destina a consumo humano es el tejido más importante desde el punto de vista del crecimiento y puede representar un 50% de la masa corporal total. En peces, la formación y el desarrollo de las fibras musculares y su capacidad metabólica son procesos esenciales para el crecimiento a nivel muscular y éstos dependen de una adecuada ingesta, por un lado, y un adecuado aporte, incorporación y metabolización de factores nutritivos, por otro lado. Así pues, en el crecimiento a nivel muscular juegan un papel esencial aquellos órganos más directamente relacionados con la nutrición, como por ejemplo el intestino, el hígado



y el tejido adiposo. El hígado, debido a su capacidad para almacenar carbohidratos en forma de glucógeno y para utilizarlos, para producir glucosa por gluconeogénesis y para la síntesis y acúmulo de lípidos, es posiblemente el órgano más importante aportando nutrientes al tejido muscular.

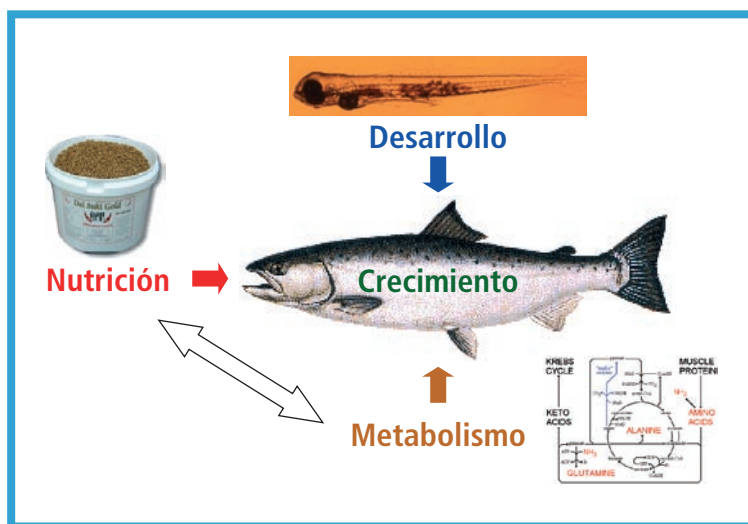


FIGURA 1.
Factores que
influyen en el
crecimiento en
peces.

2. CRECIMIENTO MUSCULAR

El crecimiento en peces tiene una serie de características únicas entre los vertebrados. En la mayor parte de los vertebrados, tal como se ha descrito en mamíferos, el crecimiento es determinado, lo cual significa que el crecimiento finaliza en un momento determinado de la vida del animal y se alcanza una talla finita. En cambio, en la gran mayoría de especies de peces teleósteos el crecimiento es de tipo indeterminado, lo que significa que no hay un tamaño máximo y que el crecimiento es continuado a lo largo de la vida del animal (MOMMSEN 2001). A pesar de ser continuado, el crecimiento en peces teleósteos no es lineal sino que tiene lugar en fases de crecimiento, incluso alternando fases de crecimiento en cuanto a longitud con fases de crecimiento en cuanto a masa corporal. La mayor parte del crecimiento consiste en realidad en un



aumento gradual del tejido muscular, principalmente del músculo blanco, que representa aproximadamente el 90% del tejido muscular. Así pues, la causa de la diferencia entre peces y el resto de vertebrados en cuanto a tipo de crecimiento (indeterminado con respecto a determinado) es el tipo de crecimiento de las fibras musculares. Al contrario de lo que ocurre en mamíferos, aquellas especies de peces teleósteos que presentan un crecimiento de tipo indeterminado incrementan su masa muscular mediante dos mecanismos distintos: mediante el aporte o reclutamiento de nuevas fibras musculares (hiperplasia) y también mediante el aumento del tamaño de las fibras existentes (hipertrofia) (JOHNSTON 1999). El aporte de nuevas fibras musculares al tejido muscular durante la vida post-natal es lo que permite que la mayor parte de especies de peces presenten un crecimiento de tipo indeterminado y es lo que les diferencia del resto de vertebrados. Sin embargo, en el resto de vertebrados y en las especies de peces con crecimiento de tipo determinado (como por ejemplo, el pez cebra, *Danio rerio*), el número de fibras musculares queda establecido y fijado en el momento del nacimiento y el crecimiento es únicamente debido a la hipertrofia de fibras ya formadas. El crecimiento hiperplásico, particularmente importante en aquellas especies que alcanzan un gran tamaño, depende de múltiples factores, incluyendo el estadio de desarrollo, las condiciones ambientales, el grado de actividad y el estado fisiológico (nutricional, metabólico, etc.). Hoy en día se considera que el crecimiento hiperplásico es posible gracias a la existencia de una población de mioblastos no diferenciados y en estado proliferativo que tienen la capacidad de diferenciarse terminalmente y fusionarse entre sí para generar nuevas fibras musculares o bien ser absorbidos por fibras musculares existentes para aportar nuevos núcleos y contribuir al crecimiento hipertrófico. Por lo tanto, las altas tasas de crecimiento que se alcanzan en vida post-natal en peces están asociadas con hiperplasia del músculo esquelético (WEATHERLEY y GILL 1982).

En peces teleósteos, al igual que en otros vertebrados, el músculo está formado en términos generales por dos tipos de fibras musculares: lentas y rápidas. Estos dos tipos de fibras difieren en cuanto a su localización anatómica, puesto que las rápidas ocupan la mayor parte de la masa muscular o músculo blanco, mientras que las lentas ocupan una franja superficial antero-posterior a la altura de la línea lateral (BONE



1978). La musculatura lenta representa como máximo un 10% del total de la masa de la musculatura y recibe el nombre de músculo rojo. Las fibras lentas y las rápidas también difieren en cuanto su metabolismo, ya que las fibras lentas son aeróbicas mientras que las fibras rápidas son anaeróbicas (BONE 1978). Finalmente, las fibras lentas y las rápidas tienen un origen embriológico distinto y presentan distintos patrones de crecimiento post-embrionario (JOHNSTON *et al.* 2004). Las fibras rápidas incrementan de número hasta que el pez llega a una longitud determinada genéticamente y posteriormente el crecimiento es únicamente por hipertrofia de las fibras existentes (JOHNSTON *et al.* 2004). Sin embargo, las fibras lentas incrementan en número de forma continuada con el aumento de la talla del pez (JOHNSTON *et al.* 2004).

3. DESARROLLO Y CRECIMIENTO

Al igual que con la nutrición y el metabolismo, el crecimiento está ligado íntimamente con el desarrollo puesto que durante el desarrollo se modelan y orquestan todos los factores y vías que van a ser esenciales para el crecimiento. Desde el punto de vista práctico, esto se pone de manifiesto al observar que una tasa de crecimiento óptima se consigue únicamente cuando el desarrollo larvario tiene lugar también de forma óptima. Una organogénesis incompleta durante el desarrollo provocará muy probablemente la existencia de carencias y limitaciones en las fases de juvenil y adulto. Concretamente, en el caso del músculo esquelético, a lo largo de las primeras etapas del desarrollo (embrionario) se forman las fibras musculares embrionarias y también una población de mioblastos no diferenciados que serán los que hagan posible el crecimiento posterior (JOHNSTON 1999). Durante el desarrollo, la formación del tejido muscular en peces se inicia antes que se hayan formado todos los somitas y tiene lugar en dirección rostro-caudal. El proceso de diferenciación de los mioblastos no diferenciados y la formación de fibras musculares, proceso denominado programa de diferenciación miogénica, es un proceso complejo en el que el tejido muscular está bajo el control de factores producidos por los tejidos que le rodean, principalmente el notocordio. Estos factores, a su vez, activan un complejo sistema de factores de transcripción en el tejido

muscular denominados factores reguladores miogénicos (BUCKINGHAM *et al.* 2003; RESCAN 2005). En la Figura 2 se muestra un modelo reciente ilustrando el proceso de miogénesis en peces teleósteos.

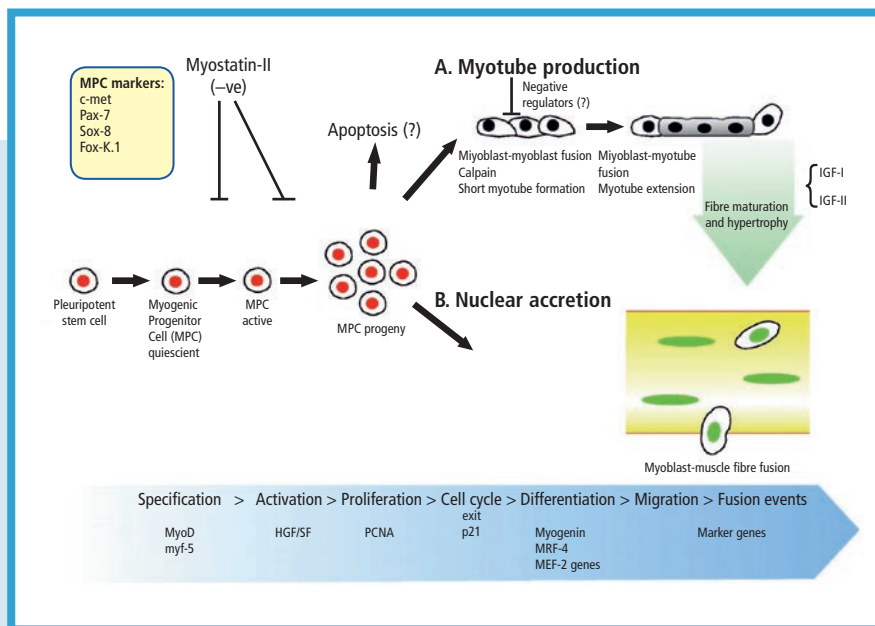


FIGURA 2.

Modelo actual de la miogénesis en el músculo esquelético de los peces teleósteos. Adaptado de Johnston, I. A. J. Exp. Biol. 2006.

4. IMPORTANCIA DE LA GENÓMICA PARA EL ESTUDIO DEL CRECIMIENTO

Al ser el crecimiento un proceso fisiológico en el que intervienen múltiples órganos (hígado, tracto gastrointestinal, páncreas, etc.) y muy diversos niveles de regulación (genes, mRNA, proteínas, metabolitos), para entender cómo interaccionan todas estas variables y poder optimizar el crecimiento es necesario abordar el problema desde una perspectiva multidisciplinar y global. Esta auténtica perspectiva fisiológica, hoy en día llamada *biología de sistemas*, es ahora posible abordarla para el estudio



del crecimiento en peces gracias al desarrollo reciente de las tecnologías «ómicas» (del griego, «completo», «todo»), que proporcionan un enfoque global. Así pues, cabe destacar el análisis global de los genes (*genómica*), del mRNA expresado por dichos genes (*transcriptómica*), de las proteínas (*proteómica*) y de los metabolitos (*metabolómica*). El objetivo de la biología de sistemas, y, en nuestro caso, el de la genómica funcional del crecimiento, es la integración de toda la información de todos los niveles de expresión genómica (mRNA, proteína y metabolito) (Figura 3) y la reconstrucción de las vías y redes funcionales que actúan controlando dicho proceso. Esta reconstrucción virtual de un proceso fisiológico proporciona un mapa bastante exacto de la geografía de dicho proceso que permite medir o detectar pequeñas alteraciones de dichas vías y redes funcionales en respuesta a un estímulo, cuando se compara con el mapa control o referencia. Por ello, desde el punto de vista genómico, principalmente transcriptómico y proteómico, es importante identificar y reconstruir los patrones de expresión de genes y proteínas que conducen a la correcta formación de tejidos y órganos y a su correcto funciona-

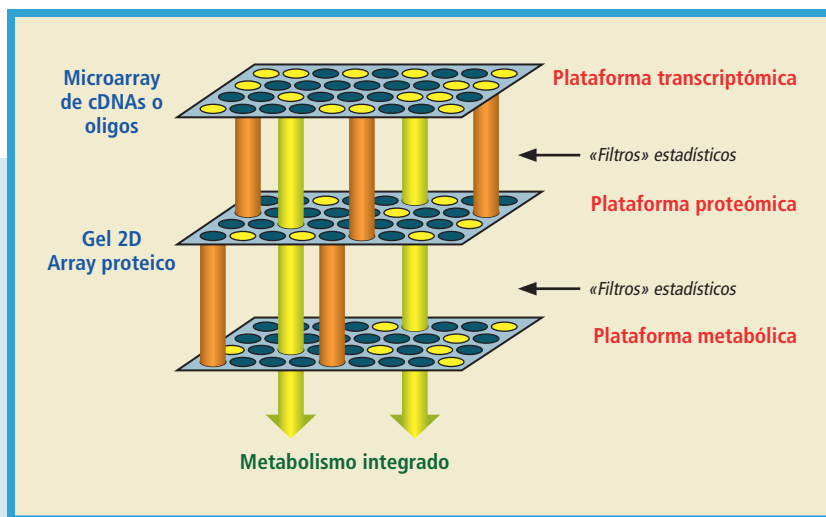


FIGURA 3.

La biología de sistemas para el estudio del metabolismo representa un enfoque reduccionista que «filtra» información en los distintos niveles. Adaptado de Mutch et al. FASEB Journal. 2005.



miento. Asimismo, es importante la identificación de firmas moleculares, es decir, grupos de genes cuya expresión es característica o típica de un determinado proceso o estadio durante el desarrollo. Estas firmas moleculares pueden ser utilizadas como biomarcadores para la monitorización del propio proceso de desarrollo y crecimiento, y también como posibles dianas para su manipulación con la finalidad de promover el desarrollo y, por consiguiente, el crecimiento. En definitiva, gracias a la capacidad de integrar información procedente de varios niveles podemos abandonar el concepto clásico de biomarcador de un proceso (un gen, una proteína, un metabolito) y adoptar un nuevo concepto de biomarcador como un patrón de respuestas múltiples, representativas de una vía o red de interacciones moleculares (Figura 4).

Por ejemplo, un patrón de expresión génica (representando cambios en la expresión de miles de genes) en el músculo o en un determinado estadio larvario puede considerarse un biomarcador que podrá utilizarse para comprender los efectos de determinados componentes dietarios o fisiológicos sobre el crecimiento. Hoy en día la dificultad de estos nuevos enfoques no está a nivel técnico, es decir, en cuanto a la detección de cambios a cada uno de los niveles, puesto que la tecnología de detección es suficientemente avanzada y continúa haciéndolo. La mayor dificultad reside precisamente en el aspecto de integración de la información biológica, en el aspecto bioinformático (Figura 5).

En el campo de la nutrición concretamente se ha avanzado enormemente en el tipo de enfoque que se utiliza para estudiar la relación entre dietas y el genoma hasta llegarse a crear una nueva disciplina denominada *nutrigenómica* (VAN OMMEN y STIERUM 2002). La nutrigenómica tiene como objetivo estudiar la influencia de componentes de la dieta sobre el genoma e intenta relacionar el fenotipo observado con diferencias en la respuesta celular y/o genética del sistema biológico (MUTCH *et al.* 2005). Dicho de otra manera, la nutrigenómica utiliza herramientas genómicas para estudiar como un estímulo nutricional afecta a las vías metabólicas y a la homeostasis. Como se verá más adelante, puede decirse que, aunque en sus inicios, existe ya una nutrigenómica en peces para el estudio de los efectos globales sobre el organismo de determinados componentes de la dieta, lo cual será de enorme utilidad para la formulación de dietas en acuicultura.

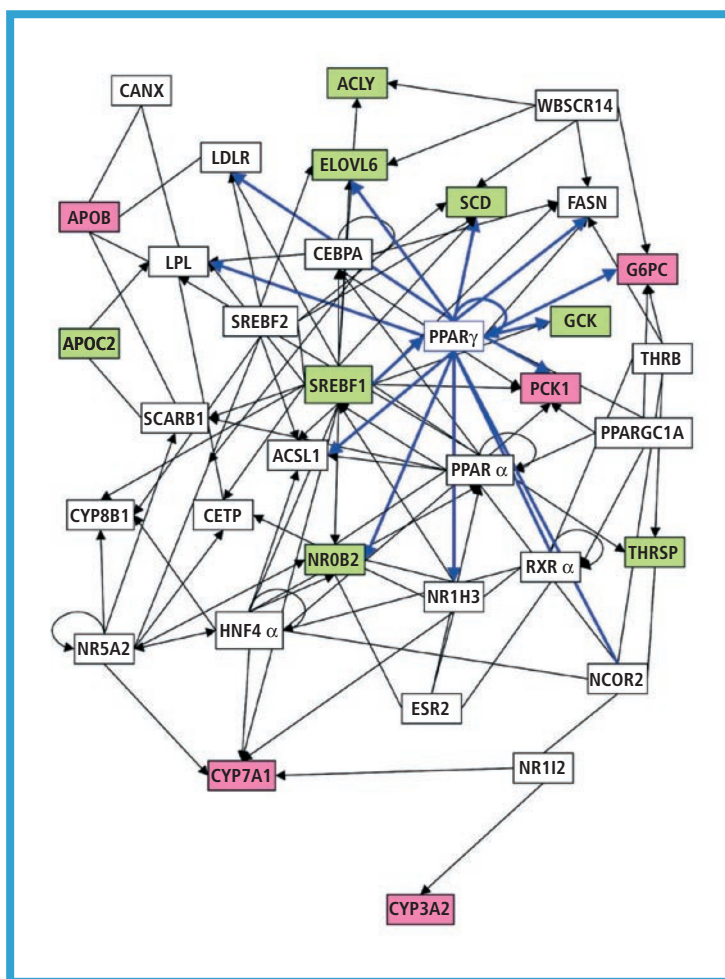


FIGURA 4.
Ejemplo de redes biológicas frente a un estímulo nutricional. En este caso el estímulo es la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados. Adaptado de MUTCH *et al.* FASEB Journal. 2005.

5. APROXIMACIONES GENÓMICAS AL CRECIMIENTO DURANTE EL DESARROLLO

El estudio de los cambios en la expresión génica a lo largo del desarrollo embrionario de peces se ha empezado a abordar en fechas recientes con aproximaciones globales como la creación de librerías de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) y posteriormente con la creación de

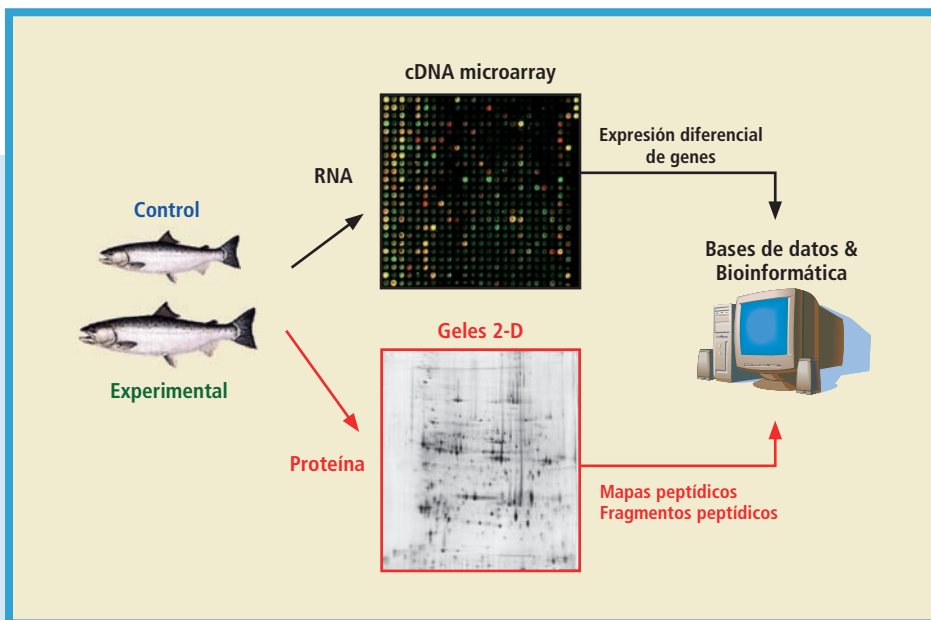


FIGURA 5.

Aproximaciones transcriptómicas y proteómicas para el estudio del crecimiento, desarrollo, nutrición o metabolismo en peces teleosteos.

plataformas de microarrays. Hasta la fecha, en peces, no disponemos de mucha información sobre cambios en la expresión génica asociados a un determinado proceso biológico como puede ser el desarrollo o el crecimiento, aunque sí se observa una clara tendencia hacia la creación de plataformas de transcriptómica en distintas especies de peces. En peces, en cuanto a la utilización de herramientas como ESTs o microarrays, podemos diferenciar claramente entre pez cebra y el resto de especies. El pez cebra se ha convertido en un organismo modelo para el estudio del desarrollo embrionario de vertebrados por su manejabilidad, su rápido crecimiento y por la facilidad para crear mutantes de genes asociados a diferentes patologías. Así pues, en pez cebra disponemos de diversas herramientas para el estudio del desarrollo embrionario como librerías, microarrays de cDNA o microarrays de oligonucleótidos; mientras que para el resto de especies consideradas no modelos disponemos de herramientas más limitadas. Hasta el



momento se han desarrollado microarrays basados en librerías de ESTs y secuencias anotadas para salmón atlántico (*Salmo salar*) (VON SCHALBURG *et al.* 2005) y trucha arco iris (KRASNOV *et al.* 2005) y se han obtenido, como paso previo para la fabricación de microarrays de Atlantic halibut, librerías de ESTs en distintas fases del desarrollo embrionario (BAI *et al.* 2007). Otra especie emergente en cuanto a su utilización como organismo modelo para el estudio del desarrollo embrionario es el pez medaka. Este vertebrado ofrece algunas ventajas adicionales a las ya comentadas para el pez cebra ya que su genoma es más pequeño, crece en un rango de temperaturas más permisivas y se dispone de cepas altamente fértiles. Aun así las plataformas para el estudio de los cambios de expresión asociados al desarrollo embrionario de medaka están menos desarrolladas que las existentes para pez cebra.

5.1. Transcriptómica del desarrollo en especies modelo

5.1.1. Pez cebra (*Danio rerio*)

El primer microarray disponible de pez cebra data del año 2002 y se construyó con 4512 secuencias de cDNA y 1517 secuencias de ESTs provenientes de corazón embrionario, corazón adulto y músculo esquelético (TON *et al.* 2002). Con este microarray se estudiaron los patrones de expresión génica que tienen lugar desde la fertilización hasta después de la eclosión (5, 12, 24, 48, 72 y 120 h post-fertilización, *hpf*) (TON *et al.* 2002). El análisis de los resultados se realizó agrupando los genes según el patrón de expresión temporal, de forma que obtenemos grupos de genes (*clusters*) que además suelen quedar agrupados por funciones celulares concretas. En dicho trabajo se observó la sobreexpresión de un *cluster* de genes a las 5 hpf en el que abundan proteasas del tipo cathepsina. Este incremento en la expresión de proteasas tipo cathepsina podría no representar un incremento en la transcripción de estos genes sino provenir del aporte materno de genes. Otros genes expresados de forma temprana son las proteínas de la envoltura del huevo ZP2 y ZP3, de las cuales se sabe que sólo se transcriben en el oocito maduro de hembras sexualmente maduras, y también la DNA metiltransferasa que otros trabajos han demostrado



que está presente en grandes cantidades en el oocito materno. Así pues a las 5 hpf más que una sobreexpresión de genes del embrión lo que se observa es una gran cantidad de transcritos de origen materno que el embrión necesita para desarrollarse después de la fertilización. Estos *clusters* de genes a las 12 hpf dejan de expresarse y a partir de las 24 hpf tienen un patrón de expresión temporal distinto que se concreta en un incremento de la expresión de catepsinas tipo S y L a las 24 hpf y una segunda oleada de expresión de catepsinas tipo B a las 72 hpf. En el trabajo también se muestran dos grupos de genes muy interesantes que empiezan a sobreexpresarse de forma coordinada a partir de las 48 hpf y que están relacionados con la miogénesis y con la cardiogénesis. En el primer grupo encontramos proteínas como la actina y la miosina, la parvalbúmina o enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico y las creatinas quinasas musculares que incrementan su expresión con el objetivo de cubrir la demanda energética del músculo en desarrollo. En el segundo grupo observamos genes específicos implicados en el desarrollo del corazón como los factores de transcripción MEF2C o dHAND.

El trabajo llevado a cabo por Ton y colaboradores (TON *et al.* 2002) demuestra la expresión coordinada de grupos de genes en fases muy tempranas del desarrollo embrionario. Si observamos los resultados podemos apreciar que éstos se corresponden con una parte pequeña de los datos potencialmente analizables del microarray. Los autores sólo analizan aproximadamente un 20% de los datos y dejan la mayor parte del experimento sin analizar. De hecho uno de los problemas al que se enfrentan los investigadores en el campo de la transcriptómica es la gran cantidad de datos que se generan que hacen que, a menudo, el análisis detallado los mismos no sea fácilmente abordable. Una estrategia razonable es intentar analizar los resultados agrupándolos según el patrón de expresión temporal (en el caso de disponer de un análisis a lo largo del tiempo) o según el proceso fisiológico en que interviene un determinado gen. Así pues, una aproximación de tipo holístico, que aborde el análisis de los procesos fisiológicos globales y no de componentes individuales de estos procesos permite una visión completa de los procesos celulares afectados que posteriormente pueden ser abordadas al detalle con otras técnicas complementarias



como el análisis por hibridación *in situ* o PCR a tiempo real (Real-Time PCR o QPCR).

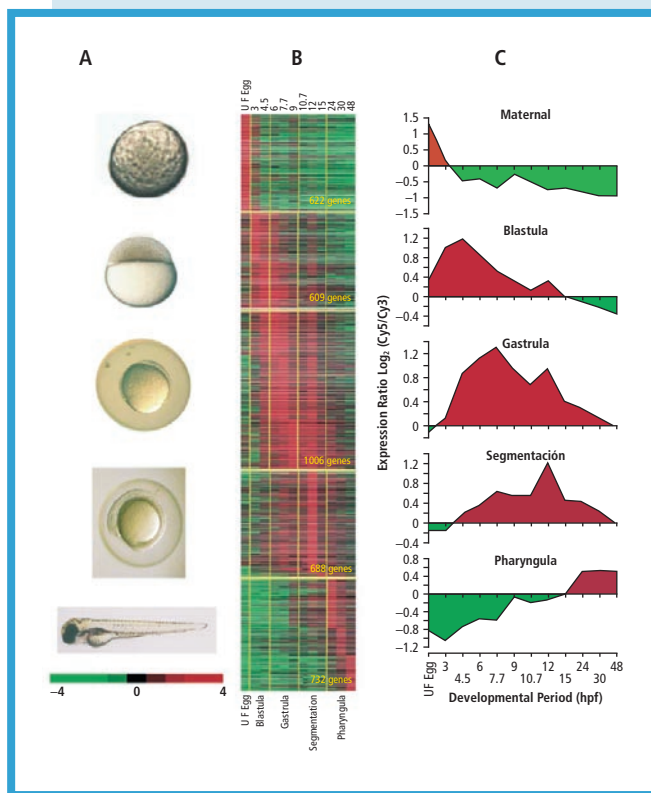
Una segunda aproximación a los cambios transcripcionales durante el desarrollo en el pez cebra es la descrita por Linney y colaboradores (LINNEY *et al.* 2004). En este estudio se utilizó una plataforma de microarrays con oligonucleótidos de 65 bases de longitud que corresponden a 15512 genes (ZebrafishOligoLibrary, Compugen). Con esta plataforma de oligos es posible eliminar posibles hibridaciones cruzadas entre genes de una misma familia y permite detectar variantes de *splicing* de un mismo gen. Las muestras analizadas son embriones en fases muy tempranas del desarrollo embrionario (las muestras se toman entre 8 y 24 hpf a intervalos de 2 h) que se corresponden con fases del desarrollo embrionario en que se está produciendo la segmentación. Los resultados se analizaron mediante identificación de *clusters* y se obtuvo variación en un total de 323 genes, de los cuales 150 aumentaba su expresión y 173 disminuía su expresión. La identificación de *clusters* de genes según niveles de expresión revela que son grupos de genes relacionados con funciones biológicas determinadas; por ejemplo, a partir de las 12 hpf se sobreexpresan muchos genes relacionados con la maquinaria de síntesis de proteínas. Un grupo de genes claramente regulado durante la segmentación es el relacionado con la miogénesis, en el que se observa una sobreexpresión de genes estructurales de músculo (actina, troponina o tropomiosina) y una disminución de la expresión de algunos factores de transcripción musculares. Los autores intentan un segundo análisis de los datos mediante Gene Ontology (GO), en el cual los genes se agrupan por función, pero el análisis es poco profundo y las asignaciones de función son demasiado genéricas y redundantes entre sí, lo que impide determinar qué procesos biológicos concretos se ponen en marcha o se paran en las primeras fases del desarrollo embrionario. Este problema se podría minimizar con una buena anotación de los genes de la librería de oligonucleótidos. Por otro lado, los datos indican que hasta las 20-24 hpf no empiezan a producirse cambios de expresión significativos por lo que las conclusiones que se pueden extraer de este estudio son más bien limitadas.

Más recientemente, Mathavan y colaboradores (MATHAVAN *et al.* 2005) han realizado un estudio utilizando la misma plataforma de oligonucleótidos que la utilizada por Ton y colaboradores (TON *et al.* 2002),



pero en la que se ha realizado una anotación más completa y se han eliminado los genes redundantes. El estudio a lo largo del desarrollo se realizó analizando el patrón de expresión génica en embriones a distintos tiempos después de la fertilización (3, 4.5, 6, 7.7, 9, 10.7, 12, 15, 24, 30 y 48 hpf) y se asignaron estadios de desarrollo a los distintos tiempos después de la fertilización (blástula hasta 4.5 hpf, gástrula hasta 9 hpf, segmentación hasta 24 hpf y faríngrula hasta 48 hpf). Un primer análisis indica que un importante número de transcritos son de origen materno y son degradados en distintos momentos del desarrollo pero nunca persisten más allá del estadio de gástrula (9 hpf) tal y como habían descrito Ton y colaboradores en el microarray de cDNA (TON *et al.* 2002). Un primer análisis mediante identificación de *clusters* permite discernir un patrón de expresión temporal muy claro para cada estadio del embrión. En la Figura 6 se aprecia claramente el patrón de expresión génica de cada una de las fases embrionarias estudiadas. Esta imagen es una buena ilustración de la utilidad de los microarrays para este tipo de estudios ya que podemos asociar grupos de genes a una determinada fase embrionaria y por tanto se pueden extraer genes o procesos que sean biomarcadores de una fase embrionaria concreta.

Para identificar funciones asociadas a cada fase del desarrollo se realizó también un análisis por GO del que se deduce que la maquinaria de degradación de proteínas por la vía del proteasoma no empieza a sobreexpresarse hasta el estadio gástrula y básicamente se mantiene hasta faríngrula. Otro grupo interesante son las ciclinas y sus proteínas reguladoras que tienen un patrón de expresión muy claro según la fase embrionaria y el tipo de ciclina. Acorde con los datos de Linney y colaboradores (LINNEY *et al.* 2004) se observa un incremento en la expresión de genes relacionados con la maquinaria de síntesis proteica a partir de las 12 hpf. Por último, cabe destacar que los niveles de expresión de los genes relacionados con la función muscular están claramente disminuidos y empiezan a sobreexpresarse a partir de las 24 hpf. Es un hecho interesante que los factores de transcripción relacionados con somitogénesis empiezan a expresarse antes que los genes específicos de músculo, lo que revela que los estudios mediante microarray pueden detectar cascadas de actividad génica implicadas en somitogénesis.


FIGURA 6.

Patrones de expresión génica asociados a las diferentes etapas del desarrollo embrionario. (A) Etapas del desarrollo embrionario: oocito no fertilizado, Blástula, Gástrula, Segmentación y Farínula. (B) Genes expresados diferencialmente y agrupados según el pico de expresión en una fase embrionaria concreta. (C) Cambios globales en expresión génica a cada uno de los estados de desarrollo (rojo, alta expresión; verde, baja expresión). Adaptado de MATHAVAN *et al.* PLoS Genet. 2005.

5.1.2. Medaka (*Oryzias latipes*)

En el año 2004, Kimura y colaboradores desarrollaron una plataforma dirigida a obtener librerías de ESTs para construir un microarray de oligonucleótidos (60 pb de longitud) con 8091 genes de medaka al que han denominado Medaka Microarray 8K (KIMURA *et al.* 2004). Con esta plataforma se ha estudiado el desarrollo embrionario del pez medaka en los estadios de segmentación (1.5 días después de la fertilización), cuando se ha formado el aparato circulatorio completo (5 días) y cuando todos los órganos están formados y empiezan a madurar (10 días). En este trabajo no se exploran demasiado en profundidad los cambios en el patrón de expresión génica y se centran más en validar la plataforma de microarray desarrollada. Algunos cambios descritos a nivel de segmenta-



ción coinciden con los anteriormente descritos en pez cebra. Se observa un incremento en la expresión de genes específicos de músculo como la miosina o la actina y una disminución en la expresión, desde la fase más temprana del desarrollo, de los transcritos correspondientes a catepsina D. Es de esperar que esta plataforma proporcione en un futuro datos relevantes en el estudio del desarrollo embrionario de medaka.

5.2. Transcriptómica del desarrollo en especies no modelo

Como hemos comentado anteriormente la creación de plataformas de microarrays en peces no modelo no está tan desarrollada, aunque existen algunos estudios en salmónidos que indican que veremos un crecimiento importante en la utilización de este tipo de aproximaciones experimentales para el estudio de la embriogénesis. En salmónidos existen actualmente dos plataformas principales de microarrays que han sido validadas: el microarray 16K GRASP (VON SCHALBURG *et al.* 2005) y el microarray 2K de Krasnov y colaboradores (KRASNOV *et al.* 2005), aunque sólo ésta última se ha utilizado para estudios de embriogénesis en trucha.

Concretamente, Krasnov y colaboradores han utilizado su plataforma de microarray de cDNA enriquecida con genes representativos del sistema immune (denominada «Immunochip») para describir cambios en expresión génica durante la embriogénesis (KRASNOV *et al.* 2007). El objetivo de este estudio era principalmente obtener datos sobre la formación y maduración del sistema inmunológico a lo largo del desarrollo embrionario. El Immunochip se ha construido con secuencias de cDNA seleccionadas según su anotación funcional y dando preferencia a genes implicados en defensa y respuesta inmune, respuesta a estrés y estímulos externos, apoptosis, chaperonas, hormonas, citoquinas, factores de transcripción y marcadores claves de vías metabólicas de músculo esquelético. Las muestras analizadas fueron, por un lado, embriones en estadios tardíos en los que ya se han formado los somitas y se ha vascularizado el embrión y, por otro lado, larvas de 0 a 5 semanas. Los datos se analizaron mediante GO y se observa que las categorías funcionales asignadas al sistema inmunitario experimentan cambios a lo largo del desarrollo (Figura 7).

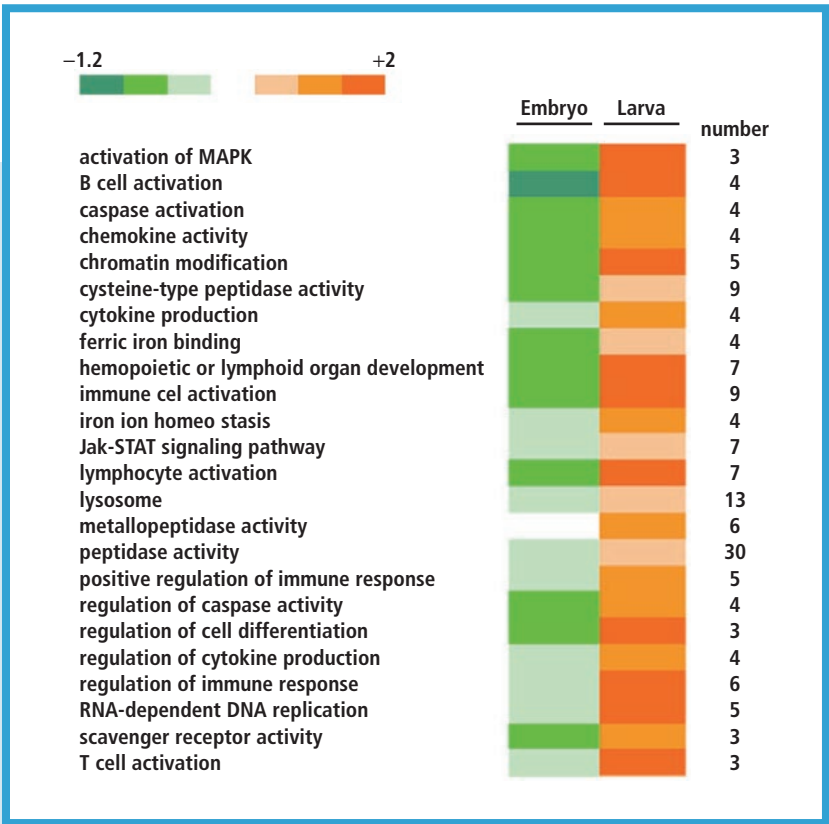


FIGURA 7.

Patrones de expresión génica del sistema inmune a lo largo del desarrollo embrionario. Categorías funcionales relacionadas con el sistema inmunitario que sufren cambios diferenciales dentro de la fase embrionaria y dentro de la fase larvaria. La sobreexpresión se indica en gradación de color naranja y la represión en gradación de color verde.

De los datos obtenidos se deduce que existe una sobreexpresión de categorías funcionales relacionadas con el sistema inmune hacia la segunda semana del estadio larvario que perdura hasta la quinta semana después de la eclosión. Cabe destacar que genes asignados a categorías funcionales relacionadas con el sistema inmune podrían ser asignados también a otras categorías funcionales. Este hecho suele ser común en el análisis por GO ya que un mismo gen puede intervenir en diversos pro-



cesos fisiológicos, lo que demuestra la complejidad de los sistemas biológicos y los problemas que suelen derivarse de cualquier simplificación. Entre las categorías funcionales relacionadas con el sistema inmune que sufren una sobreexpresión a lo largo del desarrollo cabe destacar la cascada de señalización NFκB (*nuclear factor kappa B*) y la respuesta humoral (el sistema de complemento, inhibidores de proteasas y metabolismo de nucleótidos y el sistema de interacción con antígenos).

En mero (*Hippoglossus hippoglossus*) se ha creado recientemente una librería de cDNA con muestras de embriones de 2 células (10 hpf), larvas (15 días pf) y músculo blanco de individuos juveniles (BAI *et al.* 2007). Se han obtenido 2124 genes putativos (798 de embriones, 719 de larvas y 607 de juveniles) de los cuales sólo 67 son comunes a los 3 estadios del desarrollo. A falta de un microarray de mero, la comparación de la abundancia relativa de determinados genes según la fase embrionaria, nos da algunas pistas sobre los cambios en el perfil de expresión génica. Así pues los autores observan que en fase de embrión (10 hpf) existe una gran abundancia de mRNAs de genes mitocondriales que probablemente provienen del oocito (35.6%) mientras que en fase de larva disminuye drásticamente su abundancia (8.9%) y en fase juvenil se incrementa de nuevo su expresión (25.9%). Otro dato a destacar es que en las fases de larva y juvenil los genes más abundantes corresponden a genes específicos de músculo como la miosina o la actina, aunque en el caso de los juveniles sería esperable puesto que la muestra inicial es el músculo blanco dorsal del individuo. Los autores intentan hacer un análisis por GO de la distribución de genes en cada fase del crecimiento pero, al igual que Linney y colaboradores, el análisis es superficial y las categorías funcionales obtenidas son demasiado genéricas para extraer conclusiones. Seguramente este hecho es debido, en parte, a problemas en la anotación de las secuencias obtenidas. A pesar de este hecho, el número de secuencias obtenidas será muy útil para el desarrollo de una plataforma de microarrays en mero.

6. APROXIMACIONES GENÓMICAS AL CRECIMIENTO MUSCULAR

La enorme complejidad del proceso de crecimiento muscular en peces, con los componentes de hiperplasia e hipertrofia de las fibras



musculares contribuyendo al crecimiento, puede ahora empezar a ser deshilada mediante la utilización de aproximaciones genómicas. Entre ellas, las aproximaciones transcriptómicas han sido las primeras en utilizarse, aunque desafortunadamente los estudios transcriptómicos del crecimiento muscular que se han realizado hasta el momento de escribir este capítulo son muy escasos y ninguno de ellos aborda modelos fisiológicos de crecimiento, como sería la comparación de distintas tasas de crecimiento o el análisis del crecimiento compensatorio.

6.1. Cambios transcripcionales en músculo esquelético

Uno de los primeros estudios realizados sobre el transcriptoma del tejido muscular en peces con altas tasas de crecimiento consistió en evaluar los efectos de la sobreexpresión por transgénesis del gen para la hormona del crecimiento (GH) en salmón (*Oncorhynchus kisutch*) (HILL *et al.* 2000). Mediante la utilización de la técnica de hibridación substractiva, al no haberse desarrollado aún plataformas de microarrays para salmónidos, se obtuvieron varios genes expresados diferencialmente en el músculo blanco comparando peces control y transgénicos para la GH. Paralelamente al aumento en la hiperplasia del músculo blanco en salmones transgénicos se observó un aumento en la expresión de genes implicados en la transcripción (ARN de transferencia, proteínas ribosomales), en la formación de las fibras musculares (cadena ligera de la miosina tipo 2) y en la ultraestructura del músculo esquelético (cadena pesada de la miosina, α -actina). Por lo tanto, este estudio demuestra que los peces transgénicos para la GH pueden ser utilizados como modelo de peces con una tasa de crecimiento elevada. Hasta el momento no se han realizado estudios utilizando microarrays para evaluar los cambios transcripcionales globales que tienen lugar en el músculo en respuesta a la sobreexpresión del gen de la GH.

Trabajos más recientes han abordado el estudio del crecimiento y diferenciación de las fibras musculares en peces a nivel molecular mediante una aproximación transcriptómica de los genes que se expresan en el músculo blanco durante la formación de miotubos. Concretamente, Fernandes y col. (2005) han investigado el transcriptoma del músculo esquelético de *Takifugu rubripes* asociado a la



formación de miotubos también mediante la técnica de hibridación substractiva comparando mRNA de peces de 180 gramos con el de peces de 3.4 Kg, en los que se aprecia un aumento tanto en el número como en el diámetro de las fibras musculares. A partir de la librería de substracción, se secuenciaron 1.152 clones, de los cuales 262 representaban secuencias únicas, supuestamente expresadas de manera diferencial entre los dos modelos de crecimiento. De las secuencias únicas, se seleccionaron 33 en base a su posible papel en la formación de los miotubos y, tras comprobar por PCR cuantitativa su expresión diferencial, se observó que únicamente dos clones mostraban realmente un aumento en su expresión: un clon correspondía a un gen que codifica para un sustrato de la caseína quinasa y el otro clon a un gen de identidad desconocida (FERNANDES *et al.* 2005). Así pues, los dos únicos estudios en transcriptómica realizados hasta el momento cuyo objetivo ha sido identificar genes cuya expresión varía en función del tipo de crecimiento en peces (FERNANDES *et al.* 2005; HILL *et al.* 2000) han aportado resultados muy pobres comparados incluso con los obtenidos por estudios clásicos de expresión de genes candidatos en músculo esquelético, ya sea por PCR cuantitativa o hibridación *in situ* (CHAUVIGNE *et al.* 2005; JOHANSEN y OVERTURF 2005, 2006). Este hecho está probablemente relacionado con la técnica utilizada (hibridación substractiva) pero también con un análisis muy limitado de las secuencias obtenidas por parte de los autores. Por tanto, los cambios transcripcionales y las redes de activación génica que tienen lugar durante el crecimiento muscular en peces, objetivo hoy en día factible gracias a la existencia de plataformas validadas de microarray, permanecen aún sin describirse.

Sorprendentemente, existe más información sobre los cambios transcripcionales que tienen lugar en el músculo esquelético en peces en respuesta a factores externos o incluso fisiológicos que en respuesta a las distintas modalidades de crecimiento. Se han realizado estudios sobre diversos procesos biológicos que afectan al músculo blanco y que, por tanto, son procesos que afectan directamente al crecimiento. Concretamente, se ha descrito mediante análisis de expresión génica por microarray los cambios transcripcionales en el músculo esquelético en peces frente a cambios en la temperatura ambiental (COSSINS *et al.*



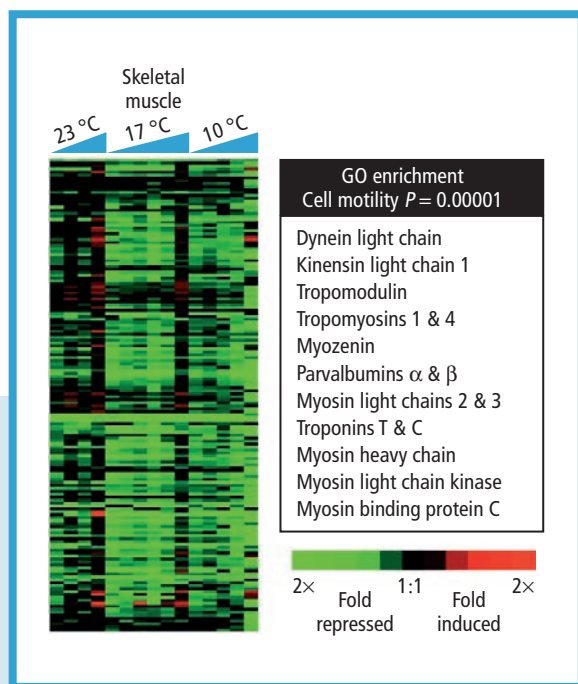
2006; MALEK *et al.* 2004), a la degradación muscular durante la vitelogénesis (SALEM *et al.* 2006), a la administración de vacunas de DNA (PURCELL *et al.* 2006) y a la administración de lipopolisacárido (LPS) bacteriano (ROHER *et al.* 2007), el cual mimetiza una infección bacteriana.

6.2. Respuesta a la temperatura ambiental

En el pez cebra, especie cuyo crecimiento es determinado, se ha estudiado los efectos transcripcionales de una disminución de la temperatura ambiental de 10 °C durante un año en el músculo esquelético utilizando un microarray basado en el Compugen Zebrafish Oligo-Library. El tratamiento térmico provocó un aumento de la expresión de genes implicados en el metabolismo mitocondrial, al igual que genes implicados en el estrés oxidativo y las heat shock proteins HSP70 y HSP90 en el músculo esquelético (MALEK *et al.* 2004). Sin embargo, no se ha establecido la relación entre estos cambios en expresión génica y el crecimiento por hipertrofia de las fibras musculares en el pez cebra. En carpa (*Cyprinus carpio*), la disminución de la temperatura también se ha descrito que provoca cambios importantes en el transcriptoma del músculo esquelético (COSSINS *et al.* 2006). En primer lugar, la disminución de la temperatura ambiental provoca en el músculo una disminución de la expresión de genes implicados en contractilidad de las fibras musculares (Figura 8). Por ejemplo, genes que codifican para componentes estructurales de las fibras (cadenas ligera y pesada de la miosina) u otros genes como la parvalbúmina, que juega un papel importante en la regulación de los niveles de calcio intracelulares, disminuyen su expresión con la temperatura. Se cree, pues, que uno de los efectos de la aclimatación a bajas temperaturas es una disminución de la expresión de genes implicados en el aparato contráctil del músculo (COSSINS *et al.* 2006). Por otro lado, hay genes cuya expresión aumenta con la disminución de la temperatura ambiental, como por ejemplo el gen TRIM63 y el gen FBXO32, que son genes implicados en la ubiquitinación y degradación de las proteínas musculares. Por lo tanto, la hipótesis que impera hoy día con respecto a los efectos transcripcionales de la aclimatación a bajas temperaturas es que la reducción de la actividad muscular, por un lado, acoplada con la degradación

FIGURA 8.

Cambios transcripcionales en el músculo esquelético de carpa (*Cyprinus carpio*) en respuesta a una disminución de la temperatura. Adaptado de COSSINS *et al.* J. Exp. Biol. 2006.



proteica, por otro lado, provoca la atrofia progresiva del músculo esquelético.

6.3. Respuesta a la degradación muscular durante la vitelogénesis

Precisamente en relación con el punto anterior, se ha realizado recientemente un trabajo muy completo de estudio de la atrofia muscular en la trucha arco iris por Salem y colaboradores (SALEM *et al.* 2006). En este trabajo los autores describen los cambios a nivel transcripcional que suceden en un modelo de atrofia muscular asociada al proceso de la vitelogénesis en trucha utilizando el microarray de cDNA de salmónidos de 16K GRASP (VON SCHALBURG *et al.* 2005). Identificaron 82 genes sobreexpresados y 120 reprimidos del total de 16000 genes del microarray. Esto supone que sólo un 1% de los genes del músculo blanco se expresan diferencialmente. Los resultados han sido analizados por GO y se han agrupado en 7 categorías funcionales: degrada-



ción de proteínas, proteínas del citoesqueleto, de la matriz extracelular o miofibrilares, biosíntesis proteica y procesamiento de RNA, respiración aeróbica y anaeróbica, factores de transcripción y transducción de señales, miscelánea y desconocidos. El análisis realizado por los autores es riguroso y detallado y permite una visión global de los cambios en el músculo atrófico en el cual se observan cuatro grandes tendencias. En primer lugar, se observa un aumento del recambio de las proteínas del citoesqueleto, matriz extracelular y miofibrilares. Así pues, observan una disminución de los niveles de transcritos de miosinas, α -actina, tropomiosina, troponina, colágenos, osteonectinas, tubulinas y pre-foldinas y, al mismo tiempo, un incremento en la expresión de genes que degradan estas proteínas (catepsinas, collagenasas y peptidasas). Este patrón es común a lo observado en modelos de mamífero a excepción del hecho que la vía de degradación por el proteasoma no está sobreexpresada en peces. Este aspecto ya había sido descrito en otros estudios en los que se postula que la vía proteosomal es de menor importancia en la degradación proteica en peces. En segundo lugar, se observa una supresión de todo el proceso de síntesis proteica desde transcripción de RNA hasta modificaciones post-traduccionales y localización intracelular. El incremento en renovación de las proteínas estimula la gluconeogénesis y consistente con este hecho observan una inducción de la glutamina sintetasa que podría ser utilizado como biomarcador para identificar degradación muscular. En tercer lugar, se observa una disminución de los enzimas glicolíticos. Este punto es una característica común de todas las formas de atrofia muscular. Finalmente, se observa una sobrerregulación de diversos genes implicados en cascadas de señalización que regulan el ciclo celular y la apoptosis (la más destacada la cascada GADD45/p53).

6.4. Respuesta a la administración de vacunas de DNA

El músculo esquelético es el lugar preferido para la administración de vacunas de DNA para inmunizar contra infección por patógenos, debido a su facilidad de acceso y a la elevada producción de los antígenos expresados. Desde el punto de vista del crecimiento, la expresión de altos niveles de antígenos puede provocar la activación



del sistema inmunitario y afectar al músculo esquelético y, por consiguiente, afectar el crecimiento. Recientemente, se han evaluado los cambios de expresión génica en el músculo blanco de trucha arco iris tras la inyección de una vacuna de DNA para el virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV), un importante patógeno vírico para los salmónidos (PURCELL *et al.* 2006). La vacunación por inyección provoca, en primer término, una activación de la expresión de genes implicados en la presentación de antígenos y en la respuesta a virus y patógenos intracelulares; es decir, una fuerte respuesta inmune en el músculo esquelético. En segundo término, se aprecia también un aumento en la expresión de genes marcadores de distintos tipos de leucocitos, lo que sugiere la infiltración de éstas células en el tejido muscular. Además de genes directamente relacionados con el sistema inmune, la administración de la vacuna de DNA provoca la sobreexpresión de enzimas proteolíticos, como catepsinas, de genes clásicos de respuesta al estrés (HSP70, HSP90, etc.) y, en relación más estrecha con el crecimiento, una disminución de la expresión de genes implicados en el metabolismo celular normal y la estructura muscular.

6.5. Respuesta a la administración de lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) es una glicoproteína de la pared de bacterias gram negativas que activa, a través del TollR4 (*Toll like receptor 4*), la respuesta inmunológica innata en mamíferos. El LPS ha sido extensamente usado para mimetizar una infección bacteriana de manera controlada y estudiar cómo se activa la respuesta inmune innata a nivel molecular. En mamíferos existen diversas patologías que conllevan un catabolismo excesivo y una pérdida de masa muscular. Infecciones crónicas o el cáncer pueden provocar un estado denominado caquexia en el que se observa una pérdida masiva de tejido muscular. En peces, hasta el momento, no existe información acerca de las consecuencias fisiológicas de una activación del sistema inmune sobre el crecimiento. Nuestro grupo de investigación actualmente está estudiando los efectos de la activación aguda del sistema inmunológico con LPS sobre el músculo esquelético (ROHER *et al.*, 2007). Este modelo de activación del sistema inmunitario por LPS ha sido validado tanto *in vitro* como *in*



vivo en trucha arco iris (MACKENZIE *et al.* 2006a; MACKENZIE *et al.* 2004; MACKENZIE *et al.* 2006b; MACKENZIE *et al.* 2003) y en dorada (RIBAS *et al.* 2004). En este trabajo se han analizado muestras de músculo blanco (WM) y músculo rojo (RM) de peces que han sido inyectados con LPS y se han muestreado a las 24 y 72 h post inyección. El RNA de músculo esquelético se ha hibridado con el Inmunochip (KRASNOV *et al.* 2007) y los cambios en expresión génica se han analizado por GO. En la Figura 9 se muestra el resultado del análisis por GO. En primer lugar destacaríamos las diferencias que existen entre los dos tipos musculares a nivel de expresión génica que probablemente obedecen a las propias características funcionales de cada músculo. En la Figura 9 se evidencia que los programas de expresión génica de ambos tipos de músculo son claramente diferentes. Así pues, vemos que en RM a las 72 h se produce una sobreexpresión de genes relacionados con la función mitocondrial mientras que en WM a las 72 h se sobreexpresan genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos. Estas categorías funcionales están íntimamente ligadas a las propias características del músculo, siendo el WM un músculo con un metabolismo basado principalmente en la glicólisis y el RM un músculo que basa su metabolismo en la respiración aeróbica localizada en las mitocondrias. Así pues, una infección bacteriana sería capaz de cambiar las funciones musculares básicas de forma muy clara.

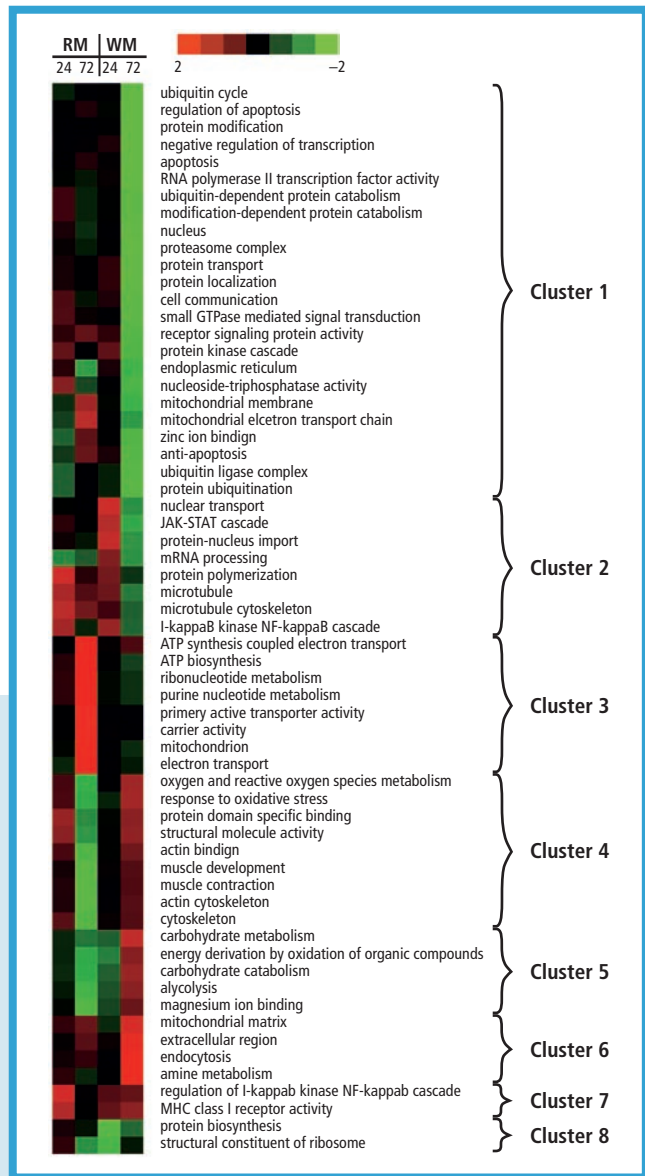
Agrupando las categorías funcionales según la dirección de los cambios en expresión génica apreciamos un grupo de categorías recogida en el *cluster* 4 (Figura 10) cuya expresión se ve afectada de forma muy distinta entre ambos tipos musculares, principalmente relacionadas con el desarrollo y funcionamiento del músculo. Concretamente, encontramos que a las 72 horas después de la administración de LPS, genes relacionados con la contractibilidad, desarrollo y citoesqueleto muscular están reprimidos en RM pero sobre regulados en el WM. Asimismo, observamos otro grupo de categorías relacionadas con el metabolismo oxidativo que muestran una expresión diferencial entre los dos tipos de músculo. Concretamente, también a las 72 horas se observa una marcada estimulación del metabolismo mitocondrial, transporte de electrones y síntesis de ATP en el RM, mientras lo contrario ocurre en el WM (Fig. 10). En conclusión, el análisis de expresión

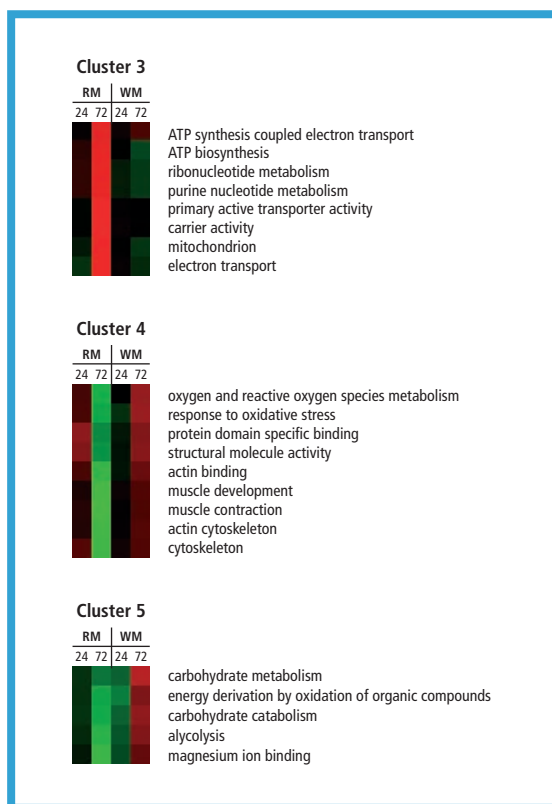


génica por microarray nos permite analizar los cambios globales en expresión génica y, una vez agrupados los genes por categorías funcionales, deducir la respuesta fisiológica a nivel molecular.

FIGURA 9.

Patrones de expresión génica del músculo esquelético de trucha en respuesta a LPS. (A) Clusters de genes expresados diferencialmente en WM (músculo blanco) y RM (Músculo rojo) a las 24 y 72 h de una inyección de LPS (lipopolisacárido). La sobreexpresión se indica en gradación de color rojo y la represión en gradación de color verde.




FIGURA 10.

Detalle del patrón de expresión génica del músculo esquelético de trucha en respuesta a LPS asociado a funciones moleculares básicas. Cluster 3: metabolismo mitocondrial; cluster 4: desarrollo y crecimiento muscular; cluster 5: metabolismo de carbohidratos.

7. APROXIMACIONES GENÓMICAS A LA FUNCIÓN HEPÁTICA

El hígado, en peces teleósteos, juega un papel clave en la nutrición y el metabolismo puesto que es un importante lugar de síntesis de reservas en forma de lípidos, carbohidratos y proteínas. El hígado también desempeña un papel esencial durante el ayuno, degradando las reservas energéticas acumuladas y liberándolas a la sangre para aportar nutrientes a los tejidos y contribuir al mantenimiento de la homeostasis. Debido a su importancia en la homeostasis del pez, no es sorprendente que sea una de las principales dianas de hormonas metabólicas tales como la insulina y el glucagón. Además, durante la



reproducción en hembras el hígado es el órgano productor de lipoproteínas, estimuladas por los esteroides ováricos, que serán incorporadas por el oocito en crecimiento y que formarán el vitelo. Asimismo, en el hígado se sintetizan, también en respuesta a esteroides ováricos, proteínas que formarán parte de la envoltura del oocito, como por ejemplo las proteínas de la zona pelúcida. Por lo tanto, la función hepática es un proceso de enorme importancia para garantizar un correcto desarrollo del embrión y es, por consiguiente, uno de los determinantes de la calidad de los oocitos. El hígado desempeña también un papel importante en el crecimiento, puesto que sintetiza y secreta, en respuesta a la acción de la hormona del crecimiento, el factor de crecimiento de tipo insulina I o IGF-I, que es un importante mediador de los efectos de la hormona del crecimiento sobre el crecimiento. Es precisamente debido al papel fisiológico central de este órgano y a la complejidad de su función y también de su regulación, que es aconsejable abordar su estudio mediante un enfoque genómico (transcriptómico y proteómico) para entender su funcionamiento y respuesta a variaciones fisiológicas o ambientales. En consecuencia, hasta la fecha hay varios estudios que han descrito la respuesta transcriptómica o proteómica del hígado en relación con la nutrición y el crecimiento en peces. Es precisamente en el estudio de la función hepática donde ha arrancado de manera formal la nutrigenómica en peces, tal como se indica a continuación.

7.1. Cambios transcripcionales en hígado en relación con la nutrición y el crecimiento

Muy recientemente, se ha descrito el transcriptoma del hígado en salmones transgénicos para la hormona del crecimiento, en los que se evidencia una tasa de crecimiento incrementada, y se ha comparado con el transcriptoma de peces no transgénicos con la finalidad de identificar genes o patrones de expresión génica que se correlacionen con un mayor crecimiento (Rise *et al.* 2006). A pesar de que el hígado tiene un importante papel metabólico que viene dado por la existencia de una batería de enzimas cuya actividad está regulada por hormonas (incluyendo la hormona del crecimiento), se detectó en este estudio un número muy reducido de enzimas metabólicos cuya expresión estaba



regulada por la sobreexpresión de la hormona del crecimiento. Entre los escasos enzimas cuya expresión está incrementada en los peces transgénicos para la hormona del crecimiento se encuentran la sintasa de las prostaglandinas o una desaturasa de los ácidos grasos. La escasa regulación transcripcional observada se debe muy probablemente a que la regulación de muchos enzimas metabólicos no es a nivel transcripcional sino post-transcripcional, ya sea a nivel traduccional o post-traduccional (por ejemplo, por fosforilación). Posiblemente uno de los cambios transcripcionales más evidentes en los peces transgénicos para la hormona del crecimiento es el aumento en la actividad mitocondrial (Rise *et al.* 2006). Esto puede ser debido a una mayor demanda energética en estos animales relacionada con una mayor tasa metabólica requerida por su mayor crecimiento. En este estudio se postula también que, en relación con la mayor tasa metabólica, existe una mayor necesidad de síntesis de hemoglobina puesto que se observa un aumento en la expresión hepática de los genes de la hemoglobina. La escasa información obtenida a nivel transcripcional sobre el papel del hígado en el crecimiento inducido por la sobreexpresión de la hormona del crecimiento sugiere la necesidad de abordar el estudio de la respuesta hepática a nivel proteómico.

Desde el punto de vista nutricional, se han analizado los cambios transcripcionales en el hígado en respuesta a la adaptación a dietas formuladas con aceites de origen vegetal. Concretamente, se ha estudiado la respuesta del hígado a nivel génico en salmón atlántico (*Salmo salar*) frente a dietas en las que el 75% del aceite es de origen vegetal (JORDAL *et al.* 2005) utilizando una plataforma de microarrays de cDNA construida con ESTs de salmón atlántico. Tras 42 semanas de adaptación a dietas con aceite vegetal, cuando se compara el transcriptoma hepático de animales adaptados a una dieta normal (con aceite de pez) con el transcriptoma de animales adaptados a una dieta rica en aceite vegetal, se observan cambios en la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico en hígado. Por un lado, se produce un aumento en la expresión de la desaturasa $\Delta 5$ de los ácidos grasos y una disminución en la expresión de la desaturasa $\Delta 9$ de los ácidos grasos. La expresión hepática de la sintetasa acetil CoA de cadena larga disminuye en peces adaptados a la dieta rica



en aceite vegetal. Asimismo, numerosos genes mitocondriales muestran un patrón de expresión reducido en hígado de peces adaptados a la dieta rica en aceite vegetal. Concretamente, la expresión de la carnitina palmitoiltransferasa de tipo II, al igual que de las proteínas de la membrana mitocondrial externa, está inhibida en respuesta a la dieta rica en aceite vegetal, lo cual indica una reducida capacidad para la β -oxidación en hígado. Así pues, a través de esta aproximación genómica se demuestra que existe una regulación diferencial de genes implicados en el metabolismo lipídico en el hígado del salmón atlántico en respuesta a variaciones en los ácidos grasos procedentes de la dieta.

7.2. Cambios en el proteoma hepático en relación con la nutrición y el crecimiento

Hasta la fecha se ha descrito el proteoma hepático y su regulación frente a dos condiciones distintas en la trucha arco iris. Por un lado, se ha descrito la respuesta hepática frente al ayuno (MARTIN *et al.* 2001) y, por otro lado, la respuesta hepática a la adaptación a dietas con sustitución de proteína animal por vegetal (MARTIN *et al.* 2003), utilizando en ambos casos el mismo tipo de análisis proteómico. Este método consiste en la extracción de las proteínas hepáticas seguida por su separación mediante una electroforesis bidimensional de alta definición, separando por carga (punto isoelectrico) en la primera dimensión y por peso molecular en la segunda dimensión. Esta separación permite identificar en un extracto de hígado aproximadamente 800 spots, que no todos necesariamente representan proteínas hepáticas distintas ya que algunos pueden representar modificaciones post-traduccionales. Comparando los patrones de expresión de proteínas o mapas peptídicos de dos muestras distintas, se detectan los spots diferentes y se extraen del gel para su identificación por su patrón de digestión con tripsina y comparación con bases de datos públicas. En respuesta al ayuno, se identificaron 24 proteínas expresadas diferencialmente en hígado, lo que representa un 3.6% de los spots proteicos detectados (MARTIN *et al.* 2001). De éstas, 8 estaban más expresadas en hígado de peces alimentados y 16 estaban más expresadas en hígado de peces ayunados. Entre las proteínas expresadas en mayor nivel en hígado de



peces ayunados se encontraron los enzimas 2-fosfoglicerato deshidrogenasa y la citocromo c oxidasa deshidrogenasa, que probablemente aumentan en respuesta a los mayores requerimientos energéticos durante el ayuno. También incrementó en hígado de peces ayunados la catepsina D, una peptidasa que puede estar implicada en la degradación proteica que tiene lugar durante el ayuno.

Utilizando la misma caracterización proteómica, Martin y colaboradores (03) (MARTIN *et al.* 2003) describieron cambios en el proteoma hepático en trucha arcoiris en respuesta a dietas con distintas proporciones de ingredientes vegetales. El objetivo de éste estudio fue evaluar los efectos de la soja de la dieta sobre los procesos bioquímicos que tienen lugar en el hígado como resultado de la alteración del metabolismo debido a la dieta. Basándose en el interés existente en encontrar alternativas vegetales a la proteína animal, en este estudio se observó que peces adaptados a una dieta rica en soja presentaban un mayor catabolismo proteico, con una mayor renovación proteica y una mayor tasa de degradación de las proteínas. El análisis proteómico realizado, comparando peces adaptados a una dieta basada en extrusionados vegetales (trigo y guisante) y peces adaptados a una dieta basada en soja, detectó 332 proteínas diferencialmente expresadas en los mapas peptídicos formados por aproximadamente 800 proteínas hepáticas. De éstas, 20 eran más abundantes en peces adaptados a la dieta con extrusionados de trigo y guisante, mientras que 13 proteínas eran más abundantes en peces adaptados a la dieta con soja. En respuesta a la dieta de soja, se identificó una disminución en queratina II y beta-tubulina, lo cual evidencia una disminución de la síntesis de proteínas estructurales. También se observó una disminución de las «heat shock proteins» HSP70 y HSP78, las cuales están ligadas a un aumento de la renovación proteica. Asimismo, las actividades de los enzimas glutamato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa, implicados en la utilización de aminoácidos y en la degradación proteica, estaban incrementadas en el hígado de peces adaptados a la dieta con soja. Finalmente, varios enzimas involucrados en el metabolismo anabólico estaban incrementados también en el hígado de peces adaptados a la dieta con soja, lo que sugiere que como resultado a la ingesta de una dieta rica en soja hay una mayor predominancia de procesos catabólicos.



cos que anabólicos en estos animales (MARTIN *et al.* 2003). Por lo tanto, resulta evidente que una aproximación proteómica proporciona información extremadamente útil para evaluar los efectos de determinados componentes dietarios sobre la fisiología del animal.

8. APLICABILIDAD DE LOS ESTUDIOS GENÓMICOS SOBRE EL CRECIMIENTO, DESARROLLO Y NUTRICIÓN EN ACUICULTURA

Desde el punto de vista de la ciencia básica, es evidente que las aproximaciones genómicas aportan gran cantidad de información sobre todos aquellos procesos fisiológicos implicados en el crecimiento, tales como el desarrollo larvario, la alimentación y nutrición y el crecimiento muscular. Ya hemos descrito con anterioridad la posibilidad de trazar rutas funcionales y metabólicas durante el desarrollo larvario, la alimentación y el crecimiento muscular a través de las plataformas biotecnológicas descritas. Esto nos está permitiendo alcanzar un conocimiento no igualado hasta el momento en profundidad de dichos procesos fisiológicos.

Para la acuicultura, posiblemente la aplicación más importante hoy día de las aproximaciones genómicas descritas reside en el desarrollo de herramientas de diagnóstico del estado de crecimiento, desarrollo y capacidad nutritiva. Estas herramientas pueden consistir en plataformas de microarrays que permitan detectar cambios en grupos de genes o categorías funcionales de genes que sirvan como marcadores moleculares del estado del animal. Concretamente, pueden desarrollarse marcadores para detectar la aparición, por ejemplo, de alteraciones metabólicas no deseadas (por ejemplo, un incremento del acúmulo de lípidos en el tejido adiposo, etc.), de la aparición de respuestas locales al estrés o a procesos de infección con anterioridad a su manifestación externa, del grado de crecimiento muscular o de la condición nutricional. Aparte del papel de dichas aproximaciones genómicas como herramientas de diagnóstico de una población de peces bajo condiciones de explotación, también tienen un papel importante en el desarrollo industrial en acuicultura. Concretamente,



el diseño, desarrollo, validación e, incluso comercialización, de las plataformas transcriptómicas o proteómicas puede ser un área de interés para compañías biotecnológicas. Estas plataformas serán además cruciales para la optimización de dietas en acuicultura o el desarrollo de eficaces vacunas para el tratamiento contra enfermedades infecciosas. De hecho, las aproximaciones genómicas sin duda potenciarán la efectividad industrial, ya sea en cuanto a optimización del crecimiento de poblaciones de peces en cautividad, como en cuanto al desarrollo de dietas y vacunas que favorecerán el crecimiento.

9. DIRECCIONES FUTURAS

Desde el punto de vista del estudio del crecimiento para su optimización, es necesario el desarrollo de plataformas tecnológicas especializadas para el estudio de este proceso. Concretamente, en cuanto a la fisiología muscular, es preciso crear bases de secuencias expresadas (ESTs) en músculo esquelético, tanto blanco como rojo, que servirán para identificar genes o grupos de genes expresados en dichos tejidos y cuya secuencia sea incorporada en plataformas de microarrays, ya sea de cDNAs o de oligos. El desarrollo de un microarray específico para músculo sería de gran utilidad para el estudio del transcriptoma muscular y su regulación durante el crecimiento. Esta misma estrategia sería aconsejable aplicarla a otros tejidos importantes desde el punto de vista del crecimiento y aprovechamiento y almacenamiento de nutrientes como, por ejemplo, el intestino y el tejido adiposo. Actualmente existen proyectos en marcha en los que se han construido librerías de cDNA de estos tejidos en especies marinas, incluyendo la dorada y la lubina. Desgraciadamente, existe hoy día un gran número de secuencias que no han sido depositadas en las bases de datos públicas y que, por tanto, no son accesibles.

En un futuro deben promoverse las aproximaciones proteómicas para describir los cambios a nivel proteico en respuesta a variaciones en el crecimiento, componentes dietarios, etc. Este enfoque es particularmente importante debido al tipo de regulación post-transcripcional de muchos enzimas metabólicos. El futuro desarrollo y aplicabilidad de arrays de proteínas o, yendo algo más lejos, de arrays



de proteínas quinasa o enzimáticos, será fundamental para avanzar en la descripción global de los cambios a nivel proteico que tienen lugar durante el crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- BAI, J., C. SOLBERG, J. M. FERNANDES y I. A. JOHNSTON, 2007 Profiling of maternal and developmental-stage specific mRNA transcripts in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Gene* **386**: 202-210.
- BONE, Q., 1978 Locomotor muscle, pp. 361-424 in *Fish Physiology*, edited by W. S. HOAR, RANDALL, D.J. Academic Press, New York.
- BRETT, J. R., 1979 Environmental factors and growth, pp. 599-677 in *Fish Physiology*, edited by W. S. HOAR, RANDALL, D. J., BRETT, J. R. Academic Press, New York.
- BUCKINGHAM, M., L. BAJARD, T. CHANG, P. DAUBAS, J. HADCHOUEL *et al.*, 2003 The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* **202**: 59-68.
- COSSINS, A., J. FRASER, M. HUGHES y A. GRACEY, 2006 Post-genomic approaches to understanding the mechanisms of environmentally induced phenotypic plasticity. *J. Exp. Biol.* **209**: 2328-2336.
- CHAUVIGNE, F., C. CAUTY, C. RALLIERE y P. Y. RESCAN, 2005 Muscle fiber differentiation in fish embryos as shown by in situ hybridization of a large repertoire of muscle-specific transcripts. *Dev. Dyn.* **233**: 659-666.
- FERNANDES, J. M., M. G. MACKENZIE, G. ELGAR, Y. SUZUKI, S. WATABE *et al.*, 2005 A genomic approach to reveal novel genes associated with myotube formation in the model teleost, Takifugu rubripes. *Physiol. Genomics* **22**: 327-338.
- HILL, J. A., A. KIESSLING y R. H. DEVLIN, 2000 Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for a growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**: 939-950.
- JOHANSEN, K. A., y K. OVERTURF, 2005 Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* **7**: 576-587.
- JOHANSEN, K. A., y K. OVERTURF, 2006 Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **144**: 119-127.



- JOHNSTON, I. A., 1999 Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* **177**: 99-115.
- JOHNSTON, I. A., M. ABERCROMBY, V. L. VIEIRA, R. J. SIGURSTEINDOTTIR, B. K. KRISTJANSSON *et al.*, 2004 Rapid evolution of muscle fibre number in post-glacial populations of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *J. Exp. Biol.* **207**: 4343-4360.
- JORDAL, A. E., B. E. TORSTENSEN, S. TSOI, D. R. TOCHER, S. P. LALL *et al.*, 2005 Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Nutr.* **135**: 2355-2361.
- KIMURA, T., T. JINDO, T. NARITA, K. NARUSE, D. KOBAYASHI *et al.*, 2004 Large-scale isolation of ESTs from medaka embryos and its application to medaka developmental genetics. *Mech. Dev.* **121**: 915-932.
- KRASNOV, A., H. KOSKINEN, P. PEHKONEN, C. E. REXROAD, 3RD, S. AFANASYEV *et al.*, 2005 Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress. *BMC Genomics* **6**: 3.
- KRASNOV, A., S. MACKENZIE and J. V. PLANAS, 2007 Transcriptional profiling of rainbow trout early development. In preparation.
- LINNEY, E., B. DOBBS-MCAULIFFE, H. SAJADI y R. L. MALEK, 2004 Microarray gene expression profiling during the segmentation phase of zebrafish development. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **138**: 351-362.
- MACKENZIE, S., D. ILIEV, C. LIARTE, H. KOSKINEN, J. V. PLANAS *et al.*, 2006a Transcriptional analysis of LPS-stimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol. *Mol. Immunol.* **43**: 1340-1348.
- MACKENZIE, S., C. Q. LIARTE, D. B. ILIEV, J. V. PLANAS, L. TORT *et al.*, 2004 Identification and characterization of a highly inducible novel CC chemokine from differentiated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Immunogenetics* **56**: 611-615.
- MACKENZIE, S., N. MONTERRAT, M. MAS, L. ACERETE, L. TORT *et al.*, 2006b Bacterial lipopolysaccharide induces apoptosis in the trout ovary. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **4**: 46.
- MACKENZIE, S., J. V. PLANAS y F. W. GOETZ, 2003 LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 393-400.
- MALEK, R. L., H. SAJADI, J. ABRAHAM, M. A. GRUNDY y G. S. GERHARD, 2004 The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **138**: 363-373.



- MARTIN, S. A., P. CASH, S. BLANEY y D. F. HOULIHAN, 2001 Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation. *Fish Physiol. Biochem.* **24**: 259-270.
- MARTIN, S. A., O. VILHELMSSON, F. MEDALE, P. WATT, S. KAUSHIK *et al.*, 2003 Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. *Biochim. Biophys. Acta* **1651**: 17-29.
- MATHAVAN, S., S. G. LEE, A. MAK, L. D. MILLER, K. R. MURTHY *et al.*, 2005 Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. *PLoS Genet* **1**: 260-276.
- MOMMSEN, T. P., 2001 Paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **129**: 207-219.
- MUTCH, D. M., W. WAHLI y G. WILLIAMSON, 2005 Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *Faseb J.* **19**: 1602-1616.
- PURCELL, M. K., K. M. NICHOLS, J. R. WINTON, G. KURATH, G. H. THORGAARD *et al.*, 2006 Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Immunol.* **43**: 2089-2106.
- RESCAN, P. Y., 2005 Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny. *Gen. Comp. Endocrinol.* **142**: 111-116.
- RIBAS, L., J. V. PLANAS, B. BARTON, C. MONETTI, G. BERNADINI *et al.*, 2004 A differentially expressed enolase gene isolated from the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under high-density conditions is up-regulated in brain after in vivo lipopolysaccharide challenge. *Aquaculture* **241**: 195-206.
- RISE, M. L., S. E. DOUGLAS, D. SAKHRANI, J. WILLIAMS, K. V. EWART *et al.*, 2006 Multiple microarray platforms utilized for hepatic gene expression profiling of GH transgenic coho salmon with and without ration restriction. *J. Mol. Endocrinol.* **37**: 259-282.
- ROHER, N., A. KRASNOV, S. MACKENZIE y J. V. PLANAS, 2007 Metabolic and immune changes in skeletal muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after LPS challenge: a transcriptomic and proteomic approach. In preparation.
- SALEM, M., P. B. KENNEY, C. E. REXROAD, 3RD y J. YAO, 2006 Microarray gene expression analysis in atrophying rainbow trout muscle: a unique nonmammalian muscle degradation model. *Physiol. Genomics* **28**: 33-45.
- TON, C., D. STAMATIOU, V. J. DZAU y C. C. LIEW, 2002 Construction of a zebrafish cDNA microarray: gene expression profiling of the zebrafish during development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**: 1134-1142.
- VAN OMMEN, B., y R. STIERUM, 2002 Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 517-521.



- VON SCHALBURG, K. R., M. L. RISE, G. A. COOPER, G. D. BROWN, A. R. GIBBS *et al.*, 2005 Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray. *BMC Genomics* **6**: 126.
- WEATHERLEY, A. H., y H. GILL, 1982 Influence of bovine growth hormone on the growth dynamics of mosaic muscle in relation to somatic growth of rainbow trout, *O. mykiss*. *J. Fish Biol.* **20**: 165-172.

15

GENÓMICA FUNCIONAL E INMUNOLOGÍA



GENÓMICA FUNCIONAL E INMUNOLOGÍA

J. C. Balasch

Universitat Autònoma de Barcelona

N. Roher

Universitat Autònoma de Barcelona

L. Ribas

Universitat Autònoma de Barcelona

V. Mulero

Universidad de Murcia

L. Tort

Universitat Autònoma de Barcelona
Xarxa de Referència en Aqüicultura de Catalunya

S. Mackenzie

Universitat Autònoma de Barcelona
Xarxa de Referència en Aqüicultura de Catalunya

Resumen

La complejidad de la arquitectura funcional inmunológica exige, en la era postgenómica, un tratamiento consistente de la semántica y la sintaxis formal de la ingente carga informativa derivada de la experimentación conjunta, funcional y computacional, de las redes de transcripción, activación y regulación de la respuesta inmunitaria organizada. El análisis de los perfiles de regulación y coexpresión



transcriptómicos, insertos en las redes de influencia genética de la respuesta inmunitaria, necesita de modelos experimentales cuyo descifrado genómico corra parejo al filogenético en el seno de un modelo conceptual panespecífico de la disfunción y regulación inmunitarias, aún por definir y del que se sugieren aquí unas pautas de construcción. La prognosis y evaluación patológica de las especies de vertebrados e invertebrados cultivados en la acuicultura convencional se ha beneficiado de la investigación genómica en especies modelo de escasa relevancia económica (*Danio rerio*, *Strongylocentrotus purpuratus*) escogidas por su facilidad de cría y manipulación en condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, la aplicación de su descripción inmunómica a las especies de teleósteos, crustáceos y moluscos de cultivo habitual, aunque válida, se muestra incompleta debido a la idiosincrasia, vital y adaptativa propia de cada especie y al grado de completitud de los proyectos de secuenciación genómica asociados. Se sugiere, por tanto, la inclusión de la perspectiva filogenómica en los estudios inmunitarios al uso basados en la infección experimental controlada y/o maduración de linajes y organografía linfoides de las especies acuícolas cultivadas. El programa de investigación en acuicultura debe considerar, asimismo, el panorama emergente de la nueva inmunología, que diferencia los mecanismos combinatorios basados en la expresión de genes RAG y la comunicación celular mediada por factores de reconocimiento histocompatibles (MHC) típicos de gnatostomados, de mecanismos alternativos, propios de vertebrados basales e invertebrados, para la generación y multiplicación de receptores capaces de reconocer la extensa diversidad antigénica.

Abstract

The complexity of the functional immune architecture in the postgenomic era, involves a consistent treatment of the semantics and formal syntax for the increasing amounts of information. Such information results mainly from the joint research, both functional and computational, of the transcription, activation and regulatory networks related to the organised immune response. The analysis of the regulation and transcriptomic coexpression profiles, included in the networks of the genetic influence in the immune



response, does need specific experimental models. These models should include both genomic and filogenetic discovery into a panspecific model of immune dysfunction and regulation, still uncompleted, and from which some construction clues are suggested. The prognosis and pathological evaluation of the vertebrate and invertebrate species used in conventional aquaculture has benefited from the genomic research on species of limited economic relevance (*Danio rerio*, *Strongylocentrotus purpuratus*) but that have been chosen because of their advantages in reproduction and husbandry in the laboratory. However, the application of their immunomic description to the currently aquacultured fish, crustaceans and molluscs, although valid, appears incomplete due to vital conditions of each species and the degree of completion of the associated genomic sequentiation projects. Therefore, the inclusion of the filogenetic perspective in the immune studies is suggested, based on the research on controlled experimental infections and/or in studies on organography and lymphoid lineages and their maturation process in aquaculture species. A research program in aquaculture should also include the emerging data in the latest immunological advances that identifies the combinatory mechanisms based on the RAG gene expression, and also the cell communication mechanisms mediated by histocompatible recognition factors (MHC) which are typical in gnathostomes, together with alternative mechanisms currently found in lower vertebrates and invertebrates. All these mechanisms are involved in the generation and multiplication of receptors that are able to recognise the extensive antigenic diversity.

1. INMUNOLOGÍA FUNCIONAL EN LA ERA GENÓMICA

La incertidumbre de Shannon y las reglas del juego

Lejos de considerar el genoma como una caja negra de interacciones, la aproximación holística actual, fruto del maridaje entre las ciencias de la vida y la computación, aborda el estudio combinado de la causalidad próxima (genética-fenotípica) y última (evolutiva) de la fisiología sistémica, a costa de una artificiosa compartimentalización de módulos funcionales (v.g. transcriptoma, proteoma, inmunoma) producto de las limitaciones en el tratamiento conceptual (biológico)



y práctico (cuantía y calidad de los datos obtenidos) de la información experimental (IHGSC 2004). Prueba de ello es la aplicabilidad del índice de entropía de Shannon, ampliamente utilizado en el análisis de proteínas y secuencias nucleotídicas (CHANG *et al.* 2005; SCHUG *et al.* 2005), al ámbito de la genómica comparada. La reducción de la incertidumbre asociada a todo intercambio informativo entre los componentes de un sistema resulta especialmente problemática en el caso de la respuesta inmunitaria, proclive a definirse como una ley de los grandes números tanto por el número de componentes celulares y humorales implicados como por la complejidad de su activación jerárquica frente al repertorio de determinantes antigénicos: de los 3 Giga-bytes de información que el genoma humano alberga a una densidad aproximada de 10^{21} bit/cm³, no menos del 10% regulan una respuesta inmunitaria que dedica un promedio de 10^{12} fenotipos celulares la tarea de reconocer, gracias a los procesos complementarios de tolerancia inmunológica y selección clonal, un universo potencial de más de 10^{15} antígenos. El análisis reciente de más de 20 poblaciones celulares inmunitarias humanas del proyecto conjunto IRIS Genetech-Joslin ImmGen (ABBAS *et al.* 2005) subraya una «preferencia» para expresarse en células inmunitarias del 8.8% de los 19.054 genes estudiados, aunque del 67% de genes expresados en las diversas poblaciones celulares, únicamente el 9.5% son exclusivos de un único tipo celular. Incluso subestimándolos, estos y otros resultados sugieren que los perfiles de expresión genética inmunitaria carecen a menudo de una especificidad funcional definida, incluyen un considerable solapamiento funcional, originan comportamientos fenotípicos sumamente plásticos y describen un paisaje transcriptómico caracterizado por **(a)** una actividad generalizada de amplio espectro y escasa especificidad que confía en la *regulación local*, ya sea *extrínseca*, mediante redes celulares de comunicación causales o *intrínseca*, debida a eventos aleatorios de activación genética característicos de los niveles de ARNm (RAJ *et al.* 2006), y **(b)** una diferenciación celular altamente específica (v.g. utilizando la nomenclatura CD al uso, en modo alguno específica de un único tipo celular) producto de una *minoría de perfiles transcriptómicos* especializados (HYATT *et al.* 2006). La arquitectura funcional inmunitaria se debe, por tanto, a un programa de investigación inmu-



nómico que evalúe la evolución, escalabilidad y dimensionalidad de las redes transcripcionales y reguladoras de la dinámica inmunitaria considerando diversos requerimientos (ALLISON *et al.* 2006; KHATRI y DRAGHICI 2005; YANG y SPEED 2002):

- 1) *Elección del modelo experimental en función de su posición e importancia filogenética.* Las consideraciones de índole práctica (facilidad de cría y manipulación en condiciones controladas) y económica (importancia comercial de la especie), aunque de extrema importancia y a menudo motor de la experimentación básica, carecen del enfoque filogenómico que requiere un sistema complejo de regulación homeostática.
- 2) *Descifrado de la información contenida en el genoma desde una perspectiva comparada,* evaluando semejanzas interespecíficas de la interacción genotipo-fenotipo (local y poblacional) que definan patrones comunes de respuesta inmunitaria.
- 3) *Desarrollo de herramientas de integración, visualización y exploración de datos complejos,* que permitan abordar los problemas de *dimensionalidad* (multiplicidad de datos de diferente contenido informativo) y *escalabilidad* (multiplicidad de datos en diferentes escalas temporales y espaciales) del análisis genómico, para la integración coherente de diferentes resultados experimentales derivados de metodologías diversas. Deben consolidarse las bases de datos que garanticen la descripción contextual de datos multidimensionales complejos (metadatos) en función de su *semántica* o significado (ontologías) y su *sintáctica* o expresión formal (estandarización) para su volcado e interpretación común.
- 4) *Descripción de las redes reguladoras y la coexpresión de grupos de genes implicados en la respuesta inmunitaria* mediante el análisis jerárquico de identidades transcriptómicas a nivel molecular (proteómica) y sistémico (e.g. estados patológicos vs. normales).
- 5) *Elaboración de un modelo conceptual teórico de la función inmunitaria* que aúne las definiciones operativas clásicas (teorías celular y humoral, tolerancia inmunológica, selección clonal, recombinación somática, modelos Th1/2/17 y Treg, regulación

citoplasmática vs. sistémica) con el trasfondo evolutivo (origen, diversificación y diversidad filogenética de la respuesta inmunitaria, universalidad y adaptación de los receptores Toll, NOD y TREM) y funcional (promiscuidad e integración reguladora del sistema inmunitario con la respuesta endocrina y nerviosa). El estudio de la inmunidad en los diversos phyla animales desde el punto de vista práctico (invertebrados vs. vertebrados) y factual (protóstomos vs. deuteróstomos) exige a su vez: **(a)** una definición precisa de los componentes de la respuesta inmunitaria (complejidad del sistema) y la significación evolutiva de cada tipo de respuesta (causalidad del sistema), y **(b)** la integración en un continuo coherente de la imprecisa separación entre inmunidad innata o germinal y adaptativa o específica.

- 6) *Integración cohesiva de las expectativas teóricas (5) y metodológicas (3) y (4)* para desarrollar el análisis computacional y estadístico de los mapas de redes estáticas de expresión genética, para *dinamizar* las redes genéticas relacionales a distintas escalas fisiológicas, y *reducir* la dimensionalidad informativa de los modelos, identificando los principios subyacentes de los modelos conceptuales teóricos.

Lamentablemente, los costes metodológicos e infraestructurales de la secuenciación genómica restringe su aplicación a un selecto número de especies (Liolios *et al.* 2006) escogidas por su interés clínico (e.g. *Mus*, *Rattus*, *Canis*, *Anopheles*, numerosos microorganismos, patógenos, parásitos o simbioses), parentesco antropocéntrico (*Pan*), adecuación al laboratorio (e.g. *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Tribolium*, *Apis*, *Danio*) e interés comercial (véase la Tabla 1).

2. FILOGENÓMICA DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN ACUICULTURA: INTENSIDAD TRANSCRIPCIONAL

Más de cien años separan la descripción naturalista de la teoría celular de la inmunidad formulada por Ilya Metchnikoff (1891) a partir de larvas del asteroideo *Bipinnaria* de la secuenciación completa del genoma de un pariente cercano, el equinoideo *Strongylocentrotus*



purpuratus (SODERGREN *et al.* 2006), un habitual de la maricultura mundial y componente clave en la ecología marina subtidal. La utilidad como especie modelo de un deuteróstomo basal como el descrito radica no sólo en su privilegiada posición filogenética como invertebrado *rara avis* emparentado embriológicamente con los vertebrados, sino también por su particular ecofisiología. Algunas características de su ciclo vital (bifasia íntegramente acuática, longevidad y relaciones simbióticas) le asemejan a otros invertebrados acuáticos emparentados con el linaje vertebrado cuyo inmunoma se ha investigado parcialmente, como los urocordados coloniales *Botryllus schlosseri* y *Ciona intestinalis* y el cefalocordado *Branchiostoma floridae*. El concepto de «invertebrado», no obstante, se utiliza aquí y en general de manera imprecisa para definir un trazado complejo de trayectorias evolutivas dispares seguidas por la práctica totalidad de los poco más de 30 phyla descritos, obedeciendo a un tempo paleogenómico exclusivo de cada grupo de organismos. La tan a menudo convulsa redefinición filogenética de los grandes phyla no excluye, sin embargo, lugares comunes imprescindibles para una correcta definición inmunitaria:

- 1) todos los grandes linajes animales (Protostomos, Deuterostomos, Ecdysozoos y Lophotrochozoos) incluyen una mayoría de grupos cuyo desarrollo se produce total o parcialmente en un medio acuático con elevada carga bacteriana (CULLEY *et al.* 2003) y condiciones micro y macrobióticas altamente variables.
- 2) El ciclo vital de la mayoría de los invertebrados acuáticos incluye complejas relaciones simbióticas, parasitarias y otras variantes de comensalismo trófico, formas coloniales o solitarias, libres o sésiles, pelágicas o bentónicas y ciclos multifásicos en los que el defensoma madura o se modifica a lo largo de la ontogenia. Aunque los casos de quimerismo o mosaicismo son más comunes en especies coloniales, la reactividad a los aloinjertos es un fenómeno generalizado incluso en grupos, como los hidroides, que carecen de un sistema de comunicación defensiva estructurado (CADAVID 2004).
- 3) La inmunidad de los grupos de invertebrados acuáticos estudiados se define por **(a)** mecanismos *innatos* (inespecíficos) de reconocimiento antigénico de amplio espectro comunes a todos



los linajes animales, **(b)** un extenso repertorio de mecanismos combinatorios *específicos* dirigidos a aumentar la variación de los receptores encargados de detectar patrones moleculares ajenos al organismo y **(c)** la presencia de componentes activadores, inhibidores y reguladores homólogos a los presentes en la inmunidad adaptativa de los vertebrados (IWANAGA y LEE 2005; LITMAN *et al.* 2005).

- 4) Los vertebrados gnatostomados mantienen un inmunoma común cuya unidad funcional mínima incluye mecanismos de reconocimiento antigénico basados en la diversidad de receptores celulares (TCR, BCR), y humorales (superfamilia Ig), constructos de presentación antigénica (MHC-I/II) y la batería genética (genes RAG1/RAG2 y AID) asociada a la recombinación de los segmentos génicos variables (V), diversos (D) y de unión (J) de los receptores de unión al antígeno en los receptores TCR y BCR. Las principales diferencias filogenéticas entre las distintas aproximaciones a la inmunidad de los vertebrados radican en: **(a)** la estructuración genómica de los componentes y **(b)** la presencia y grado de compartimentalización/especialización de los órganos primarios y secundarios implicados en la maduración, diferenciación y proliferación de la respuesta celular (PASQUIER 2006; ZAPATA *et al.* 2006).
- 5) Los vertebrados basales agnatos (lampreas y mixines) comparten la mayoría de los factores de transcripción y transducción de la información inmunitaria involucrados en el desarrollo fenotípico de los linajes celulares descritos (entre otros, IKAROS, GATA, BACH2, vías de señalización NF-kB y STAT, factores de comunicación IL-8, IL-17). Aunque carecen del mecanismo recombinatorio gnatostomado descrito en (4), utilizan un mecanismo alternativo para la generación de diversidad inmunitaria basado en el ensamblaje combinatorio de módulos genéticos ricos en leucinas (LRR) capaces de diversificar el repertorio de receptores linfocitarios (VLR) e igualar la potencial de reconocimiento antigénico de la inmunidad adaptativa presente en el resto de vertebrados.

La infructuosa búsqueda de la fuente de diversidad inmunitaria típica de gnatostomados en la lamprea desarrollada a lo largo de los



últimos decenios, y la feliz resolución alternativa derivada de su minado genómico ejemplifica no sólo la potencia del análisis inmunómico comparado, sino también su utilidad como herramienta de diagnóstico y tratamiento efectivo de patologías. Es recomendable, por tanto, el abandono de la dicotomía germinal (innatismo defensivo) vs. somática (adaptabilidad recombinatorial) en los estudios inmunitarios, en favor de una visión jerárquica e integrada de los mecanismos *convencionales* y *alternativos* de reconocimiento antigénico que tenga en cuenta la diversidad, en sentido funcional y comparado, de la respuesta inmunitaria a lo largo de la filogenia, especialmente en aquellas áreas de conocimiento, como la maricultura y piscicultura, proclives a la evaluación y prognosis de la disfunción inmune. Valga como ejemplo un resumen somero de dos modelos seminales en el análisis genómico comparado de la intensidad de la respuesta inmunitaria.

2.1. El invertebrado modal

El inmunoma de *S. purpuratus* alberga una inusitada diversidad de receptores de reconocimiento (PRRs) de patrones moleculares característicos de patógenos (PAMPs) integrados en un defensoma de amplio espectro extremadamente diversificado (HIBINO *et al.* 2006), que incluye no menos de 222 genes que codifican receptores Toll-like (TLR), un conjunto de 203 proteínas NACHT y proteínas con motivos repetitivos de leucina (NLR) similares a los más de 20 receptores PAMP citoplasmáticos NOD/NALP descritos en los vertebrados (KUFER *et al.* 2005), y 218 modelos genéticos que codifican múltiples genes SRCR implicados en el reconocimiento inmunitario. A esta extraordinaria expansión del potencial de reconocimiento tipificado en las reacciones inmunitarias innatas contribuye la expresión de numerosos genes implicados en la producción de proteínas antimicrobianas (lectinas de tipo C, galectinas), estimulados por la presencia de LPS y otros derivados bacterianos (HIBINO *et al.* 2006). El sistema del complemento de *S. purpuratus*, asociado a la considerada vía primitiva (alternativa) de opsonización y lisis celular (NONAKA y KIMURA 2006) y formado por componentes Sp-C3/Sp-C3-2 y Sp-Bf homólogos de los genes C3/4/5 y Bf vertebrados, resulta ser sorprendentemente limitado, lo que contrasta con la diversidad de isoformas de C3 exclusivas de algunas especies de teleósteos (BOSHRA *et al.* 2006). *Strongylocen-*



totus carece de un sistema de reconocimiento antigénico homólogo al complejo MHC vertebrado, del que únicamente se reconocen modelos similares en algunos protocordados: en el caso de tunicado colonial *Botryllus schlosseri*, su organización modular en fase adulta le expone a un ciclo complejo de reconocimiento, anastomosis tisular y quimerismo y parasitismo ocasionales con otros miembros (zooides) de la colonia, controlado gracias a la expresión de un haplotipo altamente polimórfico de múltiples alelos codominantes, el locus de fusión/histocompatibilidad (Fu/MHC), sin homología con el MHC vertebrado, aunque con algunas similitudes estructurales, como la presencia de numerosos dominios Ig extracelulares (DE TOMASO *et al.* 2005).

Hasta la fecha, el resto de protocordados estudiados (*Ciona intestinalis*, *Branchiostoma floridae*) también carecen de un sistema de histocompatibilidad semejante al modelo MHC (KURN *et al.* 2007; YU *et al.* 2005) y receptores de respuesta celular (TCR), lo que parece restringir la eclosión del aloreconocimiento combinatorio mediado por la expresión de genes RAG al linaje gnatostomado. Sin embargo, tanto el genoma de *S. purpuratus* como el de *B. floridae* contienen clusters RAG-like organizados de manera similar al modelo RAG1/2 vertebrado (HIBINO *et al.* 2006; YU *et al.* 2005), acompañados de una plétora de mecanismos genéticos y somáticos de diversificación alternativa de los receptores de reconocimiento inmunitario presentes también en otros invertebrados, protovertebrados y vertebrados agnatos (LITMAN *et al.* 2005; PANCER y COOPER 2006; PASQUIER 2006). No obstante, en la mayoría de invertebrados las estrategias de diagnóstico inmunómico y evaluación del estado de salud se resienten de

- 1) lagunas en el conocimiento de la función inmunitaria y hematopoyética debido al reducido número de modelos experimentales invertebrados y el estudio excesivamente centrado en el caldo del análisis de la actividad biológica y caracterización bioquímica de efectores inmunológicos de vertebrados de inmunoma conocido, descuidando al mismo tiempo la evaluación funcional de la respuesta inmunitaria,
- 2) disparidad en el *bauplan*, organización interna y fisiológica y ciclo vital de cada especie, lo que dificulta un estudio integrado del sistema inmunitario y sus patologías,



- 3) los escasos cultivos primarios disponibles de hemocitos, considerados los principales efectores celulares de la respuesta inmunitaria, y la falta de líneas celulares que permitan un estudio detallado de las relaciones parasíticas y patologías en condiciones salvajes y de cultivo.

2.2. El pez oncogénico

Las aproximadamente 23.600 especies de teleósteos actuales, que dan cuenta de la mitad de las especies de vertebrados, han experimentado una radiación evolutiva sin precedentes desde su aparición hace 230 millones de años, probablemente como consecuencia de al menos dos episodios de duplicación genómica y diversos eventos independientes de duplicación genética ocurridos a lo largo de la expansión del grupo (VOLFF 2005). La poliploidia resultante, común a numerosos teleósteos, explica no sólo la radiación de algunas especies como los Salmonidae y Catostomidae (VENKATESH 2003), sino también la diversidad funcional y estructural en la expresión y tasa de sustitución genéticas que responden, con la abundancia de elementos móviles transponibles en los teleósteos (KRASNOV *et al.* 2005a) de la «plasticidad» inmunómica atribuida al grupo. La diversidad se constituye así en terreno abonado para la inmunología comparada, pero el análisis de su significación funcional exige un razonamiento filogenético *a priori* para la elección del modelo experimental y un considerable esfuerzo metodológico en el procesado de los datos.

Un indicador fidedigno de la persistencia y validez de un modelo experimental es la progresiva sustitución de su identificador binomial linneano por el nombre vernacular. El pez cebra (*Danio rerio*) comparte con el clásico ratón de laboratorio la idoneidad como modelo debido a su reducido tamaño, facilidad de cría controlada, fecundidad, breve tiempo de generación, producción de mutantes y líneas transgénicas y un conocimiento detallado del genoma (DAVIS 2004). El parentesco lejano con la especie humana queda compensado por una característica única: la transparencia de las fases juveniles que permite el estudio exhaustivo por marcaje en individuos transgénicos de procesos oncogénicos y la regulación ontogénica y funcional de la hematopoyesis y organogénesis (TRAVER *et al.* 2003; TREDE *et al.* 2004).



La traslación al pez cebra de las metodologías genómicas desarrolladas por y para el estudio funcional de la inmunidad en mamíferos revela, una vez secuenciado poco más del 70% de sus aproximadamente 1.7 Gb (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/), un defensoma construido siguiendo el molde recombinatorial gnatostomado (véase más arriba).

La expresión temprana de factores de transcripción típicos del desarrollo linfocitario (IKAROS, GATA, etc.) y la recombinación de segmentos V(D)J durante el desarrollo larvario de *D. rerio* preceden a la maduración del sistema inmunitario durante la transición larva/juvenil (LAM *et al.* 2004), acompañada de la expresión de genes RAG1 en el principal órgano hematopoyético de los peces, el riñón cefálico, la regionalización funcional del timo y el bazo, la proliferación de linajes linfocitarios (ZAPATA *et al.* 2006) y la expresión de varios isotipos de la cadena H de las Ig, IgM e IgZ (DANILOVA *et al.* 2005), diversificados bajo la forma de IgD e IgT en algunas especies de teleósteos (HANSEN *et al.* 2005; SAHA *et al.* 2004; SAVAN *et al.* 2005a; SAVAN *et al.* 2005b) aunque no en otras (BENGTON *et al.* 2006). La transparencia del pez cebra ha permitido el estudio *in vivo* de la ontogenia de los linfocitos T así como el desarrollo de linfomas mediante el uso de marcadores fluorescentes expresados bajo el control de promotores específicos de estas células (LANGENAU y ZON 2005). Este modelo ofrece unas ventajas inigualables para la identificación a gran escala tanto de drogas como de genes que afecten a la respuesta inmunitaria y al desarrollo del cáncer (ZON y PETERSON 2005).

Aunque con variaciones, referidas al número de componentes y no tanto a la calidad de la respuesta inmune, el genoma de *Danio rerio* incluye una respuesta antiviral orquestada por la expresión de interferones de tipo I y gamma y las vías de transducción JAK-STAT asociadas a la respuesta celular de los linfocitos T colaboradores (Th) y citotóxicos (ROBERTSEN 2006). Los complejos génicos determinantes de los receptores de las células citolíticas (NK) y la familia de receptores intracelulares de motivos antigénicos NOD (NLR) dedicadas a la erradicación de patógenos intracelulares también están presentes en el genoma del pez cebra y en otras especies (TANABE *et al.* 2004; YODER *et al.* 2004), los primeros bajo la forma de grupos multigénicos



NITR que codifican dominios Ig y lectinas de tipo C (YODER *et al.* 2004) y receptores *illrs* (PANAGOS *et al.* 2006) cuyos motivos reguladores apuntan a la conservación, en los peces, del modelo inhibidor/activador de la respuesta intracelular mediada por células NK (KELLEY *et al.* 2005). La interacción entre los sensores intracelulares NLR y los receptores TLR de reconocimiento de PAMPs (fundamentalmente lipopéptidos, LPS, flagelina, dsRNA y ácidos nucleicos) completa la respuesta sinérgica innata del pez cebra, que cuenta con homólogos de los receptores TLR2/3/5/7/9, dos miembros similares a TLR8, cinco miembros estrechamente emparentados con el TLR21 de Fugu y dos receptores homólogos al TLR4 (JAULT *et al.* 2004), cuya presencia, sin embargo, parece ser variable en las distintas especies de peces (ROACH *et al.* 2005). Asimismo, se han descrito en el pez cebra ortólogos de la familia de receptores TREM implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria y la diferenciación funcional de células mieloides (STET *et al.* 2005).

El modelo emergente de la respuesta inmunitaria de *D. rerio*, y por extensión, la de la mayoría de gnatostomados acuáticos, se construye por tanto a partir de la *interacción* entre un amplio repertorio somático combinatorio de receptores citoplasmáticos, de membrana y sistémicos y un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones ajenos al organismo heredados por la vía germinal (MAGNADOTTIR 2006; SECOMBES y CUNNINGHAM 2004; SECOMBES *et al.* 2005; SUNYER *et al.* 2005). La *información* sobre el estado de homeostasis interna resultante conduce a la *integración de las vías de transducción y regulación*, dependiente de las condiciones del medio, las constricciones de la especie y la historia coevolutiva entre patógeno, huésped y microbiota asociada, de ambos tipos de señales. En este sentido, estudios recientes con ejemplares de *Danio rerio* gnotobióticos expuestos a un microbioma característico de la flora intestinal de teleosteos (RAWLS *et al.* 2004) demuestran la conservación de la respuesta transcripcional característica de los mamíferos frente a la agresión patogénica. La aproximación «infectogenómica» de las patologías microbianas (KELLAM y WEISS 2006) se beneficia, así, de la utilización de un teleosteo para el análisis inmunómico del remodelado mutuo de los genomas de huésped y parásito.



3. INFECTOGENÓMICA Y DEFENSOMA EN ACUICULTURA: IDENTIDAD TRANSCRIPCIONAL

La tendencia actual en el estudio de los patrones de expresión génica involucrados en la respuesta inmunitaria opta por un meta-análisis jerárquico de complejidad creciente que evalúa la conectividad funcional entre:

- 1) *módulos reguladores intrínsecos* integrados por grupos de genes de funcionalidad diversa, definidos *ad hoc* por el propio conjunto de datos experimentales (SEGAL *et al.* 2003),
- 2) conjuntos de genes sometidos a condiciones experimentales clásicas (v.g. control *versus* tratamiento) o variaciones ontogénicas y agrupados a partir de su *identidad transcripcional* en categorías definidas de manera laxa, lo que permite una considerable maleabilidad analítica pero dificulta su anotación precisa (SHAFFER *et al.* 2006),
- 3) *redes de coexpresión y regulación transcriptómica* que permiten la elucidación relacional y la adscripción en grupos funcionales y/o reguladores de la expresión genética intra e interespecífica a partir de grandes conjuntos de datos (BASSO *et al.* 2005). La conservación de correlaciones genéticas entre especies resulta así indicadora de la importancia de una vía transcripcional o reguladora de la expresión genética y posibilita un enfoque filogenético de la evolución de la respuesta fisiológica (STUART *et al.* 2003)

Generalizando el análisis de la función inmunitaria a los vertebrados, a la panoplia de metodologías habituales en la caracterización funcional de la expresión genómica (Figura 1) y el progreso en la problemática estandarización del análisis estadístico y diseño experimental de las plataformas de microarrays (ALLISON *et al.* 2006; VON SCHALBURG *et al.* 2005) se le ha sumado recientemente un enfoque computacional integrado que combina el minado de bases de datos anotadas y la producción de microrarrays destinados a la medición del perfil proteómico de anticuerpos para cartografiar los epítomos procesados por el MHC y los linfocitos B y T mediante ELISAs (ELISPOT) de alto nivel (BARTLING



et al. 2005; QUINTANA et al. 2004; STONE et al. 2005). La metodología inmunómica no elude, sin embargo los requerimientos computacionales del análisis estadístico de los datos, condicionados por la complejidad

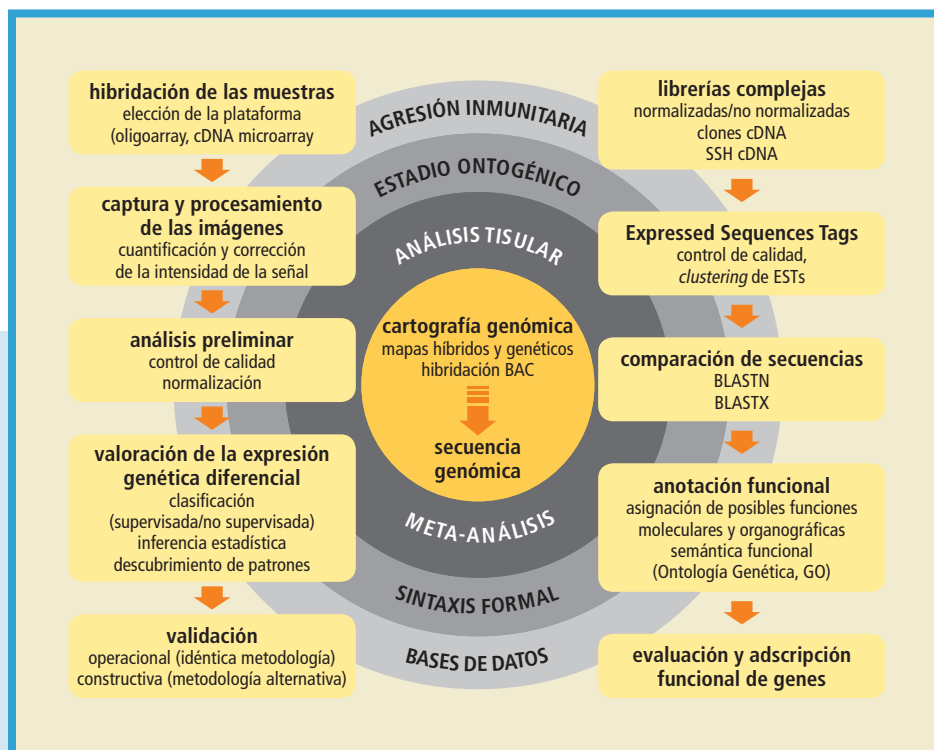


FIGURA 1.

Estrategias habituales en el análisis inmunómico de las especies acuícolas cultivadas.

La evaluación y adscripción funcional de genes implicados en la respuesta inmunitaria constituye el principal paso previo para la descripción funcional, habitualmente mediante la construcción de una plataforma de microarray específica (inmunitaria) o generalista (metabólica, comportamental, etc.), de la expresión genética diferencial en distintos tejidos y órganos, una vez sometido el animal a condiciones experimentales de infección y agresión inmunitaria, puntuales o dispuestas a lo largo de su desarrollo ontogénico. Para su análisis, los resultados, susceptibles de ser utilizados en estudios a gran escala de cartografía genómica comparativa, deben estructurarse formalmente para su inclusión en las bases de datos y clasificarse para su análisis categorizado en conjuntos relacionales (ontologías) de similitud funcional.



recombinacional, somática y germinal del diseño inmunitario. De hecho, las redes de expresión génica de las poblaciones celulares inmunitarias consideradas a priori funcionalmente dispares, se revelan como una agrupación difusa de linajes solapados (HYATT *et al.* 2006) producto de la elevada plasticidad fenotípica tanto de poblaciones celulares inmaduras como diferenciadas (STOUT y SUTTLES 2004).

En el ámbito de la acuicultura, a la espera de la compleción de los proyectos de secuenciación genómica actuales, el refinamiento de la metodología inmunómica se restringe a un reducido número de especies (Tabla 1), y aborda la adscripción de funcionalidad genética mediante proyectos a gran escala de secuenciación de ESTs en condiciones de infección, salubridad comprometida o variación ontogénica, la búsqueda y comparación de homologías en las bases de datos y la elucidación de las diferencias tisulares y celulares en la expresión de genes relevantes en la respuesta inmunitaria mediante la construcción de *microarrays* de cDNA elaborados a partir de secuencias EST y librerías obtenidas por SSH y, en menor medida, al desarrollo de mapas genéticos (FRANCH *et al.* 2006; HAGEN-LARSEN *et al.* 2005; KRASNOV *et al.* 2005c; KUROBE *et al.* 2005; LIU *et al.* 2005; MACKENZIE *et al.* 2006; MARTIN *et al.* 2006; MATSUYAMA *et al.* 2006; RISE *et al.* 2004; ROBALINO *et al.* 2006; VON SCHALBURG *et al.* 2005).

En la mayoría de **invertebrados** cultivados, los hemocitos constituyen la principal población, funcional y estructuralmente heterogénea, de la respuesta defensiva humoral y celular (HUMPHRIES y YOSHINO 2003). En las especies de bivalvos filtradores cultivados (*Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *Mytilus* spp., *Argopecten irradians*), el análisis inmunómico tisular y hemocitario ecotoxicológico mediante plataformas de *microarray* específicas destaca la expresión génica diferencial de proteínas antimicrobianas (AMP), de adhesión, reconocimiento antigénico, opsonización y encapsulación, proteasas, inhibidores de las proteasas, miembros de las proteínas HSP, diversas familias de metalotioneínas y componentes homólogos de la vía de señalización kB reticuloendotelial característica de mamíferos (DONDERO *et al.* 2006; JENNY *et al.* 2002; JENNY *et al.* 2006; SONG *et al.* 2006; VENIER *et al.* 2003). En condiciones de agresión patogénica e infección, el análisis de ESTs de las librerías de cDNA derivadas de hemocitos, hepatopáncreas y branquias en algunos crustáceos penaeidos



TABLA 1.
Número de ESTs secuenciados y tamaño del genoma en algunas especies relevantes en el ámbito de la acuicultura.

Grupo	Especie	Genoma ¹ (Mb)	ESTs ²	Proyectos genómicos
Crustáceos				
Peneidos	<i>Penaeus monodon</i>	2000	7330	http://pmonodon.biotec.or.th/
	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	2100	10446	
	<i>Litopenaeus vannamei</i>	2450	7429	http://www.shrimp.ufscar.br/
Nefropídeos	<i>Homarus americanus</i>	4160	12365	http://www.marinegenomics.org
Moluscos				
Portunidos	<i>Callinectes sapidus</i>	2000	10563	http://www.marinegenomics.org
Mytilidos	<i>Mytilus</i> spp.		3986	
Ostreidos	<i>Crassostrea virginica</i>	675	9018	http://www.marinegenomics.org
	<i>Crassostrea gigas</i>	890	4046	http://www.marinegenomics.org
Pectinidos	<i>Argopecten irradians</i>	1170	7057	http://www.mbl.edu/aquaculture/EST/
Teleósteos				
Salmónidos	<i>Salmo salar</i>	3100	430426	http://grasp.mbb.sfu.ca/
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2700	260886	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/
Perciformes	<i>Thunnus thynnus</i>	780	7149	
	<i>Sparus aurata</i>	930	2034	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	765	2356	
	<i>Perca fluviatilis</i>	1190	2226	
	<i>Oreochromis niloticus</i> ³	1100	294	http://hcgs.unh.edu/cichlid/
Pleuronectiformes	<i>Paralichthys olivaceus</i>	695	8803	
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	715	17603	
Gadiformes	<i>Gadus morhua</i>	910	19875	
Cypriniformes	<i>Rutilus rutilus</i>	1270	18470	
	<i>Cyprinus carpio</i>	1860	19265	
Siluriformes	<i>Ictalurus punctatus</i>	980	46294	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/
Condrosósteos				
Acipenseriformes	<i>Acipenser transmontanus</i>	4600	2704	

¹ Estimaciones del tamaño genómico tomadas de Gregory, T.R. (2007). Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com> y Shiao-Wei Huang, Tze-Tze Liu, Hung-Yu Shu, Keh-Ming Wu, Shih-Feng Tsai, You-Yu Lin, Hon-Tsen Yu (2007) *A First Glimpse Into The Genome Of A Marine Shrimp Penaeus monodon By Way Of Fosmid End Sequencing*. Plant & Animal Genomes XV Conference

² Datos tomados de la base de datos dbEST (rel. 010507) de GenBank. Boguski MS, Lowe TM, Tolstoshev CM. (1993) *dbEST--database for «expressed sequence tags*. Nat Genet. 4(4):332-3.

³ Aunque únicamente se ha incluido una de las especies de mayor importancia económica, otras especies del diversificado grupo de los cíclidos son objeto de intensa investigación genómica, con más de 63000 ESTs descritos hasta la fecha (<http://hcgs.unh.edu/cichlid/>).



de interés comercial (*Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, *L. setiferus*, *Penaeus monodon* y *P. japonicus*) revela una respuesta similar, basada en la activación de los sistemas de la profenoloxidasas (pro-PO), lectinas/aglutininas, TLR y AMP común a la mayoría de invertebrados y una considerable representación de genes implicados en una respuesta inmunitaria marcada, en este caso por la expresión de factores de reconocimiento ALFPM3 de LPS, numerosísimas AMP (penaedinas) implicadas en procesos de eliminación, opsonización y fagocitosis y componentes de la vías reguladoras NFkB y antiviral mediada por RNAi (GROSS *et al.* 2001; ROBALINO *et al.* 2006; ROUX *et al.* 2002; SOMBOONWIWAT *et al.* 2006; SUPUNGUL *et al.* 2004).

La inmunómica de los **teleósteos** de interés comercial se asume, por similitud, estructurada según el modelo descrito para *Danio reio*. El reto de los escasos proyectos de secuenciación genómica iniciados en la pasada década radica en la *definición funcional de la intensidad* y componentes de la respuesta inmunitaria para cada especie, ya sea en un escenario evo-devo, sujeto a los problemas analíticos del agitado historial genómico de los peces, o en el ámbito de la salud y susceptibilidad a patologías. Las todavía escasas plataformas de microarray construidas *ad hoc* a partir de ESTs, para la evaluación de la expresión genética diferencial en teleósteos sometidos a condiciones de ecotoxicidad y/o carga patogénica (GOVOROUN *et al.* 2006; KRASNOV *et al.* 2005b; KUROBE *et al.* 2005; LI y WALDBIESER 2006; RISE *et al.* 2004; VON SCHALBURG *et al.* 2005; WILLIAMS *et al.* 2006) confirman la diversidad del repertorio de receptores de reconocimiento antigénico del grupo, el menoscabo de la función inmune adaptativa debida a la ausencia, limitaciones o peculiaridades ontogénicas de componentes celulares, humorales u organográficos en algunas especies (BYON *et al.* 2006; LONG *et al.* 2006; ROBERGE *et al.* 2007), y la presencia de múltiples isoformas y variantes de mediadores y citocinas de comunicación y activación inmunitaria (SECOMBES y CUNNINGHAM 2004; SUNYER *et al.* 2005; ZOU *et al.* 2007). En el ámbito de la prognosis y diagnóstico patológico, se han copiado con éxito modelos de inflamación experimental murinos adaptados a la particular organografía inmunitaria de los teleósteos, perfilándose la modulación de la respuesta defensiva inmunoendocrina frente a epítomos (LPS, beta-glucanos, CpGs) y patógenos de probada



eficacia en la estimulación inmunitaria (GERWICK *et al.* 2007; KUROBE *et al.* 2005; MACKENZIE *et al.* 2006; MARTIN *et al.* 2006; MATSUYAMA *et al.* 2006; MORRISON *et al.* 2006; PURCELL *et al.* 2006) y confirmándose una vez más el peso de la diversidad filogenética en la intensidad de la respuesta inmune. La redefinición de la disfunción inmunitaria en las especies acuícolas cultivadas necesita más que nunca integrarse en un marco conceptual más amplio que incluya las formulaciones recientes de la dinámica y sentido inmunitarios: efectos pleiotrópicos, patrones de daño tisular y regulación de la respuesta innata dependiente del órgano afectado (GREENSPAN 2007; MATZINGER 2007; RAZ 2007), en un contexto jerárquico de interacciones interespecíficas que tenga en cuenta el historial genómico de cada especie.

BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, A. R., D. BALDWIN, Y. MA, W. OUYANG, A. GURNEY *et al.*, 2005 Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. *Genes Immun.* **6**: 319-331.
- ALLISON, D. B., X. CUI, G. P. PAGE y M. SABRIPOUR, 2006 Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat. Rev. Genet.* **7**: 55-65.
- BARTLING, B., H. S. HOFMANN, T. BOETTGER, G. HANSEN, S. BURDACH *et al.*, 2005 Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma. *Lung Cancer* **49**: 145-154.
- BASSO, K., A. A. MARGOLIN, G. STOLOVITZKY, U. KLEIN, R. DALLA-FAVERA *et al.*, 2005 Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat. Genet.* **37**: 382-390.
- BENGTON, E., S. QUINIOU, J. HIKIMA, G. WALDBIESER, G. W. WARR *et al.*, 2006 Structure of the catfish IGH locus: analysis of the region including the single functional IGHM gene. *Immunogenetics* **58**: 831-844.
- BOSHRA, H., J. LI y J. O. SUNYER, 2006 Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish. Shellfish Immunol.* **20**: 239-262.
- BYON, J. Y., T. OHIRA, I. HIRONO y T. AOKI, 2006 Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis. *Vaccine* **24**: 921-930.
- CADDAVID, L. F., 2004 Self-discrimination in colonial invertebrates: genetic control of allorecognition in the hydroid *Hydractinia*. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 871-879.



- CULLEY, A. I., A. S. LANG y C. A. SUTTLE, 2003 High diversity of unknown picorna-like viruses in the sea. *Nature* **424**: 1054-1057.
- CHANG, C. H., L. C. HSIEH, T. Y. CHEN, H. D. CHEN, L. LUO *et al.*, 2005 Shannon information in complete genomes. *J Bioinform Comput. Biol.* **3**: 587-608.
- DANILOVA, N., J. BUSSMANN, K. JEKOSCH y L. A. STEINER, 2005 The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* **6**: 295-302.
- DAVIS, R. H., 2004 The age of model organisms. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 69-76.
- DE TOMASO, A. W., S. V. NYHOLM, K. J. PALMERI, K. J. ISHIZUKA, W. B. LUDINGTON *et al.*, 2005 Isolation and characterization of a protochordate histocompatibility locus. *Nature* **438**: 454-459.
- DONDERO, F., L. PIACENTINI, F. MARSANO, M. REBELO, L. VERGANI *et al.*, 2006 Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray. *Gene* **376**: 24-36.
- GERWICK, L., G. CORLEY-SMITH y C. J. BAYNE, 2007 Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus. *Fish. Shellfish Immunol.* **22**: 157-171.
- GOVOROUN, M., F. LE GAC y Y. GUIGUEN, 2006 Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. *BMC Genomics* **7**: 196.
- GREENSPAN, N. S., 2007 Conceptualizing immune responsiveness. *Nat Immunol* **8**: 5-7.
- GROSS, P. S., T. C. BARTLETT, C. L. BROWDY, R. W. CHAPMAN y G. W. WARR, 2001 Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 565-577.
- HANSEN, J. D., E. D. LANDIS y R. B. PHILLIPS, 2005 Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**: 6919-6924.
- HIBINO, T., M. LOZA-COLL, C. MESSIER, A. J. MAJESKE, A. H. COHEN *et al.*, 2006 The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev. Biol.* **300**: 349-365.
- HUMPHRIES, J. E., y T. P. YOSHINO, 2003 Cellular receptors and signal transduction in moluscan hemocytes: connections with the innate system of invertebrates. *Integrative Comparative Biology* **43**: 305-312.
- HYATT, G., R. MELAMED, R. PARK, R. SEGURITAN, C. LAPLACE *et al.*, 2006 Gene expression microarrays: glimpses of the immunological genome. *Nat. Immunol.* **7**: 686-691.



- IHGSC, 2004 Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**: 931-945.
- IWANAGA, S., y B. L. LEE, 2005 Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**: 128-150.
- JAULT, C., L. PICHON y J. CHLUBA, 2004 Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Mol. Immunol.* **40**: 759-771.
- JENNY, M. J., A. H. RINGWOOD, E. R. LACY, A. J. LEWITUS, J. W. KEMPTON *et al.*, 2002 Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol. (NY)* **4**: 81-93.
- JENNY, M. J., G. W. WARR, A. H. RINGWOOD, D. A. BALTZEGAR y R. W. CHAPMAN, 2006 Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): ontogeny and differential expression in response to different stressors. *Gene* **379**: 156-165.
- KELLAM, P., y R. A. WEISS, 2006 Infectogenomics: insights from the host genome into infectious diseases. *Cell* **124**: 695-697.
- KELLEY, J., L. WALTER y J. TROWSDALE, 2005 Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genet.* **1**: 129-139.
- KHATRI, P., y S. DRAGHICI, 2005 Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics* **21**: 3587-3595.
- KRASNOV, A., H. KOSKINEN, S. AFANASYEV y H. MOLSA, 2005a Transcribed Tc1-like transposons in salmonid fish. *BMC Genomics* **6**: 107.
- KRASNOV, A., H. KOSKINEN, P. PEHKONEN, C. E. REXROAD, 3RD, S. AFANASYEV *et al.*, 2005b Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress. *BMC Genomics* **6**: 3.
- KUFER, T. A., J. H. FRITZ y D. J. PHILPOTT, 2005 NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol.* **13**: 381-388.
- KURN, U., F. SOMMER, G. HEMMRICH, T. C. BOSCH and K. KHALTURIN, 2007 Allorecognition in urochordates: Identification of a highly variable complement receptor-like protein expressed in follicle cells of *Ciona*. *Dev. Comp. Immunol.* **31**: 360-371.
- KUROBE, T., M. YASUIKE, T. KIMURA, I. HIRONO y T. AOKI, 2005 Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarrays. *Dev. Comp. Immunol.* **29**: 515-523.
- LAM, S. H., H. L. CHUA, Z. GONG, T. J. LAM y Y. M. SIN, 2004 Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 9-28.



- LANGENAU, D. M., y L. I. ZON, 2005 The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 307-317.
- LI, R. W., y G. C. WALDBIESER, 2006 Production and utilization of a high-density oligonucleotide microarray in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *BMC Genomics* **7**: 134.
- LIOLOS, K., N. TAVERNARAKIS, P. HUGENHOLTZ y N. C. KYRPIDES, 2006 The genomes on line database (GOLD) v.2: a monitor of genome projects worldwide. *Nucleic Acids Res.* **34**: D332-334.
- LITMAN, G. W., J. P. CANNON y L. J. DISHAW, 2005 Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 866-879.
- LONG, S., I. MILEV-MILOVANOVIC, M. WILSON, E. BENGTEEN, L. W. CLEM *et al.*, 2006 Identification and expression analysis of cDNAs encoding channel catfish type I interferons. *Fish. Shellfish Immunol.* **21**: 42-59.
- MACKENZIE, S., D. ILIEV, C. LIARTE, H. KOSKINEN, J. V. PLANAS *et al.*, 2006 Transcriptional analysis of LPS-stimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol. *Mol. Immunol.* **43**: 1340-1348.
- MAGNADOTTIR, B., 2006 Innate immunity of fish (overview). *Fish. Shellfish Immunol.* **20**: 137-151.
- MARTIN, S. A., S. C. BLANEY, D. F. HOULIHAN y C. J. SECOMBES, 2006 Transcriptome response following administration of a live bacterial vaccine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol. Immunol.* **43**: 1900-1911.
- MATSUYAMA, T., A. FUJIWARA, C. NAKAYASU, T. KAMAISHI, N. OSEKO *et al.*, 2006 Gene expression of leucocytes in vaccinated Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during the course of experimental infection with *Edwardsiella tarda*. *Fish. Shellfish Immunol.* (en prensa).
- MATZINGER, P., 2007 Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat. Immunol.* **8**: 11-13.
- MORRISON, R. N., G. A. COOPER, B. F. KOOP, M. L. RISE, A. R. BRIDLE *et al.*, 2006 Transcriptome profiling the gills of amoebic gill disease (AGD)-affected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a role for tumor suppressor p53 in AGD pathogenesis? *Physiol. Genomics* **26**: 15-34.
- NONAKA, M., and A. KIMURA, 2006 Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics* **58**: 701-713.
- PANAGOS, P. G., K. P. DOBRINSKI, X. CHEN, A. W. GRANT, D. TRAVER *et al.*, 2006 Immune-related, lectin-like receptors are differentially expressed in the myeloid and lymphoid lineages of zebrafish. *Immunogenetics* **58**: 31-40.
- PANCER, Z., y M. D. COOPER, 2006 The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **24**: 497-518.



- PASQUIER, L. D., 2006 Germline and somatic diversification of immune recognition elements in Metazoa. *Immunol. Lett.* **104**: 2-17.
- PURCELL, M. K., K. M. NICHOLS, J. R. WINTON, G. KURATH, G. H. THORGAARD *et al.*, 2006 Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Immunol.* **43**: 2089-2106.
- QUINTANA, F. J., P. H. HAGEDORN, G. ELIZUR, Y. MERBL, E. DOMANY *et al.*, 2004 Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101 Suppl 2**: 14615-14621.
- RAJ, A., C. S. PESKIN, D. TRANCHINA, D. Y. VARGAS y S. TYAGI, 2006 Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biol.* **4**: e309.
- RAWLS, J. F., B. S. SAMUEL y J. I. GORDON, 2004 Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**: 4596-4601.
- RAZ, E., 2007 Organ-specific regulation of innate immunity. *Nat. Immunol.* **8**: 3-4.
- RISE, M. L., K. R. VON SCHALBURG, G. D. BROWN, M. A. MAWER, R. H. DEVLIN *et al.*, 2004 Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics. *Genome Res.* **14**: 478-490.
- ROACH, J. C., G. GLUSMAN, L. ROWEN, A. KAUR, M. K. PURCELL *et al.*, 2005 The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**: 9577-9582.
- ROBALINO, J., J. S. ALMEIDA, D. MCKILLEN, J. COLGLAZIER, H. F. TRENT III *et al.*, 2006 Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiol. Genomics* (en prensa).
- ROBERGE, C., D. J. PAEZ, O. ROSSIGNOL, H. GUDERLEY, J. DODSON *et al.*, 2007 Genome-wide survey of the gene expression response to saprolegniasis in Atlantic salmon. *Mol. Immunol.* **44**: 1374-1383.
- ROBERTSEN, B., 2006 The interferon system of teleost fish. *Fish. Shellfish Immunol.* **20**: 172-191.
- ROUX, M. M., A. PAIN, K. R. KLIMPEL y A. K. DHAR, 2002 The lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J. Virol.* **76**: 7140-7149.
- SAHA, N. R., H. SUETAKE, K. KIKUCHI y Y. SUZUKI, 2004 Fugu immunoglobulin D: a highly unusual gene with unprecedented duplications in its constant region. *Immunogenetics* **56**: 438-447.



- SAVAN, R., A. AMAN, M. NAKAO, H. WATANUKI y M. SAKAI, 2005a Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Immunogenetics* **57**: 458-463.
- SAVAN, R., A. AMAN, K. SATO, R. YAMAGUCHI y M. SAKAI, 2005b Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur. J. Immunol.* **35**: 3320-3331.
- SCHUG, J., W. P. SCHULLER, C. KAPPEN, J. M. SALBAUM, M. BUCAN *et al.*, 2005 Promoter features related to tissue specificity as measured by Shannon entropy. *Genome Biol.* **6**: R33.
- SECOMBES, C., y C. CUNNINGHAM, 2004 Cytokines: an evolutionary perspective. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 373-374.
- SECOMBES, C. J., S. BIRD y J. ZOU, 2005 Adaptive immunity in teleosts: cellular immunity. *Dev. Biol. (Basel)* **121**: 25-32.
- SEGAL, E., M. SHAPIRA, A. REGEV, D. PE'ER, D. BOTSTEIN *et al.*, 2003 Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nat. Genet.* **34**: 166-176.
- SHAFFER, A. L., G. WRIGHT, L. YANG, J. POWELL, V. NGO *et al.*, 2006 A library of gene expression signatures to illuminate normal and pathological lymphoid biology. *Immunol. Rev.* **210**: 67-85.
- SODERGREN, E., G. M. WEINSTOCK, E. H. DAVIDSON, R. A. CAMERON, R. A. GIBBS *et al.*, 2006 The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* **314**: 941-952.
- SOMBOONWIWAT, K., P. SUPUNGUL, V. RIMPHANITCHAYAKIT, T. AOKI, I. HIRONO *et al.*, 2006 Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio* harveyi-challenged shrimp *Penaeus monodon*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**: 26-36.
- SONG, L., W. XU, C. LI, H. LI, L. WU *et al.*, 2006 Development of expressed sequence tags from the Bay Scallop, *Argopecten irradians irradians*. *Mar. Biotechnol. (NY)* **8**: 161-169.
- STET, R. J., T. HERMSEN, A. H. WESTPHAL, J. JUKES, M. ENGELSMA *et al.*, 2005 Novel immunoglobulin-like transcripts in teleost fish encode polymorphic receptors with cytoplasmic ITAM or ITIM and a new structural Ig domain similar to the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Immunogenetics* **57**: 77-89.
- STONE, J. D., W. E. DEMKOWICZ, JR. y L. J. STERN, 2005 HLA-restricted epitope identification and detection of functional T cell responses by using MHC-peptide and costimulatory microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**: 3744-3749.
- STOUT, R. D., y J. SUTTLES, 2004 Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* **76**: 509-513.



- STUART, J. M., E. SEGAL, D. KOLLER y S. K. KIM, 2003 A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science* **302**: 249-255.
- SUNYER, J. O., H. BOSHRA y J. LI, 2005 Evolution of anaphylatoxins, their diversity and novel roles in innate immunity: insights from the study of fish complement. *Vet. Immunol. Immunopathol* **108**: 77-89.
- SUPUNGUL, P., S. KLINBUNGA, R. PICHYANGKURA, I. HIRONO, T. AOKI *et al.*, 2004 Anti-microbial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis. Aquat. Organ.* **61**: 123-135.
- TANABE, T., M. CHAMAILLARD, Y. OGURA, L. ZHU, S. QIU *et al.*, 2004 Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *Embo J.* **23**: 1587-1597.
- TRAYER, D., P. HERBOMEL, E. E. PATTON, R. D. MURPHEY, J. A. YODER *et al.*, 2003 The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Adv. Immunol.* **81**: 253-330.
- TREDE, N. S., D. M. LANGENAU, D. TRAYER, A. T. LOOK y L. I. ZON, 2004 The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* **20**: 367-379.
- VENIER, P., A. PALLAVICINI, B. DE NARDI y G. LANFRANCHI, 2003 Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Gene* **314**: 29-40.
- VENKATESH, B., 2003 Evolution and diversity of fish genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**: 588-592.
- VOLFF, J. N., 2005 Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* **94**: 280-294.
- VON SCHALBURG, K. R., M. L. RISE, G. A. COOPER, G. D. BROWN, A. R. GIBBS *et al.*, 2005 Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray. *BMC Genomics* **6**: 126.
- WILLIAMS, T. D., A. M. DIAB, S. G. GEORGE, R. E. GODFREY, V. SABINE *et al.*, 2006 Development of the GENIPOL European flounder (*Platichthys flesus*) microarray and determination of temporal transcriptional responses to cadmium at low dose. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 6479-6488.
- YANG, Y. H., y T. SPEED, 2002 Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 579-588.
- YODER, J. A., R. T. LITMAN, M. G. MUELLER, S. DESAI, K. P. DOBRINSKI *et al.*, 2004 Resolution of the novel immune-type receptor gene cluster in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**: 15706-15711.
- YU, C., M. DONG, X. WU, S. LI, S. HUANG *et al.*, 2005 Genes «waiting» for recruitment by the adaptive immune system: the insights from amphioxus. *J. Immunol.* **174**: 3493-3500.



- ZAPATA, A., B. DIEZ, T. CEJALVO, C. GUTIERREZ-DE FRIAS y A. CORTES, 2006 Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol* **20**: 126-136.
- ZON, L. I., y R. T. PETERSON, 2005 In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**: 35-44.
- ZOU, J., C. MERCIER, A. KOUSSOUNADIS y C. SECOMBES, 2007 Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. *Mol. Immunol.* **44**: 638-647.

16

GENÓMICA, INMUNOLOGÍA Y ENFERMEDADES DE PECES EN ACUICULTURA

GENÓMICA, INMUNOLOGÍA Y ENFERMEDADES DE PECES EN ACUICULTURA

S. Dios

Instituto de Investigaciones Marinas

B. Novoa

Instituto de Investigaciones Marinas

A. Figueras

Instituto de Investigaciones Marinas

Resumen

Según datos de la FAO, alrededor de un 35% de los productos pesqueros que se consumen en el mundo proceden de la Acuicultura. El gran desarrollo de la misma ha incrementado el interés sobre las enfermedades infecciosas de los peces en cultivo, sobre todo cuando provocan pérdidas económicas importantes. Aunque existen vacunas que actualmente se aplican con éxito en el caso sobre todo de bacterias, todavía son muchas las enfermedades (principalmente virales) para las que no se cuenta con tratamientos terapéuticos, en parte debido a la falta de información sobre los mecanismos de defensa que se desencadenan ante estas infecciones.

Los peces presentan un sistema inmune innato y adquirido, constituyendo el primero su primera línea de defensa y por tanto una importante forma de protección de estos animales contra los patógenos. La razón es básicamente la ineficiencia de la respuesta inmune adquirida,



dado el estatus evolutivo y la naturaleza poiquiloterma de estos animales. A pesar de esta importancia, se han clonado muy pocos genes relacionados con la respuesta inmune no específica en peces, pero este número ha crecido en los últimos años, sobre todo gracias a los avances recientes en el estudio de la expresión simultánea de genes (ESTs y microarrays). La utilización de estas herramientas biotecnológicas (genómicas y proteómicas), junto con estudios funcionales de expresión génica en experimentos *in vivo* e *in vitro*, beneficiarán enormemente a la Acuicultura. En este sentido, podrán ser identificados y caracterizados genes y circuitos reguladores de los diferentes procesos fisiológicos en general, y de los mecanismos de defensa en particular. Este conocimiento permitirá no sólo determinar las bases moleculares de estas respuestas, sino también utilizar esta información en la mejora de las especies cultivadas vía diagnóstico eficaz de enfermedades, diseño de nuevas vacunas o selección mediante mejora genética de especies resistentes a enfermedades.

En el presente capítulo nos ocuparemos de la aplicación de estas técnicas genómicas al estudio de la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades de especies susceptibles.

Abstract

According to FAO, about 35% of fishery products consumed in the world come from Aquaculture. The enormous development of Aquaculture has increased the interest for infectious diseases of cultured fish, due to economic losses caused by them. Although at present there are successful vaccines against bacteria, therapeutic treatments for viral diseases have yet to be established, in part due to the lack of information regarding the defense mechanisms triggered during infections.

Fish present an innate and acquired immune system, being the former its first line of defense and therefore an important way of protection against pathogens. The reason is basically the inefficiency of the acquired immune response of fish given the evolutionary status and poikilothermic nature of these animals. In spite of this importance not many genes related to the innate immune system in fish have been cloned. However this number has increased lately, above all due to the recent advances in the study of simulta-



neously gene expression (ESTs and microarrays). The use of this techniques (genomic and proteomic) together with functional studies of gene expression experiments in vivo and in vitro will favor future Aquaculture development. In this sense, many genes and regulatory pathways of biological process in general and defense mechanisms in particular, could be identified and characterized. This knowledge will allow not only to determine the molecular basis of these responses, but also to be used in the improvement of cultured species via effective diseases fight strategies, new vaccines design and genetic selection of disease resistant species.

In this chapter we review the application of these genomic techniques to the study of immune response and disease resistance of susceptible species.

1. INTRODUCCIÓN

Según datos de la FAO, alrededor de un 35% de los productos pesqueros que se consumen en el mundo proceden de la Acuicultura. España es el tercer país consumidor de pescado del mundo con 35 Kg de pescado/persona/año por detrás tan solo de Japón (45 kg/persona/año) y Noruega (40 Kg/persona/año). Considerando que el 70% de los caladeros internacionales se encuentra en estado de sobreexplotación y que el nivel de capturas actual procedente de las actividades pesqueras ha llegado prácticamente al máximo que puede alcanzarse, el aumento del consumo de estos productos tiene que fundamentarse en la acuicultura, lo que confirma las altas expectativas de crecimiento para las producciones acuícolas en un futuro próximo.

El gran desarrollo de la acuicultura ha incrementado el interés sobre las enfermedades infecciosas de los peces y la manera de combatirlas, sobre todo cuando éstas provocan pérdidas económicas importantes. Aunque existen vacunas que actualmente se aplican con éxito en el caso sobre todo de patógenos bacterianos, todavía son muchas las enfermedades para las que no se cuenta con vacunas, en parte debido a la falta de información sobre los mecanismos de defensa que se ponen en marcha ante estas infecciones.

La Acuicultura puede beneficiarse enormemente de los recientes avances en biología molecular y biotecnología, ya que las herramientas disponibles apuntan una interesante aplicación en la diagnosis



de enfermedades, el diseño de nuevas vacunas o en la resistencia a enfermedades de las especies cultivadas.

Cada vez es más evidente la necesidad de identificar y caracterizar genes y circuitos reguladores de potencial utilidad, el desarrollo de modelos animales, y la mejora y obtención de nuevas vacunas, todos ellos encaminados a mejorar la producción de especies de interés en acuicultura. Para ello es esencial el desarrollo y utilización de herramientas biotecnológicas específicas (genómicas y proteómicas) para las especies de interés y, muy importante, para aquellos procesos fisiológicos que se deseen comprender desde un punto de vista biológico y, por consiguiente, para manipular dichos procesos para un máximo aprovechamiento.

Este conocimiento que se adquiere en los peces se puede emplear no solo para mejorar la producción en la Acuicultura, sino que también es aplicable a otras disciplinas. De hecho, desde hace bastante tiempo, los peces han tenido importancia en el desarrollo de la genómica. Aproximadamente hace 30 años, un popular pez tropical llamado *Danio rerio* (pez cebra, zebrafish) fue identificado como un gran candidato para el análisis genético por numerosas características tales como un ciclo de vida corto (3 meses para alcanzar la madurez sexual), puestas relativamente numerosas a lo largo de todo el año, fácil cultivo y desarrollo externo con un embrión transparente (STREINSINGER *et al.* 1981). Combinado con experiencias de mutagénesis a gran escala iniciados a principios de los años 90 (HAFFTER *et al.* 1996; STAINIER *et al.* 1996) el pez cebra llenó un hueco en la biología del desarrollo de vertebrados, la capacidad de estudiar genes a través de los fenotipos mutantes a gran escala, tal como en *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*. Desde entonces y gracias a este pez, se han realizado grandes avances en el conocimiento y comprensión del desarrollo de vertebrados y de enfermedades humanas. Sin embargo, si uno considera el análisis de genomas (genómica) como una cuestión de secuenciación de ADN, adquisición y búsqueda (mining) de genes, los peces pasaron a ser actores principales en 1993 cuando Sydney Brenner sugirió una nueva especie como modelo de genoma, el pez marino «pufferfish», *Takifugu rubripes* (fugu) (BRENNER *et al.* 1993). Además de sus cualidades gastronómicas apreciadas en Japón y China, el fugu posee uno de los genomas de vertebrado más



pequeños. Esta característica, ya conocida para su pariente de agua dulce el *Tetraodon nigroviridis* en 1968 (HINEGARDNER 1968), constituye una gran ventaja para acceder a un gran catálogo de genes en un vertebrado a un coste más modesto, que el que supondría para cualquier mamífero cuyo genoma es mucho más grande. Sin embargo, carecemos de conocimientos detallados de la fisiología, reproducción o ciclo de vida de ambas especies de pufferfish. Dado que la biología es una ciencia cuyo motor es en gran medida la calidad y profundidad de los datos experimentales y nuestra capacidad de extraer significado de esos datos, la información derivada de los programas de genómica de ambas especies de pufferfish, se ha centrado hasta hace poco en descubrimientos en la estructura y evolución de genes y genomas con pocas conexiones con el desarrollo, la biología celular y la fisiología.

Es importante señalar que en los últimos años los recursos genómicos disponibles en peces han crecido espectacularmente (Tabla 1) pero, en el caso de especies con interés comercial sólo se ha generado suficiente información en los salmónidos.

Las tecnologías de genómica funcional que se aplican en este momento se pueden clasificar en clonaje «in silico», análisis de ESTs y análisis transcriptómico (microarrays), que normalmente se desarrollan en paralelo a estudios funcionales detallados de expresión génica y biología celular en experimentos *in vivo* e *in vitro*. Hasta hace poco el

TABLA 1.
Resumen de los recursos genómicos disponibles en peces.

Especie	Proyecto genoma	Tamaño (Mb)	Cobertura de sec. ensambladas	Lecturas Shotgun	ESTs o cDNAs
Pez cebra	http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/	1.700	6,5-7	24.535,919	673.078
<i>Tetraodon</i>	http://www.genoscope.cns.fr/tetraodon	350	8,3	2.975,798	99.204 ^a
Fugu	http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html	380	8,7	3.638,510	25.860
Medaka	http://dolphin.lab.nig.ac.jp/medaka/	800	9,0	15.171,833	–
Salmón	http://www.salmongenome.no	3.100	–	22.677	114.911
Stickleback	http://www.genome.gov/	675	–	6.959,213	171.001
Trucha	No disponible	2.700	–	47.051	231.820

^a Las secuencias de cDNA de *Tetraodon* son secuencias completas; las secuencias de otras especies son ESTs.



análisis del perfil de expresión de múltiples genes se aplicaba casi en exclusiva a los seres humanos y en unos pocos organismos modelos. Actualmente existen algunos microarrays de cDNA para diversas especies animales incluyendo algunos peces teleósteos. Considerando la variedad de especies en cultivo y la gran cantidad de modelos experimentales, sería interesante desarrollar proyectos de secuenciación de ESTs específicas de especies de peces de interés comercial, favoreciendo así el desarrollo de nuevos microarrays.

En el presente capítulo nos ocuparemos de la aplicación de estas técnicas genómicas al estudio de la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades, centrándonos exclusivamente en la especie susceptible. La caracterización de los factores celulares y extracelulares de virulencia que juegan un papel significativo en el proceso infeccioso se detalla en el capítulo 17.

2. SISTEMA INMUNE DE PECES TELEÓSTEOS

La respuesta inmunitaria implica el reconocimiento del patógeno o material extraño seguido del desarrollo de una respuesta para eliminarlo (MALE y ROITT 1996). Los peces teleósteos son, en términos evolutivos, el grupo animal más primitivo con un sistema inmune completo. Presentan mecanismos de defensa inespecíficos y específicos similares a los de mamíferos. A pesar de que estos animales están en íntimo contacto con su ambiente, el cual generalmente posee grandes concentraciones de microorganismos, en condiciones normales el pez se mantiene en buen estado de salud, defendiéndose contra estos invasores potenciales mediante un sistema complejo de mecanismos de defensa.

Estos mecanismos pueden dividirse en inespecíficos o innatos y en específicos o adaptativos. Aunque lo habitual a la hora de describir el sistema inmune es hacer esta «división», cada vez hay más evidencias tanto en peces como en mamíferos, de que ambos mecanismos se combinan para mantener un máximo nivel de inmunocompetencia del hospedador. La respuesta innata generalmente precede a la adaptativa, activando y determinando la naturaleza de esta última



y coopera en el mantenimiento de la homeostasis (FEARON y LOCKSLEY 1996; FEARON 1997; LO *et al.* 1999; MEDZHITOV y JANEWAY 2000; DIXON y STET 2001). Los mecanismos de defensa **inespecíficos** engloban aquellos que se desencadenan sin necesidad de un contacto previo o un reconocimiento anterior del agente invasor, dando una respuesta rápida frente a una gran variedad de estímulos (BAYNE y GERWICK 2001; BAYNE *et al.* 2001; ELLIS 2001; RAUCH *et al.* 2006). La inmunidad innata se caracteriza por presentar una serie de receptores de reconocimiento de patrones codificados en la línea germinal, los cuales reconocen dos tipos de patrones moleculares (MAGNADÓTTIR 2006), por un lado los asociados a patógenos (PAMPs) como las glicoproteínas y lipopolisacáridos (LPS) de bacterias y hongos, ADN bacteriano, ARN viral y otras moléculas que no se encuentran normalmente en la superficie de los organismos multicelulares (JANEWAY 1989; MEDZHITOV y JANEWAY 1998, 2002; ELWARD y GASQUE 2003). Por otro lado, aquellos patrones moleculares del propio hospedador, que son el resultado del daño tisular debido a la infección o trauma, cambios necróticos o muerte celular programada natural, pero que no se expresan normalmente en la superficie celular, como el ADN y ARN del hospedador o las proteínas de *heat shock* y otros chaperones (MATZINGER 1998). Los mecanismos de defensa **específicos** sólo se encuentran en los vertebrados y se desatan frente a un estímulo concreto con el que el hospedador ha tenido contacto anteriormente. Esta respuesta, que mejora con el encuentro sucesivo con el mismo patógeno, es altamente específica para un patógeno particular, de tal manera que el reconocimiento de epítomos antigénicos es prácticamente ilimitado (DU PASQUIER 2001). Por lo tanto, las dos características más importantes de la respuesta inmunitaria adaptativa son la especificidad y la memoria (MALE y ROITT 1996).

2.1. Mecanismos de defensa inespecíficos

Los mecanismos de defensa inespecíficos en los peces constituyen su primera línea de defensa y es la única que presentan los invertebrados, de ahí su importancia en la protección de estos organismos. Están constituidos por **barreras físicas, factores humorales y células del sistema inmune innato**.



Las barreras físicas están integradas por las escamas, las superficies mucosas de piel, branquias y tracto gastrointestinal y la epidermis (INGRAM 1980; SHEPHARD 1994; ELLIS 2001). Estos mecanismos dificultan la entrada de los distintos agentes patógenos al interior del pez, constituyendo una barrera física y química importante entre el pez y el medio externo. El mucus de los peces, producido en función del grado de infección y estrés, posee gran diversidad de moléculas entre las que destacan la lisozima, enzimas proteolíticas, proteína C-reactiva, proteínas del complemento, péptidos antimicrobianos e incluso inmunoglobulinas (HJELMELAND *et al.* 1983; BRAUN *et al.* 1990; ALEXANDER y INGRAM 1992; ROMBOUT *et al.* 1993; ARANISHI y NAKANE 1997; ROMBOUT y JOOSTEN 1998; FAST *et al.* 2002; GRABOWSKI *et al.* 2004; DELAMARE-DEBOUTTEVILLE *et al.* 2006).

Los factores humorales están constituidos tanto por sustancias solubles que se encuentran en los fluidos internos del pez, como por moléculas expresadas como receptores en la superficie de las células del sistema inmune. Según su actividad o los patrones moleculares que reconocen, los factores humorales inespecíficos pueden clasificarse en:

- Inhibidores del crecimiento: actúan generalmente eliminando nutrientes esenciales para el microorganismo o interfiriendo en su metabolismo. El hierro por ejemplo es un elemento esencial para el metabolismo bacteriano sin embargo, su disponibilidad en los tejidos de los vertebrados es extremadamente baja, ya que es secuestrado por una proteína sanguínea de gran afinidad por el hierro denominada transferrina (YANO 1996; LANGSTON *et al.* 1998, 2001; BAYNE y GERWICK 2001; BAYNE *et al.* 2001; ELLIS 2001), la cual es también un activador de macrófagos (STAFFORD *et al.* 2001; STAFFORD y BELOSEVIC 2003). Además, ha sido demostrado que fragmentos proteolíticos de la transferrina, pero no la proteína completa, son capaces de inducir la producción de óxido nítrico (NO), que es también un potente agente bactericida, en cultivos de macrófagos de goldfish estimulados con LPS (STAFFORD *et al.* 2001). También están involucradas en el secuestro del hierro proteínas como la hepcidina, haptoglobina, hemopexina e intelectina. Su regulación positiva en un estudio reciente con truchas



infectadas con *Vibrio anguillarum*, ha sugerido la importancia de las proteínas de la fase de respuesta aguda en la respuesta inmune de truchas frente a la bacterina de *V. anguillarum* (GERWICK *et al.* 2007). Por otro lado, el interferón es también un inhibidor del crecimiento, pero viral en este caso, al inducir la expresión de proteínas antivirales.

- Inhibidores de proteasas: muchas bacterias producen enzimas proteolíticas (proteasas) que digieren los tejidos del hospedador para ser aprovechados como fuente de aminoácidos. Por su parte, los peces generan inhibidores de estas enzimas o toxinas producidas por el agente patógeno, que restringen la capacidad de las bacterias para invadir y crecer en los tejidos del pez (HJELMELAND 1983; ALEXANDER e INGRAM 1992; DABROWSKI y CIEROSZKO 1994; BOWDEN *et al.* 1997; ARANISHI 1999; ARMSTRONG y QUIGLEY 1999; ELLIS 1999). Las más estudiadas son α 1-anti-proteasa, α 2-anti-plasmina y α 2-macroglobulina (α 2M) (ARMSTRONG y QUIGLEY 1999; BAYNE y GERWICK 2001; FUNKENSTEIN *et al.* 2005; HUTTENHUIS *et al.* 2006).
- Lectinas (aglutininas y precipitinas): las bacterias pueden adherirse al mucus y células epiteliales de su pez hospedador a través de carbohidratos de superficie llamados adhesinas (WANG y LEUNG 2000). Las lectinas tienen capacidad de adherirse a estos carbohidratos, impidiendo así su unión a las células epiteliales del pez y provocando opsonización, fagocitosis y activación del complemento (ARASON 1996). Han sido encontradas en huevos, mucus y suero de muchas especies de peces y, en los últimos años, la investigación se ha centrado en dilucidar el papel que juegan las lectinas en la defensa innata de diferentes especies de peces, sobre todo frente a bacterias (OTTINGER *et al.* 1999; VASTA *et al.* 2004; ENDO *et al.* 2006). La proteína C-reactiva (CRP) y la proteína amiloide del suero (SAP) son pentraxinas que pertenecen también a este grupo de las lectinas. Participan en la activación de la vía del complemento (JIANG *et al.* 1991; DE HAAS *et al.* 2000) y en el reconocimiento y eliminación de células apoptóticas (NAUTA *et al.* 2003). Algunas especies de peces parecen tener la CRP, como el bacalao y el pez gato o la SAP, como el salmón, el fletán o el pez lobo, mientras que otras especies como la platija y la trucha,



parecen presentar al igual que en vertebrados, ambas proteínas (WHITE *et al.* 1981; LUND y OLAFSEN 1998).

- Complemento: es un sistema que comprende unas 35 proteínas plasmáticas que sintetizadas como precursores y una vez activadas, participan en la destrucción de los patógenos, principalmente bacterias. Los productos resultantes de su activación son capaces de provocar la lisis de los patógenos celulares o de atraer células del sistema fagocítico al lugar donde se encuentra el patógeno. En los peces, el complemento se encuentra principalmente en el suero, pudiendo estar presente en las secreciones del mucus (YANO 1996). El interés de los investigadores en su evolución, la regulación de los genes que codifican estas proteínas (sobre todo el C3), su activación bien por la vía alternativa, clásica o de las lectinas y su ontogenia, ha crecido mucho en los últimos años (SUNYER y LAMBRIS 1998; SUNYER *et al.* 1998; SUNYER *et al.* 2003; LI *et al.* 2004; BOSHRA *et al.* 2006; ENDO *et al.* 2006; LOVOLL *et al.* 2006; NONAKA y KIMURA 2006; OVERTURF y LAPATRA 2006; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.* 2007a).
- Péptidos antimicrobianos: son péptidos de bajo peso molecular que tienen propiedades bactericidas frente a diferentes patógenos. Se considera que juegan un papel clave en la defensa del hospedador frente a la infección (JIA *et al.* 2000; SILPHADUANG *et al.* 2006). Actualmente se han aislado varios péptidos de diferentes especies, entre los cuales se encuentran las pleurocidinas (MASON *et al.* 2006), las piscidinas (NOGA y SILPHADUANG 2003), catelicidinas (CHANG *et al.* 2005, 2006), moléculas tipo defensina (ZOU *et al.* 2007) y otros (SMITH *et al.* 2000; ZHANG *et al.* 2004).
- Enzimas líticas (lisinas): actúan solas o en cascada y son importantes elementos de defensa, sobre todo contra bacterias. Dentro de este grupo se encuadran hidrolasas, como la lisozima y la quitinasa; catepsinas; la vía lítica del complemento y otras enzimas hemolíticas y bacteriolíticas (ALEXANDER e INGRAM 1992). La lisozima es un parámetro muy importante de defensa inmune en invertebrados y vertebrados. En los peces está presente en muchos tejidos y secreciones, especialmente en aquellos más expuestos a patógenos, como las superficies mucosas de piel, branquias y



tracto gastrointestinal (FLETCHER y WHITE 1973; FÄNGE *et al.* 1976; GRINDE *et al.* 1988; GRINDE 1989; LIE *et al.* 1989). La lisozima lisa la capa de peptidoglucano presente en la pared celular bacteriana, hidrolizando el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina (puentes glicosido β -[1,4]). Es también una opsonina y activa el complemento y los fagocitos (JOLLES y JOLLES 1984; GRINDE 1989; YOUSIF *et al.* 1994). MURRAY y FLETCHER (1976), mediante estudios histoquímicos detectaron la lisozima en monocitos y neutrófilos de la platija, por lo cual se han propuesto como las células productoras de esta enzima. Aunque se asoció inicialmente en la defensa frente a bacterias Gram positivas, las Gram negativas pueden ser también lisadas por esta enzima.

- «Anticuerpos naturales»: aunque los anticuerpos (inmunoglobulinas) son un parámetro de la inmunidad adquirida como se verá más adelante, los «anticuerpos naturales» son también componentes del sistema innato (MAGNADÓTTIR 2006). Se producen en ausencia de reorganizaciones génicas y sin aparente estimulación específica de antígeno. En mamíferos, estos anticuerpos son polireactivos y muestran baja afinidad por varios epítopos propios, como los ácidos nucleicos, la miosina, la tiroglobulina y las proteínas de *heat shock*. Sin embargo, presentan afinidad por patrones moleculares no propios como el LPS y productos parasíticos y virales (AVRAMEAS y TERNYCK 1995; CASALI y SCHETTINO 1996; LACROIX-DESMAZES *et al.* 1998; BOHN 1999; PASHOV *et al.* 2002). Su función principal es el mantenimiento de la homeostasis, la eliminación de células apoptóticas (no producidas en base a una respuesta inmune) y en la defensa frente a tumores (MEYORACH *et al.* 1998; CHOW *et al.* 1999; BOES 2000). Los anticuerpos naturales son un fenómeno bien conocido en peces y se ha demostrado que juegan un papel importante en la inmunidad innata y adquirida, en la defensa frente a bacterias y virus (VILAIN *et al.* 1984; GONZÁLEZ *et al.* 1988, 1989; MAGNADÓTTIR *et al.* 1999, 2001, 2002; SINYAKOV *et al.* 2002).
- Citoquinas: son moléculas de señal que conforman una red que controla y coordina las respuestas de la inmunidad innata y adquirida. Su importancia es tal que le hemos dedicado un subapartado dentro de este apartado del sistema inmune.



Este listado incluye los parámetros humorales más representativos para una clasificación determinada, que está en cambio constante a medida que avanzan los estudios inmunológicos en peces. Además no se descarta que nuevas proteínas y péptidos se añadan a esta lista, no sólo debido a que se descubren nuevas moléculas (péptidos antibacterianos, antivirales o antifúngicos), sino también a que se describen cada vez más moléculas, cuyo funcionamiento está relacionado directa o indirectamente con la respuesta inmune (fosfolipasas y perforinas, por ejemplo) (BAYNE *et al.* 2001).

Las células del sistema inmune innato incluyen las que realizan dos tipos de actividades de defensa de forma inespecífica: la fagocitosis y las reacciones de citotoxicidad. Las células responsables de la fagocitosis (internalización y destrucción de agentes patógenos o partículas extrañas) en los peces, son las células pertenecientes a la serie monocito-macrófago y los granulocitos neutrófilos (FRØYSTAD *et al.* 1998; NEUMANN *et al.* 2001), que se conocen como células fagocíticas «profesionales». A su vez desempeñan una función esencial como células accesorias en la iniciación y regulación de la respuesta inmunitaria específica (SUZUKI y LIDA 1992; LAMAS y ELLIS 1994). Estas células son capaces de fagocitar agentes infecciosos sin necesidad de un contacto previo, aunque se ha observado una mayor actividad fagocítica en macrófagos procedentes de peces inmunes, probablemente debido a la opsonización (VAN MUISWINKEL 1995). Estudios recientes han sugerido por primera vez en peces teleósteos, que ambos tipos celulares juegan diferentes papeles en el reconocimiento y eliminación de patógenos y en la regulación de la respuesta adaptativa (SEPULCRE *et al.* 2007). Por otro lado, las células encargadas de la citotoxicidad son las células citotóxicas no específicas (NCC) (EVANS *et al.* 2001). Además también participan en la defensa innata las células epiteliales y dendríticas (PRESS *et al.* 1994; DALMO *et al.* 1996; GANASSIN y BOLS 1996).

La fagocitosis se inicia con el contacto partícula-fagocito que puede darse por colisión al azar o activamente mediante quimiotaxis, luego la partícula se interioriza a través de la emisión de pseudópodos formando vesículas de endocitosis. Posteriormente ocurre la formación de fagolisosomas por fusión con los lisosomas y por último, la muerte y digestión intracelular de la partícula interiorizada (ESTEBAN y MESEGUER 1994). El



proceso de fagocitosis lleva asociado la producción de radicales intermedios reactivos de oxígeno (ROIs) en un proceso caracterizado por el consumo rápido de oxígeno que se conoce como estallido respiratorio y la producción de óxido nítrico (NO) y otros intermediarios de nitrógeno reactivos (RNI) como los peroxinitritos, que en los peces constituyen un potente agente bactericida (SECOMBES 1996). Durante el estallido respiratorio, el oxígeno es reducido a anión superóxido (O_2^-) mediante la acción de la NADPH oxidasa. Una parte del O_2^- se disocia subsecuentemente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) bien espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (SOD) (ABBAS *et al.* 1995) y en radical hidroxilo (OH^\cdot). La producción de los radicales libres de oxígeno ha sido considerada una importante vía bactericida dentro de los fagocitos de mamíferos (BABIOR 1988). En peces la importancia de estos mecanismos aerobios está ampliamente reconocida (CHUNG y SECOMBES 1988; ROSZELL y ANDERSON 1993; SHARP y SECOMBES 1993; LEIRO *et al.* 2000; ORTUNO *et al.* 2000; TAFALLA y NOVOA 2001; SRINIVASA RAO *et al.* 2001; KWON *et al.* 2002).

La síntesis de NO suele iniciarse tras la activación de los macrófagos por LPS bacterianos o por citoquinas pro-inflamatorias como el interferón gamma ($IFN-\gamma$), factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) o las interleuquinas (IL) (NATHAN 1992). El NO se genera por oxidación de la arginina en una reacción catalizada por la forma inducible de la enzima sintasa de NO (iNOS) (HIBBS *et al.* 1987). En algunos casos también se ha detectado producción de NO por parte de macrófagos no estimulados a través de la sintasa constitutiva de NO (cNOS) (MILES *et al.* 1998). La producción de NO en peces se ha inducido a través del tratamiento de macrófagos con LPS sólo o en combinación con el factor activador de macrófagos (MAF), de acuerdo con los requerimientos de cada especie (NEUMANN *et al.* 1995; YIN *et al.* 1997; MULERO y MESEGUER 1998). En el caso del rodaballo (*Scophthalmus maximus* o *Psetta maxima*), estudios realizados por TAFALLA y NOVOA (2000) mostraron que una combinación de LPS con el $TNF-\alpha$ recombinante humano (hr $TNF-\alpha$) causa un aumento significativo en la producción de NO. Diversos estudios han demostrado que el NO es una molécula altamente tóxica capaz de causar la inhibición del crecimiento de virus (TAFALLA *et al.* 1999, 2001a) y bacterias patógenas para peces (AKAIKE *et al.* 1998, CAMPOS *et al.* 2000).

Otro mecanismo inespecífico de defensa celular es la *citotoxicidad natural celular*. En peces, los trabajos realizados por Evans *et al.* desde los años 80 han demostrado que los tipos celulares que participan fundamentalmente en la citotoxicidad celular, son las células citotóxicas no específicas (NCC), las cuales comparten muchas propiedades con las células natural killer (NK) de mamíferos. En estos últimos, la citotoxicidad celular es llevada a cabo por linfocitos T activados, granulocitos, células de la serie monocito-macrófago y células NK (HERBERMAN y ORTALDO 1981; EVANS y JASO-FRIEDMANN 1992; MULERO *et al.* 1994). En peces, de la misma forma que en mamíferos, diferentes tipos celulares parecen estar además implicados en la citotoxicidad innata. En la carpa (*Cyprinus carpio*) y en la dorada (*Sparus aurata*), se ha observado que células tipo linfocitos, monocito-macrófagos y granulocitos tienen actividad citotóxica inespecífica frente a líneas celulares tumorales (MESEGUER *et al.* 1994; KURATA *et al.* 1995; CUESTA *et al.* 1999). En la tilapia (*Tilapia mossambica* x *Tilapia. honorum*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y dorada se ha demostrado citotoxicidad celular mediada por macrófagos (FAISAL *et al.* 1989). En el rodaballo se comprobó también la capacidad citotóxica de leucocitos aislados de riñón anterior y sangre frente a células RTG-2 de trucha (TAFALLA *et al.* 2001b). Al igual que en mamíferos, en peces teleósteos se ha demostrado que las principales vías utilizadas por las células «killer» son la exocitosis granular (KAUR *et al.* 2004; PRAVEEN *et al.* 2004) y las mediadas por la superfamilia del TNF (PRAVEEN *et al.* 2006).

2.2. Mecanismos de defensa específicos

Los peces como los mamíferos, poseen mecanismos de defensa específicos tanto humorales como celulares. Dentro de los **mecanismos humorales de defensa específica**, el más destacado es la producción de anticuerpos. Al igual que otros parámetros humorales, los anticuerpos están presentes en los fluidos internos del pez y en todas las superficies mucosas, que son la vía de entrada de la mayoría de los microorganismos y partículas no propias (DAVIDSON *et al.* 1993, 1997). Están capacitados para reaccionar con las adhesinas bacterianas, dificultando así su entrada en hospedador. Pueden neutralizar muchas toxinas producidas por los patógenos (GUDMUNDSDÓTTIR y MAG-



NADÓTTIR 1997). Tienen capacidad de bloquear la invasión de patógenos que, como *Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida*, han desarrollado mecanismos evasivos de los sistemas de defensa del hospedador, al ser capaces de invadir células no fagocíticas (ELLIS 1999). Además los anticuerpos adheridos a la pared bacteriana pueden activar la vía clásica del complemento (ELLIS 1999). La producción de anticuerpos en peces ocurre de una forma análoga a la descrita en mamíferos (KAATARI 1992). Sin embargo, en los peces el aumento del título de anticuerpos tras un segundo contacto con el antígeno, se debe estrictamente a la expansión del pool de linfocitos B precursores de la memoria, pero no a un aumento de la capacidad de los linfocitos B para producir anticuerpos de alta afinidad (IgG), tal y como sucede en los mamíferos.

Estudios moleculares y bioquímicos indicaron inicialmente que los peces presentaban principalmente anticuerpos del isotipo IgM, con propiedades físico-químicas y de organización de gen semejantes a las IgM de mamíferos (WILSON y WARR 1992). Sin embargo, en teleostes, aparte de las IgM (WARR 1995) se han descrito también las IgD y recientemente los nuevos isotipos IgZ de pez cebra, IgT de trucha, una quimera IgM-IgZ de carpa y un isotipo de fugu, cuya estructura y análisis de expresión, sugieren diferencias con los isotipos del locus IgH previamente descritos.

Los **mecanismos celulares de defensa específica**, al igual que en mamíferos, están representados por poblaciones de linfocitos denominados T y B. La exposición a un antígeno conlleva la estimulación de un pequeño grupo de estos linfocitos que reconocen dicho antígeno mediante receptores específicos. Este reconocimiento provoca un cambio en esta población linfocitaria, de tal manera que en los sucesivos encuentros con el antígeno la respuesta es cada vez mayor y más rápida. En los peces, los linfocitos constituyen la población mayoritaria de leucocitos siendo los principales órganos linfoides el timo, el órgano epigonal, el riñón anterior y el bazo (FÄNGE 1982).

Los linfocitos B son los responsables de la secreción de anticuerpos y se localizan preferentemente en los tejidos linfoides de bazo y riñón, también en la sangre, intestino y corazón (DAVIDSON *et al.* 1993). Se definen al igual que en mamíferos, como linfocitos que expresan Ig de superficie (Ig+) y secretan anticuerpos específicos en respuesta



a un estímulo antigénico (ARKOOSH y KAATARI 1991). Los linfocitos B requieren, en respuesta a los antígenos timodependientes (TD), la interacción de los linfocitos T y de los macrófagos, mientras que en respuesta a los antígenos timo independiente (TI) solamente se requiere la cooperación de los macrófagos (VALLEJO *et al.* 1992). Si bien la función fagocitaria ha sido siempre atribuida a las células fagocíticas «profesionales», monocito-macrófagos y granulocitos (neutrófilos), estudios recientes han demostrado que las células B de los peces teleosteos presentan actividad fagocítica *in vivo* e *in vitro*, llevando a la formación de fagolisosomas y digestión de las partículas ingeridas. Estos interesantes resultados indican la participación de las células B en la inmunidad innata de estos animales primitivos y, apoyan la idea de la evolución a partir de un tipo celular fagocítico ancestral. Además, proporcionan un marco evolutivo para entender la estrecha relación entre los linfocitos B y macrófagos de mamíferos (LI *et al.* 2006).

Los linfocitos T son los responsable de la muerte celular y de la regulación de la actividad de otras células inmunocompetentes mediante la secreción de citoquinas. Se ha demostrado que los linfocitos T de peces presentan características semejantes a las detectadas en mamíferos, tales como la proliferación en respuesta a la estimulación por mitógenos celulares T, como son la fitohemaglutinina (PHA) y la concavalina A (ConA) (CLEM *et al.* 1985).

2.3. Citoquinas

Existen evidencias genéticas y funcionales de que en peces, al igual que en mamíferos, existe una red de moléculas de señal (citoquinas y quimoquinas), que controlan y coordinan la respuesta inmune innata y adquirida. Además, regulan muchos otros procesos biológicos importantes, incluyendo el crecimiento y la activación celular, la inflamación, la reparación tisular, la fibrosis y la morfogénesis. Se han publicado numerosos trabajos sobre citoquinas en peces y la investigación en este campo sigue creciendo. Citamos aquí algunos de los estudios más representativos acerca del papel que juegan dentro del sistema inmune (SECOMBES *et al.*, 1999, 2001; SCAPIGLIATI *et al.* 2001; SECOMBES 2002). Son proteínas, generalmente glicoproteínas, de bajo peso molecular (15-25 KDa) secretadas por las células del sistema inmune. Actúan a unas



concentraciones muy bajas sobre células del propio sistema inmune, de forma autocrina (reconociendo un receptor en la membrana de la propia célula que lo secretó) o paracrina (actuando sobre otra célula distinta a la secretora, pero sin necesidad de un transporte de largo recorrido) (HAMBLIN 1993). Su actividad es generalmente pleiotrópica (regulando distintas funciones), produciéndose además una gran cantidad de sinergias y antagonismos entre ellas. La clonación molecular de varias citoquinas en diferentes grupos animales ha permitido su utilización directa como inmunoestimulantes y adyuvantes de vacunas en sanidad humana y animal (LIN *et al.* 1995; LOWENTHAL *et al.* 1999). Además, la caracterización de los genes que cifran dichas citoquinas, permite desarrollar tratamientos efectivos para mejorar la resistencia de las especies de uso agroalimentario, tanto frente a enfermedades infecciosas como a estrés abiótico.

A pesar de ser un grupo de proteínas heterogéneo desde el punto de vista químico, las citoquinas comparten propiedades comunes. En peces, la investigación sobre estas moléculas humorales se ha centrado en las interleuquinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN), los factores transformadores de crecimiento (TGF), los factores inhibidores de la migración (MIF), los factores estimuladores de colonias (CSF) y las quimoquinas.

Las interleuquinas (ILs) engloban a un grupo de citoquinas con efectos sobre los leucocitos. La IL-1 β fue una de las primeras citoquinas descritas (DINARELLO 1994) y también una de las más estudiadas y revisadas en peces (BIRD *et al.* 2002; HUISING *et al.* 2004; KAISER *et al.* 2004; SCAPIGLIATI *et al.* 2004; SUBRAMANIAM *et al.* 2004). Esta proteína inicia o aumenta la expresión de una gran cantidad de genes no estructurales, particularmente otras citoquinas, que se expresan de forma característica durante la inflamación (DINARELLO 1994; BIRD *et al.* 2002). Además, participan en la proliferación y maduración de muchos tipos celulares inmunes (DINARELLO 1997). Los trabajos realizados hasta la fecha sobre clonación y expresión de estas citoquinas en peces, serán revisados en los siguientes apartados de este capítulo.

Los factores de necrosis tumoral (TNFs) tienen importantes efectos pleiotrópicos implicando inflamación, apoptosis, proliferación celular y estimulación del sistema inmune. El TNF sólo ha sido aislado



de mamíferos y peces. Mientras que hay dos formas en mamíferos (TNF α y β), en peces parece que sólo existe una forma, que es similar en estructura y organización genómica al TNF- α de mamíferos. El TNF- α desempeña varias actividades terapéuticas, que incluyen inmunestimulación, resistencia a agentes infecciosos, resistencia a tumores (AGGARWAL y VILCEK 1991; VILCEK y LEE 1991), regulación del sueño (KRUEGER *et al.* 1998) y desarrollo embrionario (WRIDE y SANDERS 1995). Sin embargo, el principal papel del TNF- α parece ser como mediador en la resistencia frente a infecciones parasitarias, bacterianas y virales (CZARNIECKI 1993; GOLDFELD y TSAI 1996; STEINSHAMN *et al.* 1996). GOETZ *et al.* (2004a) han realizado una revisión reciente sobre los factores de necrosis tumoral y también se han llevado a cabo estudios funcionales en rodaballo, con la proteína recombinante del TNF- α (ORDÁS *et al.* 2007).

Las ILs y los TNFs forman parte de una cascada enzimática en la que son liberadas otras muchas citoquinas, que sirven como potentes atrayentes para inducir la migración de neutrófilos y macrófagos al sitio de la infección (SECOMBES *et al.* 2001).

Los interferones (IFNs) son citoquinas que inducen un estado antiviral en las células y juegan un papel principal en la defensa frente a infecciones virales en vertebrados (BOUDINOT *et al.* 2001). No existen en la actualidad medidas terapéuticas eficaces para combatir las enfermedades virales de los peces de interés en acuicultura, por eso una gran cantidad de estudios han sido dirigidos a conocer el mecanismo de actuación del sistema de los IFNs en peces. La actividad del IFN se conoce en peces desde 1965 (GRAVELL y MALSBERGER 1965) y desde entonces se ha detectado en células y órganos de numerosas especies de peces, tras una infección viral o por tratamiento con ARN de doble cadena (dsARN) (ver el trabajo de ROBERTSEN (2006) para una revisión sobre el sistema IFN en peces teleósteos). Sin embargo, los primeros trabajos sobre genes de IFN clonados de peces no se publicaron hasta el 2003, como se verá en el siguiente apartado. Existen dos familias de IFNs (tipo I y tipo II) que se distinguen en su secuencia nucleotídica, su estructura proteica y sus propiedades funcionales (BOUDINOT *et al.* 2001; KONTSEK *et al.* 2003; PESTKA *et al.* 2004). Los IFNs de tipo I incluyen los IFNs α y β , los cuales son inducidos por virus en la mayoría de las célu-



las, mientras que el IFN tipo II es idéntico al IFN- γ y es producido por las células NK y los linfocitos T en respuesta a IL-12, IL-18, mitógenos o antígenos (SECOMBES *et al.* 1996; VILCEK y SEN 1996; BOUDINOT *et al.* 2001).

Los IFNs de tipo I: en peces se han encontrado al menos dos genes que codifican para el IFN tipo I (ZOU, comunicación personal). El hecho de que no puedan ser clasificados como IFN α y β es debido a que en mamíferos los IFNs α y β parece que se han originado por duplicación a partir de un progenitor, después de la divergencia de las aves hace 250 millones de años (ROBERTS *et al.* 1998). Los IFNs de tipo I son inducidos en las células en respuesta a los productos intermediarios (dsARN) de la replicación viral (JACOBS y LANGLAND 1996; GOODBOURN *et al.* 2000). Una vez en el torrente circulatorio se unen al receptor de IFN α/β presente en todas las células nucleadas (BIRON y SEN 2001) y desencadenan a través de la vía JAK-STAT la transcripción de cientos de genes, algunos de los cuales codifican proteínas antivirales. Tal es el caso de la proteína kinasa R dependiente de dsARN (PKR), la 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS), la adenosina deaminasa específica de ARN (ADAR) y la proteína Mx GTP-asa (MEURS *et al.* 1990, KOROMILAS *et al.* 1992; ZURCHER *et al.* 1992; THIMME *et al.* 1995; SECOMBES *et al.* 1996; LEONG *et al.* 1998; BOUDINOT *et al.* 2001; ELLIS 2001). Además del dsARN, la transcripción de IFN puede ser inducida por otros ácidos nucleicos virales (ssARN y motivos CpG de ADN bacteriano y viral) y poly I:C, que son reconocidos por los Toll Like receptors (TLRs) (ALEXOPOULOU *et al.* 2001; DIEBOLD *et al.* 2004; HEIL *et al.* 2004; LUND *et al.* 2004; TABETA *et al.* 2004). Aunque se sabe todavía poco sobre el sistema de señal del IFN en peces, la identificación de varios factores reguladores de IFN (IRFs), receptores de IFN, TLRs, diferentes miembros de la vía JAK-STAT y proteínas inducidas por el IFN tipo I (sobre todo las proteínas Mx), sugiere que este mecanismo está muy bien conservado en peces y mamíferos.

Los IFNs de tipo II (IFN- γ): son producidos como decíamos arriba exclusivamente por células del sistema inmune, actúan en etapas más tardías de la respuesta inmune (SCHRODER *et al.* 2004) y juegan un papel fundamental en la inmunidad adaptativa mediada por células (BIRON y SEN 2001). El IFN- γ se une a un receptor distinto del que utilizan



los IFNs de tipo I y también es diferente la vía de señales, aunque se solapa con la JAK-STAT (BOEHM *et al.* 1997; BOUDINOT *et al.* 2001). De forma similar a los IFNs de tipo I, el IFN- γ puede proteger a las células de infecciones virales, al inducir la expresión de las proteínas antivirales PKR, 2-5A sintetasa y ADAR (BOEHM *et al.* 1997). Es además, a diferencia del IFN- α/β , un activador clave de macrófagos, al aumentar su capacidad microbicida frente a bacterias, protozoos y virus (GRAHAM y SECOMBES 1990; MACMICKING *et al.* 1997; BIRON y SEN 2001; SHTRICHMAN y SAMUEL 2001; MACMICKING 2004; SCHRODER *et al.* 2004). Además, promueve la presentación de antígenos al aumentar la expresión de los complejos MHC I y II (BOEHM *et al.* 1997). Tiene también un amplio rango de propiedades inmunomodulatorias, al incrementar la expresión de varios factores de transcripción y citoquinas (FARBER 1997). Finalmente, el IFN- γ dirige el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares, así como potencia la actividad de las células NK y regula las funciones de las células B (BIRON 1994; SCHRODER *et al.* 2004). Aunque tampoco existen estudios funcionales con el IFN- γ en peces, trabajos previos han demostrado la producción de un factor activador de macrófagos (MAF) con actividad de IFN- γ en trucha capaz de estimular funciones de los macrófagos, aunque pueden tener otras funciones reguladoras del sistema inmune (SECOMBES 1992). La actividad MAF se caracteriza por causar un aumento significativo del estallido respiratorio, la fagocitosis, actividad bactericida y emisión de pseudópodos de macrófagos. Esta actividad se ha conseguido en sobrenadantes de leucocitos estimulados con ConA y principalmente con una combinación de ConA con el éster de forbol (PMA) (DUCHIRON *et al.* 2002a y b; SARMENTO *et al.* 2004). Además, se han clonado en peces teleósteos la proteína NOS2, subunidades de la oxidasa fagocítica, la proteína de unión a guanilato (que es el principal efector antiviral del IFN- γ en mamíferos) y diversas quimoquinas inducidas por IFN- γ . A medida que se clonen y describan más efectores relacionados con el IFN- γ , estaremos en disposición de aprender como se regula la transcripción de estos genes en peces teleósteos.

Los factores transformadores del crecimiento (TGFs) se subdividen en los TGF- β *sensu stricto*, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) y las activinas, aunque todas ellas parecen compartir



características comunes en sus mecanismos de transducción de señales (HELDIN *et al.* 1997). Los TGF- β s constituyen una subfamilia de moléculas relacionadas y codificadas por genes diferentes, a los que en vertebrados superiores se denomina TGF- β -1-5, con una alta homología en la secuencia de aminoácidos. Los miembros de esta subfamilia son proteínas multifuncionales y pleiotrópicas, que están implicadas en el desarrollo, reparación y remodelado de tejidos y hematopoyesis. Incrementan la producción y secreción de las proteínas de matriz extracelular (ECMs) e inhibidores de proteasas. Además, juegan numerosos papeles en la función y desarrollo del sistema inmune, mostrando generalmente actividades inmunosupresoras y antiinflamatorias (WILLIAMS *et al.* 1996). El TGF- β -1 es una proteína producida tanto por las células T activadas por antígeno, como por los fagocitos mononucleares activados por LPS. Tiene un claro efecto regulador supresor como el resto de los miembros de la subfamilia, ya que su función inmunitaria principal es inhibir la proliferación de células T y la activación de macrófagos. A pesar de que hay muy pocos estudios en peces y otros vertebrados inferiores, los datos recogidos hasta la fecha apuntan a que los TGFs son las citoquinas más ancestrales caracterizadas a nivel molecular, que tienen actividad tanto en protóstomos como en deuteróstomos (HERPIN *et al.* 2004).

Los factores inhibidores de la migración (MIF). Mediante la estimulación de leucocitos de carpa con ConA se produjo un sobrenadante con un efecto supresor sobre la migración de leucocitos de riñón anterior (SECOMBES 1992). Además, en la anguila (*Anguilla japonica*) se ha demostrado que sobrenadantes de leucocitos de bazo, riñón o sangre estimulados con mitógenos, inhiben la migración de células de peritoneo de cerdo (SONG *et al.* 1989).

Los factores estimuladores de colonias (CSFs) incluyen el CSF de macrófagos (M-CSF), el CSF de granulocitos (G-CSF), el CSF de granulocitomacrófagos (GM-CSF) y el CSF «multi», mejor conocido como IL-3 o multi-CSF. Se trata de factores pleiotrópicos con una gran variedad de funciones biológicas en diferentes tejidos y células, que actúan en una red muy bien orquestada con otras citoquinas. Presentan además una gran redundancia, al ser capaces de ejercer funciones similares y solapantes en células específicas (REDDY *et al.* 2000). En general, median la supervi-



vencia, proliferación, diferenciación y modulación funcional (quimiotaxis, degranulación, activación, adhesión, citotoxicidad, cambios fenotípicos del ARNm), de varias poblaciones de células sanguíneas maduras y sus precursores (HORIGUCHI *et al.* 1987; RAPPOLEE y WERB 1992; BOCIEK y ARMITAGE 1996; ALEXANDER 1998). Su papel dentro del sistema inmune es vital, al mantener la competencia inmune a través de la conservación del número adecuado de células sanguíneas. En particular regulan el desarrollo de las células mieloides, desde sus progenitores hematopoyéticos hasta las células efectoras maduras del sistema inmune (BARREDA *et al.* 2004).

Las quimoquinas son una familia multifuncional de citoquinas que induce la migración celular al lugar de la infección o lesión. Las quimoquinas se dividen funcionalmente en dos categorías: por un lado, las que se secretan constitutivamente, son homeostáticas y están implicadas entre otras funciones en el tráfico de linfocitos (FERNÁNDEZ y LOLIS 2002) y por otro lado, las que son producidas durante una infección o como consecuencia de un proceso inflamatorio, dirigiendo la migración de linfocitos al lugar de la infección o lesión. Estas últimas pueden además activar las células del sistema inmune y comenzar el proceso de reparación de heridas (LAING y SECOMBES 2004a). Las quimoquinas se dividen en 4 subfamilias en función de su estructura molecular: CXC (α), CC (β), C (γ) y CX₃C (δ) (MURPHY *et al.* 2000). Las quimoquinas CXC a su vez se subdividen en función de si poseen o no el dominio ELR. Las ELR⁺ promueven en términos generales la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales y la consiguiente migración al sitio de la inflamación, a través de un gradiente de quimoquinas asociadas a proteínas de superficie y matriz celular (STREITER *et al.* 1995). Las ELR⁻ atraen linfocitos y monocitos y presentan escasa atracción por los neutrófilos (OPPENHEIM *et al.* 2000). Aunque las actividades dentro de este grupo son muy variables, la mayoría son angiostáticas y poseen propiedades anti-angiogénicas. Las quimoquinas CC atraen fundamentalmente células mononucleadas, bien para mediar en procesos homeostáticos o pro-inflamatorios. Las quimoquinas C atraen a linfocitos, pero no a monocitos o neutrófilos (KELNER *et al.* 1994). Las quimoquinas CX₃C tienen, en su forma soluble, una actividad de atracción muy potente hacia células T y monocitos y en su forma unida a membrana, promueve la adhesión a estos leucocitos (BAZAN *et al.* 1997).



La mayor parte de la información disponible sobre quimoquinas procede de estudios en mamíferos (como la anteriormente descrita), aunque el interés por estas proteínas ha crecido también en peces en los últimos años. Como consecuencia se han descrito algunas secuencias con alta homología a las quimoquinas de mamíferos y/o aves, pero no existen todavía estudios funcionales.

3. CLONACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INMUNE EN PECES MODELO Y DE INTERÉS COMERCIAL EN ESPAÑA Y OTROS PAÍSES

Una hipótesis que ha ganado en seguidores entre los inmunólogos comparados es que la respuesta innata en los vertebrados inferiores, constituye una importante forma de protección de estos animales contra los patógenos. La razón es básicamente la ineficiencia de la respuesta inmune adquirida, dado el estatus evolutivo y la naturaleza poiquiloterma de estos animales (MAGNADÓTTIR 2006). De hecho, los parámetros innatos se consideran relativamente independientes de la temperatura y más activos en el rango de bajas temperaturas en el que viven los peces. Sin embargo, los parámetros inmunes adquiridos, como la producción de anticuerpos y la actividad linfocitaria son más efectivos a temperaturas más altas (MILLER y CLEM 1984; BLY y CLEM 1992; LILLEHAUG *et al.* 1993; ALCORN *et al.* 2002). Ello se traduce en un repertorio limitado de anticuerpos y por tanto de capacidad de memoria y una proliferación linfocitaria muy lenta, comparada con la respuesta inmune no específica, que es prácticamente instantánea (Du PASQUIER 1982; ALEXANDER e INGRAM 1992; ELLIS 2001).

Por todas estas razones, el sistema inmune innato sirve como la primera línea de defensa contra los agentes patógenos y en este sentido los peces, una de las ramas más antiguas de los vertebrados desde el punto de vista evolutivo, poseen una respuesta inmune innata completa. A pesar de ello, se han clonado muy pocos genes relacionados con la respuesta inmune no específica en peces (BAYNE *et al.* 2001), pero este número ha crecido en los últimos años. A continuación presentamos una revisión de los genes «innatos y específicos» que se han



caracterizado hasta la fecha tanto en peces modelo, como en aquellos de interés en acuicultura en España y otros países. La mayor parte de estos estudios se basan en la clonación y caracterización de genes individuales, secuencia completa, relaciones evolutivas con respecto a otras especies, análisis de su expresión etc., aunque recientemente se ha iniciado el estudio de la expresión simultánea de genes (GOETZ *et al.*, 2004b; MACKENZIE *et al.* 2006; MARTIN *et al.* 2006).

Los salmónidos, especialmente la *trucha arco iris* (*Oncorhynchus mykiss*) es el grupo al que se ha dedicado más atención en el estudio de las bases moleculares de la respuesta inmune. Entre otros genes se han secuenciado y realizado estudios de expresión de la IL-1 β , la IL-6, la IL-11 y la IL-18 (KOUSOUNADIS *et al.* 2004; ZOU *et al.* 2004a; WANG *et al.* 2005; BENEDETTI *et al.* 2006; ILIEV *et al.* 2007; ROCA *et al.* 2007) y el TNF- α (ROCA *et al.* 2007). El interferón y genes relacionados como el Mx, han sido también objeto de estudio debido a la importancia de las enfermedades de etiología viral y la inexistencia de tratamientos eficaces. Así, se han caracterizado en trucha arco iris dos TLRs (REBL *et al.* 2007); factores reguladores de IFN (IRFs) (COLLET *et al.* 2003); proteínas Mx (TROBRIDGE y LEONG 1995; TROBRIDGE *et al.* 1997; COLLET *et al.* 2007); se ha demostrado la producción de un factor activador de macrófagos del tipo IFN- γ (GRAHAM y SECOMBES 1988; GRAHAM y SECOMBES 1990) y se han realizado clonación, estudios de expresión y de organización génica de la sintasa inducible de NO (iNOS) (WANG *et al.* 2001). Tanto en trucha como en salmón Atlántico (*Salmo salar*) se ha caracterizado la proteína de unión a guanilato inducida por IFN- γ en mamíferos (ROBERTSEN *et al.* 2006). Además se han secuenciado y realizado estudios de expresión de diversos genes de péptidos antimicrobianos (ZHANG *et al.* 2004; CHANG *et al.* 2005, 2006; ZOU *et al.* 2007), de los factores del complemento C4 y moléculas tipo C1 (BOSHRA *et al.* 2004), de las anafilatoxinas C3a (ROTLANT *et al.* 2004), del receptor del C3a (BOSHRA *et al.*, 2005) y de diversas quimoquinas (LAING y SECOMBES 2004b; MACKENZIE *et al.* 2004). Está también caracterizado el TGF- β (HARDIE *et al.* 1998) y se ha descrito una IgT (HANSEN *et al.* 2005). En cuanto a quimoquinas de trucha inducidas por IFN- γ , se han identificado una CXC del tipo CXCL8 (LAING *et al.* 2002a) y otra con homología del subgrupo CXCL9, CXCL10, CXCL11, de la cual parecen existir dos formas y que



es inducida en infecciones virales (LAING *et al.* 2002b; O'FARRELL *et al.* 2002). También se han caracterizado dos quimoquinas CC, CK1 (DIXON *et al.* 1998) y CK2 (LIU *et al.* 2002a). En el *salmón Atlántico* se han encontrado receptores para el β 1,3-glucano en macrófagos (ENGSTAT y ROBERTSEN 1994). También se ha secuenciado y estudiado la expresión del receptor de una lectina tipo C (SOANES *et al.* 2004) y se ha identificado en suero una lectina de unión a patógenos (EWART *et al.* 1999). Se ha clonado una proteína asociada al receptor de la IL-1 (STANSBERG *et al.* 2005). También los anticuerpos han sido objeto de estudio y se han clonado dos isotipos IgM (HORDVIK *et al.* 1992) y el isotipo IgD (HORDVIK *et al.* 1999). Se ha clonado, secuenciado y estudiado la expresión y actividad biológica de genes de IFN tipo I y proteínas inducidas por éste (ROBERTSEN *et al.* 1997, 2003; McBEATH *et al.* 2007) y se han identificado secuencias similares a las del IFN- γ (ROBERTSEN 2006). En los huevos del *salmón «Chinook»* (*Oncorhynchus tshawytscha*) se ha aislado, purificado y caracterizado parcialmente una lectina (VOSS *et al.* 1978).

No son demasiados los genes caracterizados de especies comerciales de interés en España, si lo comparamos con lo que se ha hecho en salmónidos, ya que el progreso en este campo es muy reciente. La Tabla 2 resume los genes clonados hasta la fecha en las principales especies de interés en acuicultura en España.

En dorada hasta ahora se han caracterizado genes inducidos por el interferón (α o γ) como son la proteína Mx o el factor regulador de interferón 1 (IRF-1) (TAFALLA *et al.* 2004; ORDÁS *et al.* 2006). Se ha comprobado que las infecciones virales son capaces de inducir la expresión de estos factores, poniendo en evidencia su posible papel en la respuesta frente a las mismas. SUNYER *et al.* (1997a y b) constatan la diversidad de formas funcionales del factor 3 del complemento, hecho descrito previamente en trucha. Se ha aislado y caracterizado también una lectina tipo F (CAMMARATA *et al.* 2007). También se han estudiado factores involucrados en la respuesta inmune y la inflamación como son el TNF (GARCÍA-CASTILLO *et al.* 2002; ROCA *et al.* 2007), la IL-1 o sus receptores (PELEGRIN *et al.* 2001; LÓPEZ-CASTEJÓN *et al.* 2007; ROCA *et al.* 2007) o el TGF (TAFALLA *et al.* 2003). Todos se expresan de forma constitutiva en distintos órganos del pez. En el caso del TNF, a diferencia



de mamíferos, su expresión no parece aumentar después de un tratamiento con sustancias como el LPS, que sí incrementan sin embargo la expresión de IL-1 (GARCÍA-CASTILLO *et al.* 2002) sin embargo, presenta funciones pro-inflamatorias y proliferativas cuando se administra *in vivo*, sugiriendo un papel similar al descrito en mamíferos (GARCÍA-CASTILLO *et al.* 2004). También existen evidencias de otros papeles de esta molécula no directamente inmunes, como son la regulación del tejido graso en esta especie (SAERA-VILA *et al.* 2007). También se ha caracterizado el TLR-9, con una elevada expresión fundamentalmente en los órganos relacionados con la respuesta inmune (bazo y riñón anterior) y en las barreras epiteliales mucosas. Sin embargo, su expresión no varió en bazo cuando los peces se infectaron con bacterias. Estos autores encontraron una segunda forma originada mediante splicing alternativo, cuyo significado biológico todavía está por aclarar (FRANCH *et al.* 2006). Recientemente, se ha caracterizado el MHC clase II cadena alfa, que se expresa constitutivamente en distintos tejidos, pero su expresión aumenta en células de riñón cuando éstas se incuban con bacterias o levaduras (CUESTA *et al.* 2006).

En rodaballo se han caracterizado al igual que en dorada, genes inducidos por interferón α , β y γ , como la proteína Mx y el IRF-1 (ABOLLO *et al.* 2005; ORDÁS *et al.* 2006). Recientemente, se han clonado el MHC clase II, α y β (ZHANG y CHEN 2006) y el TNF (ORDÁS *et al.* 2007). Se han realizado también aproximaciones a la expresión de determinados genes en el desarrollo como son la hepcidina (CHEN *et al.* 2007) y genes receptores de células T (TAYLOR *et al.* 2005).

En lenguado (*Solea senegalensis*), una especie de creciente interés en la acuicultura española, se ha caracterizado el gen de la proteína Mx, posiblemente implicada en la respuesta frente a virus (FERNÁNDEZ-TRUJILLO *et al.* 2006).

En lubina se ha realizado un considerable esfuerzo en la caracterización de genes implicados en la respuesta inmune en los últimos años. Así, se han caracterizado genes de caspasas implicadas en la apoptosis, como la caspasa 3 y la caspasa 9 (REIS *et al.* 2007a y b), el CD8 (BUONOCORE *et al.* 2006; PINTO *et al.* 2006), la hepcidina (RODRIGUES *et al.* 2006) o interleuquinas implicadas en la inflamación como la IL-1, la IL-10 y la IL-12 (BENEDETTI *et al.* 2006; NASCIMENTO *et al.* 2007; PINTO *et*



al. 2007). En este último grupo cabe destacar el trabajo realizado con la IL-1 en lubina, ya que no solo se ha clonado y caracterizado sino que se ha estudiado su actividad biológica, llegándose incluso a proponer como un posible inmunomodulador o adyuvante para ser aplicado en acuicultura (BUONOCORE *et al.* 2004, 2005).

TABLA 2.

Genes clonados más representativos en especies de interés en acuicultura en España.

Gen	Rodaballo	Dorada	Lubina	Lenguado	Referencia
IFN- α	–	–	–	–	
IFN- β	–	–	–	–	
IFN- γ	–	–	–	–	
Mx	+	+	–	+	ABOLLO <i>et al.</i> 2005; TAFALLA <i>et al.</i> 2004; FERNANDEZ-TRUJILLO <i>et al.</i> 2006
IRF-1	+	+	–	–	ORDÁS <i>et al.</i> 2006
TLR-9		+	–	–	FRANCH <i>et al.</i> 2006
TGF		+	–	–	TAFALLA <i>et al.</i> 2003
TNF- α	+	+	–	–	ORDÁS <i>et al.</i> 2007; GARCIA-CASTILLO <i>et al.</i> 2002
IL-1	–	+	+	–	PELEGRIN <i>et al.</i> 2001; BENEDETTI <i>et al.</i> 2006
IL-10	–	–	+	–	PINTO <i>et al.</i> 2007
IL-12	–	–	+	–	NASCIMENTO <i>et al.</i> 2007
C3	–	+	–	–	SUNYER <i>et al.</i> 1997a y b
Lectina tipo F	–	+	–	–	CAMMARATA <i>et al.</i> 2007
MHC II- α	+	+	–	–	ZHANG y CHEN 2006; CUESTA <i>et al.</i> 2006
MHC II- β	+	–	–	–	ZHANG y CHEN 2006
Hepcidina	+	–	+	–	CHEN <i>et al.</i> 2007; RODRIGUES <i>et al.</i> 2006
Receptor células T	+	–	–	–	TAYLOR <i>et al.</i> 2005
Caspasa 3	–	–	+	–	REIS <i>et al.</i> 2007a
Caspasa 9	–	–	+	–	REIS <i>et al.</i> 2007b
CD8	–	–	+	–	BUONOCORE <i>et al.</i> 2006; PINTO <i>et al.</i> 2006



En cuanto a peces de interés en acuicultura en otros países, se han caracterizado receptores para el $\beta 1,3$ -glucano en neutrófilos de *pez gato* (*Ictalurus punctatus*) (AINSWORTH 1994). También en este mismo pez se ha identificado una inmunoglobulina con similitud a IgD (WILSON *et al.* 1997); las proteínas Mx (PLANT y THUNE 2004) y se han descrito recientemente secuencias similares a IFN- γ (MILEV-MILOVANOVIC *et al.* 2006). En la *carpa* (*Cyprinus Carpio*) se ha purificado y caracterizado la $\alpha 1$ -anti-proteasa (ARANISHI 1999), dos homólogos de la lectina de unión a manosa (MBP) (Nakao *et al.* 2006) y una serin proteasa asociada a MBP (MASP) (NAGAI *et al.* 2000). También se ha caracterizado una inmunoglobulina quimera IgM-IgZ (SAVAN *et al.* 2005a); se ha clonado la proteína NOS2 (SAEIJ *et al.* 2000); un factor con similitud al TGF- β -2 (SUMATHY *et al.* 1997); una quimoquina CXC similar al subgrupo CXCL9, CXCL10, CXCL11 (SAVAN *et al.* 2003), una quimoquina CC similar a C4-CC y un receptor para quimoquinas CXC (FUJIKI *et al.* 1999) y se han identificado dos formas parálogas de la IL-11 (HUISING *et al.* 2005). En la *platija japonesa* (*Paralichthys olivaceus*) se ha clonado y caracterizado un cDNA que codifica para una IgD (HIRONO *et al.* 2003); la IL-6 (NAM *et al.* 2006); factores reguladores de IFN (YABU *et al.* 1998) y proteínas Mx (LEE *et al.* 2000) y se han secuenciado también las quimoquinas CXC del tipo CXCL8 (LEE *et al.* 2001) y dos quimoquinas CC, la C6-CC (NAM *et al.* 2003) y la C4-CC (KONO y SAKAI 2001), con una alta homología con la CCL11 de mamíferos. Se han descrito tres isoformas con homología a los TGF- β -1/4/5, β -2 y β -3 de mamíferos en *platija* (*Pleuronectes platessa*) (LAING *et al.* 2000). En el *fletán* (*Hippoglossus hippoglossus*) se han caracterizado también las proteínas Mx (JENSEN y ROBERTSEN 2000). En el *bacalao* (*Gadus morhua*) se ha identificado una forma soluble y de membrana de una IgM con un splicing alternativo inusual (BENGTEIN *et al.* 1991) y una IgD (STENVIK y JORGENSEN 2000). En la *carpa herbívora* (*Ctenopharyngodon idellus*) se ha purificado y caracterizado la $\alpha 2$ -macroglobulina (LI y LU 2006). En la *lubina estriada* (*Morone saxatilis*) se ha caracterizado una lectina tipo F (ODOM y VASTA 2006). En la *cobia* (*Rachycentron canadum*), el principal pez cultivado en Taiwán, se ha clonado y caracterizado una lectina específica de manosa, con actividad bactericida y mitogénica (NGAI y NG 2007). También se ha caracterizado la estructura primaria



de una lectina del mucus del epitelio de la *anguila japonesa* (*Anguilla japonica*) (TASUMI *et al.* 2002). Finalmente se ha clonado en la *perca china* (*Siniperca chuatsi*) el gen y su promotor que codifica para una proteína antiviral conocida como viperina (SUN y NIE 2004).

La *lamprea* (*Lampetra fluviatilis*) perteneciente al grupo más primitivo de peces, los agnatos, se ha utilizado como pez modelo para estudiar las relaciones evolutivas con otros peces modelos (*fugu*, *Tetraodon*, pez cebra, «goldfish») y entre diferentes grupos y especies. Aunque en este sentido los estudios inmunes no son muy abundantes en esta especie. La primera quimoquina descrita en peces se corresponde con una CXC de lamprea, que codifica un péptido del tipo CXCL8 de mamíferos (NAJAKSHIN *et al.* 1999). También se ha clonado y caracterizado una MBP (TAKAHASHI *et al.* 2006). El hecho de encontrar secuencias estructuralmente similares entre grupos y especies, no implica una similitud funcional, sin embargo da una idea de lo conservados que pueden estar los mecanismos de defensa a lo largo de la historia evolutiva. En *fugu* se ha identificado un isotipo de inmunoglobulina, cuya estructura y análisis de expresión sugieren diferencias con los isotipos del locus IgH previamente descritos (SAVAN *et al.* 2005b); se ha identificado el IFN- γ (ZOU *et al.* 2004b), TLRs (OSHIUMI *et al.* 2003), IRFs (RICHARDSON *et al.* 2001) y subunidades de la oxidasa fagocítica (oxidasa NADPH) (INOUE *et al.* 2004) y se han identificado secuencias del receptor de M-CSF (HOW *et al.* 1996). En *Tetraodon*, la especie de agua dulce de *fugu*, se han llevado a cabo estudios de genómica comparada, que revelan una expansión independiente en vertebrados de los receptores de IFN de tipo I y sus ligandos (LUTFALLA *et al.* 2003). También se han caracterizado genes de la vía JAK-STAT (LEU *et al.* 1998, 2000). En *pez cebra* se han identificado recientemente los nuevos isotipos IgZ (SAKAI y SAVAN 2004; DANILOVA *et al.* 2005; FLAJNIK 2005). En lo que respecta al interferón, se ha realizado un análisis molecular y funcional del interferón del pez cebra (ALTMANN *et al.* 2003), de los TLRs (JAULT *et al.* 2004), de algunos genes de la vía JAK-STAT (OATES *et al.* 1999) y de las proteínas Mx y sus correspondientes promotores (ALTMANN *et al.* 2004). También se han identificado secuencias del receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos (PARICHY *et al.* 2000) y dos quimoquinas, una CXC similar a la CXCL14 de mamíferos (LONG



et al. 2000) y otra del tipo CXCL12 (DAVID *et al.* 2002). En el *goldfish* (*Carassius auratus*) se han hecho sobre todo estudios relativos al interferón y las proteínas inducidas por éste. Así, se han caracterizado TLRs, cuya expresión se incrementa en macrófagos activados (STAFFORD *et al.* 2003), factores reguladores de IFN (ZHANG *et al.* 2003), genes de la vía JAK-STAT (ZHANG y GUI 2004) y proteínas antivirales del tipo Mx (ZHANG *et al.* 2004), ISG (LIU *et al.* 2002b; ZHANG y GUI 2004) y PKR (HU *et al.* 2004).

4. LIBRERÍAS DE EXPRESSED SEQUENCE TAGS (ESTs). SUPPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION (SSH)

Como se ha visto en los apartados anteriores, la respuesta inmune en general y la innata en particular, es de vital importancia en los vertebrados inferiores. Por ello ha cobrado un especial protagonismo entre los inmunólogos de peces la comprensión de esta respuesta, no sólo para determinar sus bases moleculares, sino también para utilizar esta información en la mejora de las especies que se cultivan. Esto puede llevarse a cabo mediante la utilización de inmunoestimulantes, vacunas, programas de selección y mejora genética, etc. En este sentido, la utilización de las nuevas técnicas de genómica (librerías de ESTs, hibridación sustractiva (SSH) y microarrays, entre las más importantes), ha proporcionado información esencial para la identificación de genes homólogos, el descubrimiento de nuevas funciones génicas, la obtención de perfiles preliminares de expresión génica en peces y la identificación de rutas y genes candidatos (KRASNOV *et al.* 2005a; RISE *et al.* 2004a; KUROBE *et al.* 2005). La producción de ESTs, ya sea de forma directa a partir de órganos relacionados con la función que se investiga o mediante hibridación sustractiva (SSH) (BAYNE *et al.* 2001; ALONSO y LEONG 2002; BLUM *et al.* 2004; TSOI *et al.* 2004), ha generado múltiples bases de datos con cientos o miles de genes, que constituyen a su vez la plataforma necesaria para la construcción de microarrays (SAVAN y SAKAI 2002; CLARK *et al.* 2003; KIMURA *et al.* 2004; KONO *et al.* 2004).

Esta gran cantidad de datos requiere una adecuada gestión para la anotación de genes y perfiles de expresión, con lo cual el desarrollo de



estas modernas técnicas de genómica, ha corrido paralelo al desarrollo y aplicación de herramientas bioinformáticas (BOGUSKI *et al.* 1993; HUANG y MADAN 1999; PASCHALL *et al.* 2004; RISE *et al.* 2004b). La gran cantidad de resultados obtenidos con estas técnicas, constituyen un arma de doble filo, ya que a la ventaja en sí misma de este número de datos, debemos añadir los inconvenientes de la sobreparametrización (por producción masiva de datos en pocos individuos) y la obtención de falsos positivos. Por tanto, la obtención de resultados consistentes y la interpretación adecuada de los patrones de expresión génica mediante estas estrategias, requiere de un diseño experimental apropiado, la correcta aplicación de las herramientas estadísticas (YANG y SPEED 2002) y la modelización de resultados mediante redes genéticas (SEGAL *et al.* 2003; SCHATDT *et al.* 2005).

El incremento de las bases de datos de ESTs en peces se ha hecho más acusado en los últimos años. Los salmónidos, al igual que se vio en el apartado anterior, son los peces en los que más se ha avanzado en la aplicación de herramientas de genómica. Un consorcio de grupos de Canadá (Ben KOOP *et al.* y el Genomics Research on Atlantic Salmon Project, GRASP; Susan Douglas *et al.* y el Institute for Marine Biosciences, NRC); Francia (YANN GUIGUEN *et al.* y INRA-SCRIBE); Noruega (BJORN HOYHEIM *et al.* y la Norwegian School of Veterinary Science, NSVS) y U.S.A. (Caird Rexroad III y el USDA/ARS National Center for Cool and Cold Water Aquaculture), prepararon más de 175 librerías de cDNA a partir de una amplia variedad de tejidos en diferentes estados de desarrollo, en las que se han obtenido más de 300.000 secuencias de cDNA de salmónidos. Estas secuencias se han organizado en 40.000 contigs únicos. Se construyó un microarray de 3.557 cDNAs y se está empleando para conseguir nuevos datos en el estudio de la respuesta de células y tejidos a contaminantes, enfermedades y estrés, así como para reproducción y desarrollo. Utilizando estos resultados como base se ha construido un array de mayor tamaño que comprende 16.006 genes y que se ha empleado para detectar patrones de expresión génica frente a infecciones experimentales y a cambios ambientales y fisiológicos a pequeña escala (RISE *et al.* 2004b; VON SCHALBURG *et al.* 2005).

El proyecto BASMAP financiado por la Unión Europea, se centra en el estudio de diversos aspectos de la genómica de la lubina. Con este



fin se construyó una librería BAC (Bacterial Artificial Chromosome) con una media de inserto de 164 kb y una cobertura final equivalente a 7 veces el genoma total. Los clones BAC se están utilizando para generar ESTs, con el fin de detectar marcadores genéticos como SNPs y microsatélites. BRIDGEMAP es otro proyecto de investigación que tiene como objetivo la genómica de la dorada, en el se han generado 1.500 ESTs, con el fin de profundizar en el estudio de las bases moleculares de distintos aspectos de la biología de esta especie con interés comercial. La UE ha financiado y financia diversos proyectos de investigación, encaminados a incrementar el conocimiento genómico en distintos aspectos como los de la salud (AVINSI, AQUAFIRST, IMAQUANIM), bienestar y estrés (WEALTH, STRESSGENE), reproducción (PROBASS, CRYOCITE, PUBERTIMING), crecimiento y nutrición (FISHCAL, fPPARS). Además la red «Marine Genomics Europe» (MGE) tiene como objetivo el desarrollo, utilización y diseminación de aproximaciones genómicas de alto rendimiento, para el estudio de la biología de los organismos marinos y el funcionamiento de los ecosistemas marinos. Uno de los objetivos del nodo de la red «peces y moluscos» ha sido el de producir una batería de herramientas genómicas, que incluyen librerías de cDNA, marcadores moleculares (macro y microsatélites, SNPs), microarrays, etc., integrados en una plataforma bioinformática. Estas herramientas incrementarán sustancialmente los recursos genómicos disponibles para encarar muchos problemas científicos y sociales, tales como la diversidad de los ecosistemas, las pesquerías y la acuicultura. Sin embargo, a pesar de este gran esfuerzo en marcha queda mucho por recorrer. Como dato objetivo, mientras que para trucha arco iris el número de secuencias depositadas en el GeneBank es de 244.984 y el de salmón Atlántico es de 236.009, sólo hay unas 200 secuencias de rodaballo. La información genómica en dorada y lubina es más amplia existiendo cerca de 2.448 y 24.452 secuencias, respectivamente depositadas en GeneBank. El número de ESTs de pez cebra, como pez modelo, es de 833.880.

Otro enfoque que se emplea cada vez más para investigar genes relacionados con la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades, es el del estudio de la expresión diferencial de genes mediante la técnica de la Supresión Substractiva Hybridization (SSH) (DIATCHENKO



et al. 1996). La SSH es una técnica muy poderosa que permite la comparación de dos poblaciones de ARNm, clonando genes que se expresan en una población pero no en otra. Dos ejemplos pioneros de SSH fueron la identificación de receptores de células T (HEDRICK et al. 1984) y la identificación de genes que se activan en el proceso de gastrulación en *Xenopus laevis* (SARGENT y DAWID 1983). Desde entonces se han descrito muchas modificaciones de esta técnica (DUGUID et al. 1988; RUBENSTEIN et al. 1990; SWAROOP et al. 1991), mediante la que distintos autores han identificado genes que se expresan únicamente bajo distintas condiciones. ALONSO y LEONG (2002) utilizaron la SSH en salmón Chinook y el «staghorn sculpin» (*Hemilepdotus spinosus*), para identificar genes de la respuesta innata en peces que se expresaban diferencialmente después de la exposición a Poly I:C, un inductor potente de interferón, encontrando que los genes que se sobreexpresaban eran muy similares a los descritos como inducibles por interferón en mamíferos. BAYNE et al. (2001) identificaron genes implicados en la respuesta inmune en trucha arco iris, después de construir una librería sustraída en hígados control e infectados con la bacterina de *Vibrio*. La librería resultante contenía fragmentos de entre 300-600 pb con unos 25 genes relacionados con el sistema inmune, de los cuales 15 no habían sido identificados en salmónidos previamente y 12 en ningún pez. La librería incluía genes inmunes de fase aguda como la proteína amiloide A, transferrina y proteína tipo precerebelina, así como proteínas del complemento y lectinas, un supuesto péptido antimicrobiano y diversos receptores de membrana, como los TLRs y el receptor para la IL-1. O'FARRELL et al. (2002) utilizaron también la SSH para identificar cambios en la expresión de las células hospedadoras frente a infecciones virales (trucha arco iris/septicemia hemorrágica viral, VHS). Identificaron 24 genes inducidos por el virus, los cuales en su mayoría se correspondían con genes inducidos por interferón. ZHANG et al. (2003) utilizando SSH en el modelo carpa herbívora/virus de la hemorragia de la carpa herbívora (GCHV), determinaron que el interferón y los genes inducidos por éste, son la principal herramienta de ataque antiviral, tanto en mamíferos como en peces. También con un modelo de infección viral, pero esta vez con perca china y el virus de la necrosis infecciosa de bazo e hígado (ISKNV), He et al. (2006)



encontraron genes relacionados con la defensa y apoptosis y también con la vía de degradación por el proteasoma de proteínas marcadas por ubiquitina, que había aparecido además en la librería SSH de O'FARRELL *et al.* (2002) y en la construida por DIOS *et al.* (2007) que se verá más adelante. Una aproximación que también se ha empleado es la de generar librerías de cDNA de tejidos primados y secuenciar aleatoriamente un grupo de estos clones (NAM *et al.* 2000). Estos resultados han tenido éxito pero con un elevado coste y el proceso es relativamente poco eficaz. Esta misma aproximación fue empleada por FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.* (2007b) en carpa (*Cyprinus carpio*). Con el fin de detectar genes del sistema inmune, se prepararon dos librerías de cDNA de piel de carpa infectada experimentalmente con *Ichthyophthirius multifiliis* muestreadas a las 3 y a las 72 horas. En un total de 3.500 ESTs se encontraron 82 ortólogos de genes con relevancia en el sistema inmune, que previamente se habían descrito en otros organismos. De éstos, 61 no se habían descrito en *C. Carpio*. Entre ellos se encontró la secuencia completa de la prostaglandina D2 sintetasa (PGDS), la quimoquina SCYA103 y un segundo gen para la β m2 microglobulina. Mediante RealTime-PCR (RT-PCR) se determinó la modulación de la expresión de estos y otros genes relacionados con la respuesta inmune frente a este parásito. TSOI *et al.* (2004) emplearon la SSH para investigar la expresión diferencial de genes en salmón Atlántico frente a *Aeromonas salmonicida*, el agente etiológico de la forunculosis. Se prepararon librerías de cDNA sustraído de tres órganos inmunes relevantes a dos tiempos durante el proceso de infección. Se construyó una librería sustraída forward y otra reverse y se secuenciaron 200 clones de cada librería, dando un total de 1.778 ESTs, los cuales fueron anotados de acuerdo con categorías funcionales y depositados en el GenBank. Se descubrieron numerosos genes involucrados en la transmisión de señales, inmunidad innata y otros procesos. Estos incluyen algunos de los que participan en la respuesta de fase aguda y otros genes más novedosos, como los que codifican para las proteínas tachilectina, hepcidina, similar a precerebelina o metiltransferasa, una proteína putativa que se une a la saxitoxina y otros. Se analizó con más detalle un subgrupo de genes por Northern virtual o por RT-PCR, para verificar su expresión diferencial como resultado de la infección.



MATEJUSOVA *et al.* (2006) emplearon la SSH para determinar los perfiles de expresión génica en salmón Atlántico infectado con el parásito metazoo *Gyrodactylus salaris*. Dios *et al.* (2007) emplearon esta técnica para estudiar el patrón de expresión génica en el cerebro de dorada en respuesta a una infección por nodavirus, que tiene como diana el sistema nervioso central. Se generaron librerías directa y reversa un día post infección. Algunas de las ESTs expresadas en los tejidos infectados se encuadraron en categorías relacionadas con el estrés y la respuesta inmune. En la librería reversa (ESTs expresadas en los controles comparados con los tejidos infectados) los genes más expresados eran de naturaleza ribosómica y mitocondrial.

5. MICROARRAYS

Los microarrays son plataformas físicas o «chips» (normalmente portaobjetos de vidrio) con genes o secuencias de genes impresas, que permiten el análisis simultáneo de la expresión de cientos o miles de secuencias génicas. El estudio de estos perfiles de expresión en tejidos o pooles de células de interés, constituye la base de la genómica funcional. Los microarrays pueden construirse mediante la impresión de ESTs generados a partir de librerías de cDNAs (sustraídas o no) o por oligos cortos (entre 25 y 70 pb), diseñados a partir de las regiones más específicas de los ESTs, como son los 3'UTRs o las regiones codificadoras, si se pretende abordar estudios de splicing alternativo (BLANCHETTE *et al.* 2005; SRINIVASAN *et al.* 2005; SHAI *et al.* 2006). Los microarrays de cDNA, aún siendo relativamente económicos y sencillos de construir, presentan problemas a la hora de la identificación correcta de los ESTs, dado que se pueden producir hibridaciones cruzadas entre genes que muestren homología (parálogos y ortólogos, familias, isoformas) y, no tienen capacidad de diferenciar los posibles productos de un mismo gen por *splicing* diferencial (DRAGHICI *et al.* 2006). Los microarrays de oligos por el contrario, suponen un coste muy superior, pero su precisión a la hora de identificar la expresión de genes concretos es también mayor. Es por ello que la aplicación de los microarrays de oligos está sólo justificada en aquellos proyectos o especies que impliquen una importante producción de arrays. Aunque se han realizado estu-



dios dirigidos a determinar la idoneidad de unas u otras plataformas, los resultados han sido contrapuestos y no han llegado a una conclusión definitiva (HARDIMAN 2004; LEE *et al.* 2004; DRAGHICI *et al.* 2006). En cualquier caso, la aplicación de microarrays permite detectar variaciones en la respuesta a determinadas condiciones experimentales, como puede ser la presencia de un patógeno, de un probiótico en la dieta, cambios en una determinada fase del desarrollo, presencia de contaminantes, etc., y la identificación de genes relevantes implicados en dichas respuestas (YANG y SPEED 2002; EBERHARD *et al.* 2006).

Una de las primeras utilizaciones publicadas de microarrays para el estudio de las enfermedades de peces, con el fin de entender la expresión de genes ante una infección se basó en el empleo de microarrays de cDNA humanos (TSOI *et al.* 2003). En este experimento se determinó la expresión en hígados de salmón Atlántico infectados con *Aeromonas salmonicida* comparándolos con peces sanos. Las sondas de cDNA se prepararon empleando ARN total por transcripción reversa en presencia de ^{33}P -dCTP, aislado de hígado de salmones controles e infectados y fueron hibridados independientemente a los microarrays humanos GENEFILTERS GF211. De los 4.131 genes conocidos, 241 puntos dieron una señal claramente detectable usando el ARN marcado de los controles. De éstos, 4 presentaban un incremento que era el doble en los infectados que en los controles. Estos genes sobreexpresados eran genes ADP/ATP translocasa (AAT2), Na^+/K^+ ATPasa, aciloxiacil hidrolasa (AOAH) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A). Una búsqueda mediante BlastN permitió encontrar un homólogo de AAT2 de salmón Atlántico y una RT-PCR usando primers basados en esta secuencia, confirmaron su sobreexpresión durante el inicio de la infección. Este trabajo demuestra la posibilidad de emplear microarrays de otras especies, en este caso del ser humano, para trabajar en especies en las que los recursos genómicos no estén tan avanzados. Esto se ha visto corroborado en el estudio de RENN *et al.* (2004), en el que emplearon un microarray preparado con 4.500 genes procedentes de un librería específica de cDNA de cerebro del cíclido *Astatotilapia burtoni*. Este microarray se empleó con 8 especies de peces diferentes y el grado de concordancia en los perfiles de expresión (número de genes y cambios en los nive-



les de expresión) fue consistente. RISE *et al.* (2004a), emplearon los microarrays preparados a partir de las ESTs descritas anteriormente, para determinar la modulación por la infección de *Piscirickettsia salmonis* de genes de macrófagos y del tejido hematopoyético del riñón. Estos resultados fueron validados posteriormente por RT-PCR. En los salmones infectados encontraron que 71 genes se sobreexpresaban y 31 se suprimían. Diez genes antioxidantes, que incluían glutatión S-transferasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y el citocromo b558 y subunidades, estaban sobreexpresados en macrófagos infectados pero no en el tejido hematopoyético infectado. Los cambios en el estado redox de los macrófagos infectados podría reducir el daño en el tejido hematopoyético causado por la infección con rickettsias. La supresión de los transcritos involucrados en la respuesta inmune adaptativa (receptor de células T, cadena de receptor de células T y receptor 7 C-C) en el tejido hematopoyético infectado pero no en los macrófagos infectados, podría contribuir a los daños asociados a la infección en el riñón. Las firmas moleculares de la infección con *P. salmonis* podrían ayudar al desarrollo de vacunas y de tratamientos anti-*Piscirickettsia*. PURCELL *et al.* (2006) emplearon también este microarray, para estudiar los perfiles de expresión de genes de salmón Atlántico frente a una vacuna con un vector de ADN o con una vacuna ADN de IHN. Estos autores encontraron que en los inoculados con el vector tan solo 80 genes eran modulados, mientras que en los inoculados con la vacuna ADN de IHN eran 910 los modulados. Además, emplearon RT-PCR para determinar la expresión de algunos genes inmunes seleccionados en el lugar de la inyección intramuscular y en otros tejidos. En el lugar de la inyección la respuesta fue mayor en los inoculados con el vector para la mayoría de los genes estudiados. En otros órganos como las branquias, riñón y bazo, los genes del grupo interferón tipo I sólo se modularon positivamente en los vacunados con ADN de IHN. Estos resultados sugieren que la vacuna de ADN de IHN induce la sobreexpresión de los genes del grupo IFN tipo I, que es la base funcional de la respuesta antiviral temprana. De forma similar MARTIN *et al.* (2006) utilizaron este microarray para estudiar la respuesta del salmón Atlántico a una vacuna contra *Aeromonas salmonicida* y encontraron que el mayor cambio en expresión se daba en el péptido



antibacteriano hepcidina, con un incremento de 11 veces después de la infección. ROBERGE *et al.* (2007) utilizaron también este microarray para determinar los niveles de expresión de genes en salmones infectados con *Saprolegnia*, confirmando la importancia de la inmunidad no específica en la resistencia a esta enfermedad.

MACKENZIE *et al.* (2006) emplearon otro microarray de salmónidos desarrollado por KRASNOV *et al.* (2005b) que incluía 1.380 genes impresos en seis réplicas. Estos autores estudiaron la capacidad del cortisol para modular la respuesta de transcripción de los macrófagos de trucha arco iris frente al LPS. Los resultados indicaron que el cortisol inhibe significativamente la inducción de la expresión de TNF- α -2, una citoquina pro-inflamatoria, a través de una compleja red de interacciones. GERWICK *et al.* (2007) emplearon un microarray de oligos para estudiar los perfiles de expresión génica, en el proceso de inflamación de hígados de truchas arco iris inyectadas con bacterina de *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* en adyuvante incompleto de Freund. Los análisis con microarrays determinaron que la variabilidad individual era muy elevada, probablemente como consecuencia de la gran variabilidad en la resistencia a enfermedades. LI y WALDBIESER (2006) también han publicado la construcción y uso de un microarray para el pez gato, con el fin de estudiar la respuesta inmune innata. El microarray de alta densidad se preparó a partir de oligonucleótidos basados en las ESTs de pez gato. Esta plataforma se empleó para estudiar la expresión génica de bazo de pez gato a las 2, 4, 8 y 24 horas después de una inyección con LPS. Se detectó la modulación en la expresión de 38 genes frente al tratamiento con LPS. Los resultados de la expresión de 9 genes mediante RT-PCR se correlacionaron positivamente con los datos obtenidos empleando el microarray. La respuesta antiviral fue evaluada mediante el empleo de microarrays en la platija japonesa por BYON *et al.* (2005). Estos autores comprobaron que genes inmunes no específicos, tales como el receptor MIP1-a de las células NK y de Kupfer o la proteína Mx1, se sobreexpresaban frente a la vacunación con una vacuna integrada por la proteína G de VHSV a día 1 y 3 post-inmunización. Durante ese tiempo también se sobreexpresaron los genes relacionados con la respuesta inmune específica (receptor CD20, cadena alfa CD8, CD40 y la molécula de adhesión de



los linfocitos B). En un trabajo posterior y en una nueva comparación de expresión diferencial de genes en infecciones con virus y vacunas, BYON *et al.* (2006) determinaron que los genes relacionados con el sistema inmune, tales como el componente del complemento C3, la proteína plasmática reguladora del complemento, IgM, IgD, la cadena no variable MHC clase II y el receptor CD20, estaban sobreexpresados en la vacuna recombinante preparada con VHSg, 1 y 21 días después de la vacunación. Por otra parte, no se detectó la expresión de genes de defensa celular tales como el CD8 cadena alfa, el regulador inmune de células T, MIPI y la proteína asociada a apoptosis. Con una segunda versión de este microarray, en el que ahora se incluían 1.187 genes, MATSUYAMA *et al.* (2006) determinaron la respuesta inmune de *Paralychtis olivaceus* frente a *Edwardsiella tarda*. Estos autores describieron la modulación en la expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune MMP-9, MMP-13, la quimoquina CXC, el receptor CD20 y la hepcidina. La expresión de algunos genes inmunes fue regulada negativamente ante la infección experimental con *E. tarda*, como el interferón, la proteína inducible Mx, los genes de la cadena no variable asociada a MHC clase II, MHC clase II alfa y MHC clase II beta, el precursor de la cadena ligera de la inmunoglobulina, la cadena ligera de la inmunoglobulina y la IgM. KUROBE *et al.* (2005), con un microarray de 871 genes en el que había 91 genes relacionados con el sistema inmune, caracterizaron *in vitro* la respuesta de células de riñón estimuladas con mitógenos tales como ConA, PMA, LPS o infectadas con el rhabdovirus de hirame (HRV). El número de genes cuya expresión fue modulada positiva o negativamente por estos factores fueron 17 por ConA, 139 por PMA, 76 por LPS y 182 por la infección con HRV. El tratamiento con ConA durante 1 ó 6 horas afectó la expresión de muy pocos genes. PMA moduló negativamente muchos más genes de los que indujo sobreexpresión. Factores relacionados con la apoptosis tales como el c-fos, la proteína inducida NGF, IB y NR13 estuvieron entre los genes inducidos por PMA. LPS indujo la expresión de genes relacionados con la inflamación, tales como IL-1 β , la proteína quimotáctica de monocitos I y la collagenasa. Después de 3 horas de infección con HRV se produjo la expresión de muchos genes, pero muchos de ellos se modularon negativamente volviendo al nivel basal 6 horas



post-infección. La expresión de algunos genes de función desconocida fue inducida o reducida por ConA, PMA, LPS o por la infección con HRV a distintos periodos de tiempo. Dios *et al.* (2007) estudiaron los perfiles de expresión génicos de dorada en respuesta a infecciones de nodavirus. Para ello emplearon la técnica de SSH para generar librerías de cDNA sustraídas expresadas 1 día post-infección. Algunos de los genes pertenecían a las categorías funcionales de estrés y sistema inmune. Para comprobar la modulación de los perfiles de expresión, se tomaron muestras a 1, 3 y 7 días post-infección que se hibridaron en un macroarray con 765 genes construido a partir de productos de PCR con más de 300 pares de bases, procedentes de los genes de la librería forward (385 genes) y reverse (380) de la SSH. Se detectaron cambios significativos en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune antiviral.

La Tabla 3 presenta los microarrays de genes de peces disponibles hasta la fecha.

TABLA 3.
Microarrays disponibles.

Especie	N.º genes	Tipo de sonda	Tipo estudio	Autores
Salmón Atlántico	16.006	cDNA	Múltiple	Consortio GRASP
Salmón Atlántico	1.380	cDNA	Respuesta LPS	KRASNOV <i>et al.</i> 2005b
Trucha arco iris	> 50.000	Oligómeros	Respuesta Vibrio	GERWICK <i>et al.</i> 2007
Pez gato	18.989	Oligonucleótidos	Respuesta LPS	LI y WALDBIESER 2006
<i>Astrolotilapia burtoni</i>	4.500	cDNA	Cerebro	REN <i>et al.</i> 2004
Platija japonesa	779	cDNA	Vacunación VHS	BYON <i>et al.</i> 2005
Platija japonesa	871	cDNA	Células riñón	KUROBE <i>et al.</i> 2005
Platija japonesa	1.187	cDNA	<i>Edwardsiella tarda</i> infección experimental	MATSUYAMA <i>et al.</i> 2006
Dorada (macroarray)	765	cDNA	Nodavirus	DIOS <i>et al.</i> 2007

BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, A. K., A. H. LICHTMAN y J. S. POBER, 1995 *Inmunología Celular y Molecular*. McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid.
- ABOLLO, E., C. ORDÁS, S. DIOS, A. FIGUERAS y B. NOVOA, 2005 Molecular characterization of a turbot Mx cDNA. *Fish Shellfish Immunol.* **19**: 185-190.



- AGGARWAL, B., y J. VILCEK, 1991 *Tumor necrosis factors: structure, function and mechanism*. Marcel Dekker Publishers, New York.
- AINSWORTH, A. J., 1994 A beta-glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **41**: 141-152.
- AKAIKE, T., M. SUGA y H. MAEDA, 1998 Free radicals in viral pathogenesis: Molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **217**: 64-73.
- ALCORN, S. W., A. L. MURRAY y R. J. PASCHO, 2002 Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Shellfish Immunol.* **12**: 303-334.
- ALEXANDER, J. B., y G. A. INGRAM, 1992 Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish. Dis.* **2**: 249-279.
- ALEXANDER, W. S., 1998 Cytokines in hematopoiesis. *Int. Rev. Immunol.* **16**: 651-682.
- ALEXOPOULOU, L., A. C. HOLT, R. MEDZHITOV y R. A. FLAVELL, 2001 Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**: 732-738.
- ALONSO, M., y J. A. LEONG, 2002 Suppressive subtraction libraries to identify interferon-inducible genes in fish. *Mar. Biotechnol.* **4**: 74-80.
- ALTMANN, S. M., M. T. MELLON, D. L. DISTEL y C. H. KIM, 2003 Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Virol.* **77**: 1992-2002.
- ALTMANN, S. M., M. T. MELLON, M. C. JOHNSON, B. H. PAW, N. S. TREDE *et al.*, 2004 Cloning and characterization of an Mx gene and its corresponding promoter from the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 295-306.
- ARANISHI, F., 1999 Purification and characterization of alpha (1)-proteinase inhibitor from carp (*Cyprinus carpio*) serum. *Mar. Biotechnol.* **1**: 33-43.
- ARANISHI, F., AND M. NAKANE, 1997 Epidermal proteases of the Japanese eel. *Fish Physiol. Biochem.* **16**: 471-478.
- ARASON, G. J., 1996 Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish Shellfish Immunol.* **6**: 277-289.
- ARKOOSH, M. R., y S. L. KAATTARI, 1991 Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Dev. Comp. Immunol.* **15**: 279-293.
- ARMSTRONG, P. B., y J. P. QUIGLEY, 1999 $\alpha 2$ -macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.* **23**: 375-390.
- AVRAMEAS, S., y T. TERNYCK, 1995 Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Res. Immunol.* **146**: 235-248.



- BABIOR, B. M., 1988 Microbicidal oxidant production by phagocytes, pp. 39-51 in: *Oxy-radicals in molecular biology and pathology*, edited by P. A. Cerutti, E. Fridovich and R. Alan. R. A. Liss, New York.
- BARREDA, D. R., P. C. HANINGTON Y M. BELOSEVIC, 2004 Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 509-554.
- BAYNE, C. J., Y L. GERWICK, 2001 The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 725-743.
- BAYNE, C. J., L. GERWICK, K. FUJIKI, M. NAKAO Y T. YANO, 2001 Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 205-217.
- BAZAN, J. F., K. B. BACON, G. HARDIMAN, W. WANG, K. SOO *et al.*, 1997 A new class of membranebound chemokine with a CX(3)C motif. *Nature* **385**: 640-644.
- Benedetti, S., E. Randelli, F. Buonocore, J. Zou, C. J. Secombes *et al.*, 2006 Evolution of cytokine responses: IL-1 β directly affects intracellular Ca²⁺ concentration of teleost fish leukocytes through a receptor-mediated mechanism. *Cytokine* **34**: 9-16.
- BENGTON, E., T. LEANDERSON Y L. PILSTROM, 1991 Immunoglobulin heavy chain cDNA from the teleost Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Nucleotide sequences of secretory and membrane form show an unusual splicing pattern. *Eur. J. Immunol.* **21**: 3027-3033.
- BIRD, S., J. ZOU, T. WANG, B. MUNDAY, C. CUNNINGHAM *et al.*, 2002 Evolution of interleukin-1 β . *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**: 483-502.
- BIRON, C. A., 1994 Cytokines in the generation of immune responses and resolution of virus infection. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 530-538.
- BIRON, C. A., Y G. C. SEN, 2001 Interferons and other cytokines, pp. 321-351 in *Fields virology*, edited by D. M. Knipe *et al.* Lippincott-Raven, Philadelphia.
- BLANCHETTE, M., R. E. GREEN, S. E. BRENNER Y D. C. RIO, 2005 Global analysis of positive and negative pre-mRNA splicing regulators in *Drosophila*. *Gene Dev.* **19**: 1306-1314.
- BLUM, J. L., I. KNOEBL, P. LARKIN, K. J. KROLL Y N. D. DENSLOW, 2004 Use of suppressive subtractive hybridization and cDNA arrays to discover patterns of altered gene expression in the liver of dihydrotestosterone and 11-ketotestosterone exposed adult male largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Mar. Environ. Res.* **58**: 565-569.
- BLY, J. E., Y L. W. CLEM, 1992 Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.* **2**: 159-171.



- BOCIEK, R. G., y J. O. ARMITAGE, 1996 Hematopoietic growth factors. *CA Cancer J. Clin.* **46**: 165-184.
- BOEHM, U., T. KLAMP, M. GROOT y J. C. HOWARD, 1997 Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 749-795.
- BOES, M., 2000 Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* **37**: 1141-1149.
- BOGUSKI, M. S., T. M. J. LOWE y C. M. TOLSTOSHEV, 1993 dbEST-database for «expressed sequence tags». *Nature Genet.* **4**: 332-333.
- BOHN, J., 1999 Are natural antibodies involved in tumour defence? *Immunol. Lett.* **69**: 317-320.
- BOSHRA, H., A. E. GELMAN, Y J. O. SUNYER, 2004 Structural and functional characterization of complement C4 and C1s-like molecules in teleost fish: insights into the evolution of classical and alternative pathways. *J. Immunol.* **173**: 349-359.
- Boshra, H., T. Wang, L. Hove-Madsen, J. Hansen, J. Li et al., 2005 Characterization of a C3a receptor in rainbow trout and *Xenopus*: the first identification of C3a receptors in nonmammalian species. *J. Immunol.* **175**: 2427-2437.
- BOSHRA, H., J. LI Y J. O. SUNYER, 2006 Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* **20**: 239-262.
- BOUDINOT, P., S. SALHI, M. BLANCO y A. BENMANSOUR, 2001 Viral haemorrhagic septicemia virus induces vig-2, a new interferon-responsive gene in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* **11**: 383-397.
- BOWDEN, T. J., R. BUTLER, I. R. BRICKNELL, y A. E. ELLIS, 1997 Serum trypsin-inhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish Shellfish Immunol.* **7**: 377-385.
- BRAUN, R., J. A. ARNESEN, A. RINNE y K. HJELMELAND, 1990 Immunohistological localisation of trypsin in mucus-secreting layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* **13**: 233-238.
- BRENNER, S., G. ELGAR, R. SANDFORD, A. MACRAE, B. VENKATESH *et al.*, 1993 Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* **366**: 265-268.
- BUONOCORE, F., M. MAZZINI, M. FORLENZA, E. RANDELLI, C. J. SECOMBES *et al.*, 2004 Expression in *Escherichia coli* and purification of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) interleukin 1beta, a possible immunoadjuvant in aquaculture. *Mar. Biotechnol.* **6**: 53-59.
- BUONOCORE, F., M. FORLENZA, E. RANDELLI, S. BENEDETTI, P. BOSSU *et al.*, 2005 Biological activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) recombinant interleukin-1beta. *Mar. Biotechnol.* **7**: 609-617.



- BUONOCORE, F., E. RANDELLI, S. BIRD, C. J. SECOMBES, S. COSTANTINI *et al.*, 2006 The CD8alpha from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Cloning, expression and 3D modelling. *Fish Shellfish Immunol.* **20**: 637-646.
- BYON, J. Y., T. OHIRA, I. HIRONO AND T. AOKI, 2005 Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* **18**: 135-147.
- BYON, J. Y., T. OHIRA, I. HIRONO Y T. AOKI, 2006 Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis. *Vaccine* **24**: 921-930.
- CAMMARATA, M., G. BENENATI, E. W. ODOM, G. SALERNO, A. VIZZINI ET AL., 2007 Isolation and characterization of a fish F-type lectin from gilt head bream (*Sparus aurata*) serum. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**: 150-155.
- CAMPOS, J. J., A. E. ELLIS Y C. J. SECOMBES, 2000 Toxicity of nitric oxide and peroxy-nitrite to bacterial pathogens of fish. *Dis. Aquat. Organ.* **43**: 109-115.
- CASALI, P., y E. M. SCHETTINO, 1996 Structure and function of natural antibodies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **210**: 167-179.
- CHANG, C. I., O. PLEGUEZUELOS, Y. A. ZHANG, J. ZOU Y C. J. SECOMBES, 2005 Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infect. Immun.* **73**: 5053-5064.
- CHANG, C. I., Y. A. ZHANG, J. ZOU, P. NIE Y C. J. SECOMBES, 2006 Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 185-195.
- CHEN, S. L., W. LI, L. MENG, Z. X. SHA, Z. J. WANG *et al.*, 2007 Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.* **22**: 172-181.
- CHOW, D. A., H. WANG y Z. ZHANG, 1999 Natural antibody surveillance of neoplastic and activated cells. *Biotechnologia Aplicada* **16**: 18-19.
- CHUNG, S., y C. J. SECOMBES, 1988 Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comp. Biochem. Physiol. B* **89**: 539-544.
- CLARK, M. S., Y. J. K. EDWARDS, D. PETERSON, S. W. CLIFTON, A. J. THOMPSON *et al.*, 2003 *Fugu* ESTs: New resources for transcription analysis and genome annotation. *Genome Res.* **13**: 2747-2753.
- CLEM, L. W., R. C. SIZEMORE, C. F. ELLSAESSER y N. W. MILLER, 1985 Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Dev. Comp. Immunol.* **9**: 803-809.



- COLLET, B., G. C. HOVENS, D. MAZZONI, I. HIRONO, T. AOKI *et al.*, 2003 Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interferon regulatory factor 1 and 2 (IRF-1 and IRF-2). *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 111-126.
- Collet, B., E. S. Munro, S. Gahlawat, F. Acosta, J. Garcia *et al.*, 2007 Infectious pancreatic necrosis virus suppresses type I interferon signalling in rainbow trout gonad cell line but not in Atlantic salmon macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* **22**: 44-56.
- CUESTA, A., M. A. ESTEBAN y J. MESEGUER, 1999 Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment by flow cytometry and microscopy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **71**: 161-171.
- CUESTA, A., M. ANGELES ESTEBAN y J. MESEGUER, 2006 Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Mol. Immunol.* **43**: 1275-1285.
- CZARNIECKI, C. W., 1993 The role of tumor necrosis factor in viral disease. *Antiviral Res.* **22**: 223-258.
- DABROWSKI, K., y A. CIEROSZKO, 1994 Proteinase inhibitor(s) in seminal plasma of teleost fish. *J. Fish Biol.* **45**: 801-809.
- DALMO, R. A., K. INGEBRIGSTEN, B. SVEINBJORNSSON y R. SELJELID, 1996 Accumulation of immunomodulatory laminaran (beta (1,3)-D-glucan) in the heart, spleen and kidney of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. Fish Dis.* **19**: 129-136.
- DANILOVA, N., J. BUSSMANN, K. JEKOSCH y L. A. STEINER, 2005 The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: Identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* **6**: 295-302.
- DAVID, N. B., D. SAPÉDE, L. SAINT-ETIENNE, C. THISSE, B. THISSE *et al.*, 2002 Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16297-16302.
- DAVIDSON, G. A., A. E. ELLIS y C. J. SECOMBES, 1993 Route of immunisation influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* **17**: 373-376.
- DAVIDSON, G. A., S-H. LIN, C. J. SECOMBES y A. E. ELLIS, 1997 Detection of specific blood leukocytes of dab (*Limanda limanda*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **58**: 363-374.
- DE HAAS, C. J. C., E. M. M. VAN LEEUWEN, T. VAN BOMMEL, J. VERHOEF, K. P. M. VAN KESSEL *et al.*, 2000 Serum amyloid P component bound to Gram-negative bacteria prevents lipopolysaccharide-mediated classical pathway complement activation. *Infect. Immun.* **68**: 1753-1759.



- DELAMARE-DEBOUTTEVILLE, J., D. WOOD Y A. C. BARNES, 2006 Response and function of cutaneous mucosal and serum antibodies in barramundi (*Lates calcarifer*) acclimated in seawater and freshwater. *Fish Shellfish Immunol.* **21**: 92-101.
- DIATCHENKO, L., Y-F. CHRIS LAU, A. P. CAMPBELL, A. CHENCHIK, F. MOQADAM ET AL., 1996 Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6025-6030.
- DIEBOLD, S. S., T. KAISHO, H. HEMMI, S. AKIRA Y C. REIS E SOUSA, 2004 Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**: 1529-1531.
- DINARELLO, C. A., 1994 The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* **8**: 1314-1325.
- DINARELLO, C. A., 1997 Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**: 253-265.
- DIOS, S., L. POISA-BEIRO, A. FIGUERAS Y B. NOVOA, 2007 Suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. *Mol. Immunol.* **44**: 2195-2204.
- DIXON, B., y R. J. M. STET, 2001 The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 683-700.
- DIXON, B., B. SHUM, E. J. ADAMS, K. E. MAGOR, R. P. HEDRICK *et al.*, 1998 CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol. Rev.* **166**: 341-348.
- DRAGHICI, S., P. KHATRI, A. C. EKLUND Y Z. SZALLASI, 2006 Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet.* **22**: 101-109.
- DU PASQUIER, L., 1982 Antibody diversity in lower vertebrates -- why is it so restricted? *Nature* **296**: 311-313.
- DU PASQUIER, L., 2001 The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B* **129**: 1-15.
- DUCHIRON, C., S. BETOULLE, S. REYNAUD Y P. DESCHAUX, 2002a Lindane increases macrophage-activating factor production and intracellular calcium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **53**: 388-396.
- DUCHIRON, C., S. REYNAUD Y P. DESCHAUX, 2002b Lindane-induced macrophage activating factor (MAF) production by peripheral blood leukocytes (PBLs) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): involvement of intracellular cAMP mobilization. *Aquat. Toxicol.* **56**: 81-91.



- DUGUID, J. R., R. G. ROHWER y B. SEED, 1988 Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5738-5742.
- EBERHARD, S., M. JAIN, C. S. IM, S. POLLOCK, J. SHRAGER *et al.*, 2006 Generation of an oligonucleotide array for analysis of gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* **49**: 106-124.
- ELLIS, A. E., 1999 Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* **9**: 291-308.
- ELLIS, A. E., 2001 Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 827-839.
- ELWARD, K., y P. GASQUE, 2003 "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol. Immunol.* **40**: 85-94.
- ENDO, Y., M. TAKAHASHI y T. FUJITA, 2006 Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology* **211**: 283-293.
- ENGSTAT, R. E., y B. ROBERTSEN, 1994 Specificity of a beta-glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Dev. Comp. Immunol.* **18**: 397-408.
- ESTEBAN, M. A., y J. MESEGUER, 1994 Phagocytic defense mechanism in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): An ultrastructural study. *Anat. Rec.* **240**: 589-597.
- EVANS, D. L., y L. JASO-FRIEDMANN, 1992 Nonspecific cytotoxic cells as effectors in immunity in fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**: 109-121.
- EVANS, D. L., J. H. LEARY y L. JASO-FRIEDMANN, 2001 Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 791-805.
- EWART, K. V., S. C. JOHNSON y N. W. ROSS, 1999 Identification of a pathogen-binding lectin in salmon serum. *Comp. Biochem. Physiol. C* **123**: 9-15.
- FAISAL, M., I. I. AHMED, G. PETERS y E. L. COOPER, 1989 Natural cytotoxicity of tilapia leucocytes. *Dis. Aquat. Org.* **7**: 12-22.
- FÄNGE, R., 1982 A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **6**: 23-33.
- FÄNGE, R., G. LUNDBLAD y J. LIND, 1976 Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. *Mar. Biol.* **36**: 277-282.
- FARBER, J. M., 1997 Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* **61**: 246-257.
- FAST, M. D., D. E. SIMS, J. F. BURKA, A. MUSTAFA y N. W. ROSS, 2002 Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma



- in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol. A* **132**: 645-657.
- FEARON, D. T., 1997 Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* **388**: 323-324.
- FEARON, D. T., y R. M. LOCKSLEY, 1996 The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**: 50-54.
- FERNANDEZ, E. J., y E. LOLIS, 2002 Structure, function, and inhibition of chemokines. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**: 469-499.
- FERNANDEZ-GONZALEZ, S., K. BUCHMANN y M. E. NIELSEN, 2007a Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Dev. Comp. Immunol.* **31**: 576-586.
- FERNANDEZ-GONZALEZ, S., N. CHATZIANDREOU, M. E. NIELSEN, W. LI, J. ROGERS *et al.*, 2007b Cutaneous immune responses in the common carp detected using transcript analysis. *Mol. Immunol.* **44**: 1664-1679.
- FERNANDEZ-TRUJILLO, M. A., J. PORTA, J. J. BORREGO, M. C. ALONSO, M. C. ALVAREZ *et al.*, 2006 Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol.* **21**: 577-582.
- FLAJNIK, M. F., 2005 The last flag unfurled? A new immunoglobulin isotype in fish expressed in early development. *Nat. Immunol.* **6**: 229-230.
- FLETCHER, T. C., y A. WHITE, 1973 Lysozyme activity in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) *Experientia* **29**: 1283-1285.
- FRANCH, R., B. CARDAZZO, J. ANTONELLO, M. CASTAGNARO, T. PATARNELLO *et al.*, 2006 Full-length sequence and expression analysis of Toll-like receptor 9 in the gilthead seabream (K L.). *Gene* **378**: 42-51.
- FRØYSTAD, M. K., M. RODE, T. BERG y T. GJØEN, 1998 A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **22**: 533-549.
- FUJIKI, K., D. H. SHIN, M. NAKAO y T. YANO, 1999 Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization. *Immunogenetics* **49**: 909-914.
- Funkenstein, B., Y. Rebhan, A. Dyman y G. Radaelli, 2005 alpha2-Macroglobulin in the marine fish *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **141**: 440-449.
- GANASSIN, R. C., y N. C. BOLS, 1996 Development of long-term rainbow trout spleen cultures that are haemopoietic and produce dendritic cells. *Fish Shellfish Immunol.* **6**: 17-34.



- GARCIA-CASTILLO, J., P. PELEGRIN, V. MULERO y J. MESEGUER, 2002 Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics* **54**: 200-207.
- Garcia-Castillo, J., E. Chaves-Pozo, P. Olivares, P. Pelegrin, J. Meseguer et al., 2004 The tumor necrosis factor alpha of the bony fish seabream exhibits the *in vivo* proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. *Cell Mol. Life Sci.* **61**: 1331-1340.
- GERWICK, L., G. CORLEY-SMITH y C. J. BAYNE, 2007 Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus. *Fish Shellfish Immunol.* **22**: 157-171.
- GOETZ, F. W., J. V. PLANAS y S. MACKENZIE, 2004a Tumor necrosis factors. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 487-497.
- Goetz, F. W., D. B. Iliev, L. A. McCauley, C. Q. Liarte, L. B. Tort et al, 2004b Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Mol. Immunol.* **41**: 1199-1210.
- GOLDFELD, A. E., y E. Y. TSAI, 1996 TNF-alpha and genetic susceptibility to parasitic disease. *Exp. Parasitol.* **84**: 300-303.
- GONZALEZ, R., J. CHARLEMAGNE, W. MAHANA y S. AVRAMEAS, 1988 Specificity of natural serum antibodies present in phylogenetically distinct fish species. *Immunology* **63**: 31-36.
- GONZALEZ, R., P. MATSIOTA, C. TORCHY, P. DE KINKELIN y S. AVRAMEAS, 1989 Natural anti-TNP antibodies from rainbow trout interfere with viral infection in vitro. *Res. Immunol.* **140**: 675-684.
- GOODBOURN, S., L. DIDCOCK y R. E. RANDALL, 2000 Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **81**: 2341-2364.
- Grabowski, L. D., S. E. LaPatra y K. D. Cain, 2004 Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. *J. Fish Dis.* **27**: 573-581.
- GRAHAM, S., y C. J. SECOMBES, 1988 The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Immunology* **65**: 293-297.
- GRAHAM, S., y C. J. SECOMBES, 1990 Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma? *J. Fish Biol.* **36**: 563-573.
- GRAVELL, M., y R. G. MALSBERGER, 1965 A permanent cell line from the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. N Y Acad. Sci.* **126**: 555-565.



- GRINDE, B., 1989 Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. J. Fish Dis. **12**: 95-104.
- GRINDE, B., Ø. LIE, T. POPPE y R. SALTE, 1988 Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. Aquaculture **68**: 299-304.
- GUDMUNDSDÓTTIR, B., y B. MAGNADÓTTIR, 1997 Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes*. Fish Shellfish Immunol. **7**: 55-69.
- HAFFTER, P., M. GRANATO, M. BRAND, M. C. MULLINS, M. HAMMERSCHMIDT, *et al.*, 1996 The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. Development **123**: 1-36.
- HAMBLIN, A. S., 1993 *Cytoquines and cytokine receptors*. IRL Press, Oxford.
- HANSEN, J. D., E. D. LANDIS y R. B. PHILLIPS, 2005 Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**: 6919-6924.
- HARDIE, L. J., K. J. LAING, G. D. DANIELS, P. S. GRABOWSKI, C. CUNNINGHAM *et al.*, 1998 Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Cytokine **10**: 555-563.
- HARDIMAN, G., 2004 Microarray platforms-comparisons and contrasts. Pharmacogenomics **5**: 487-502.
- HE, W., Z. X. YINLT, Y. LI, W. L. HUO, H. J. GUAN *et al.*, 2006 Differential gene expression profile in spleen of mandarin fish *Siniperca chuatsi* infected with ISKNV, derived from suppression subtractive hybridization. Dis. Aquat. Organ. **73**: 113-122.
- HEDRICK, S.M., D. I. COHEN, E. A. NIELSEN y M. M. DAVIS, 1984 Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane associated proteins. Nature **308**: 149-153.
- HEIL, F., H. HEMMI, H. HOCHREIN, F. AMPENBERGER, C. KIRSCHNING *et al.*, 2004 Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science **303**: 1526-1529.
- HELDIN, C. H., K. MIYAZONO y P. TEN DIJKE, 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature **390**: 465-471.
- HERBERMAN, R., y B. ORTALDO, 1981 Natural killer cells: their role in defences against disease. Science **214**: 24-30.
- HERPIN, A., C. LELONG y P. FAVREL, 2004 Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. Dev. Comp. Immunol. **28**: 461-485.



- HIBBS, J. B. J., R. R. TAINOR y Z. VAVRIN, 1987 Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**: 473-476.
- HINEGARDNER, R., 1968 Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. *Am. Nat.* **102**: 517-523.
- HIRONO, I., B. H. NAM, J. ENOMOTO, K. UCHINO y T. AOKI, 2003 Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. *Fish Shellfish Immunol.* **15**: 63-70.
- HJELMELAND, K., 1983 Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B* **76**: 365-372.
- HJELMELAND, K., M. CHRISTIE y J. RAA, 1983 Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *J. Fish Biol.* **23**: 13-22.
- HORDVIK, I., A. M. VOIE, J. GLETTE, R. MALE y C. ENDRESEN, 1992 Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Eur. J. Immunol.* **22**: 2957-2962.
- HORDVIK, I., J. THEVARAJAN, I. SAMDAL, N. BASTANI y B. KROSSOY, 1999 Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand. J. Immunol.* **50**: 202-210.
- HORIGUCHI, J., M. K. WARREN y D. KUFÉ, 1987 Expression of the macrophage-specific colony-stimulating factor in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* **69**: 1259-1261.
- HOW, G. F., B. VENKATESH y S. BRENNER, 1996 Conserved linkage between the puffer fish (*Fugu rubripes*) and human genes for platelet-derived growth factor receptor and macrophage colony-stimulating factor receptor. *Genome Res.* **6**: 1185-1191.
- HU, C. Y., Y. B. ZHANG, G. P. HUANG, Q. Y. ZHANG y J. F. GUI, 2004 Molecular cloning and characterisation of a fish PKR-like gene from cultured CAB cells induced by UV-inactivated virus. *Fish Shellfish Immunol.* **17**: 353-366.
- HUANG, X., y A. MADAN, 1999 CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* **9**: 868-877.
- HUISING, M. O., R. J. STET, H. F. SAVELKOUL y B. M. VERBURG-VAN KEMENADE, 2004 The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 395-413.
- HUISING, M. O., C. P. KRUISWIJK, J. E. VAN SCHIJNDEL, H. F. SAVELKOUL, G. FLIK *et al.*, 2005 Multiple and highly divergent IL-11 genes in teleost fish. *Immunogenetics* **57**: 432-443.



- Huttenhuis, H. B., A. J. Taverne-Thiele, C. P. Grou, J. Bergsma, J. P. Saeij et al., 2006 Ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.* **30**: 557-574.
- ILIEV, D. B., B. CASTELLANA, S. MACKENZIE, J. V. PLANAS Y F. W. GOETZ, 2007 Cloning and expression analysis of an IL-6 homolog in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Immunol.* **44**: 1803-1807.
- INGRAM, G. A., 1980 Substances involved in the natural resistance of fish to infection - a review. *J. Fish Biol.* **16**: 23-60.
- INOUE, Y., Y. SUENAGA, Y. YOSHIURA, T. MORITOMO, M. OTOTAKE, et al., 2004 Molecular cloning and sequencing of Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) NADPH oxidase cDNAs. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 911-925.
- JACOBS, B. L., y J. O. LANGLAND, 1996 When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**: 339-349.
- JANEWAY, C., 1989 Immunogenicity signals 1,2,3, ... and 0. *Immunol. Today* **10**: 283-286.
- JAULT, C., L. PICHON y J. CHLUBA, 2004 Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Mol. Immunol.* **40**: 759-771.
- JENSEN, V., y B. ROBERTSEN, 2000 Cloning of a Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus. *J. Interferon Cytokine Res.* **20**: 701-710.
- Jia, X., A. Patrzykat, R. H. Devlin, P. A. Ackerman, G. K. Iwama et al., 2000 Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1928-1932.
- JIANG, H., J. N. SIEGEL y H. GEWURZ, 1991 Binding and complement activation by C-reactive protein via the collagen-like region of C1q and inhibition of these reactions by monoclonal antibodies to C-reactive protein and C1q. *J. Immunol.* **146**: 2324-2330.
- JOLLES, P., y J. JOLLES, 1984 What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell Biochem.* **63**: 165-189.
- KAATARI, S. L., 1992 Fish B lymphocytes: defending their form and function. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**: 161-180.
- Kaiser, P., L. Rothwell, S. Avery y S. Balu, 2004 Evolution of the interleukins. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 375-394.
- KAUR, H., L. JASO-FRIEDMANN Y D. L. EVANS, 2004 Single base oligodeoxyguanosine upregulates Fas ligand release by nonspecific cytotoxic cells. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 571-579.



- KELNER, G. S., J. KENNEDY, K. B. BACON, S. KLEYENSTEUBER, D. A. LARGAESPAD A *et al.*, 1994 Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**: 1395-1399.
- KIMURA, T., T. JINDO, T. NARITA, K. NARUSE, D. KOBAYASHI *et al.*, 2004 Large-scale isolation of ESTs from medaka embryos and its application to medaka developmental genetics. *Mech. Develop.* **121**: 915-932.
- KONO, T., y M. SAKAI, 2001 The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected with the immunostimulant peptidoglycan. *Fish Shellfish Immunol.* **11**: 357-366.
- KONO, T., A. PONPORNPIST y M. SAKAI, 2004 The analysis of expressed genes in head kidney of common carp *Cyprinus carpio* L. stimulated with peptidoglycan. *Aquaculture* **235**: 37-52.
- KONTSEK, P., G. KARAYIANNI-VASCONCELOS y E. KONTSEKOVA, 2003 The human interferon system: characterization and classification after discovery of novel members. *Acta Virol.* **47**: 201-215.
- KOROMILAS, A. E., S. ROY, G. N. BARBER, M. G. KATZE y N. SONENBERG, 1992 Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science* **257**: 1685-1689.
- KOUSSOUNADIS, A. I., D. W. RITCHIE, G. J. KEMP y C. J. SECOMBES, 2004 Analysis of fish IL-1beta and derived peptide sequences indicates conserved structures with species-specific IL-1 receptor binding: implications for pharmacological design. *Curr. Pharm. Des.* **10**: 3857-3871.
- KRASNOV, A., H. KOSKINEN, P. PEHKONEN, C. E. REXROAD III, S. AFANASYEV *et al.*, 2005a Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress. *BMC Genomics* **6**: 3.
- KRASNOV, A., H. KOSKINEN, C. REXROAD, S. AFANASYEV, H. MOLSA *et al.*, 2005b Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **74**: 70-81.
- KRUEGER, J. M., J. FANG, P. TAISHI, Z. CHEN, T. KUSHIKATA *et al.*, 1998 A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann. N Y Acad. Sci.* **856**: 148-159.
- KURATA, O., N. OKAMOTO y Y. IKEDA, 1995 Neutrophilic granulocytes in carp, *Cyprinus carpio*, possess a spontaneous cytotoxic activity. *Dev. Comp. Immunol.* **19**: 315-325.
- KUROBE, T., M. YASUIKE, T. KIMURA, I. HIRONO y T. AOKI, 2005 Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarrays. *Dev. Comp. Immunol.* **29**: 515-523.
- KWON, S. R., C. S. KIM, J. K. CHUNG, H. H. LEE y K. H. KIM, 2002 Inhibition of chemiluminescent response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phago-



- cytes by the scuticociliate parasite *Uronema marinum*. Dis. Aquat Organ. **52**: 119-122.
- LACROIX-DESMAZES, S., S. V. KAVERI, L. MOUTHON, A. AYOUBA, E. MALANCHERE *et al.*, 1998 Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. J. Immunol. Methods **216**: 117-137.
- Laing, K. J., y C. J. Secombes, 2004a Chemokines. Dev. Comp. Immunol. **28**: 443-460.
- LAING, K. J., y C. J. SECOMBES, 2004b Trout CC chemokines: comparison of their sequences and expression patterns. Mol. Immunol. **41**: 793-808.
- LAING, K. J., C. CUNNINGHAM y C. J. SECOMBES, 2000 Genes for three different isoforms of transforming growth factor-beta are present in plaice (*Pleuronectes platessa*) DNA. Fish Shellfish Immunol. **10**: 261-271.
- LAING, K. J., J. J. ZOU, T. WANG, N. BOLS, I. HIRONO *et al.*, 2002a Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dev. Comp. Immunol. **26**: 433-444.
- LAING, K. J., N. BOLS y C. J. SECOMBES, 2002b A CXC chemokine sequence isolated from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* resembled the closely related interferon-g inducible chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11. Eur. Cytokine Network **13**: 462-473.
- LAMAS, J., y A. E. ELLIS, 1994 Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol **4**: 201-219.
- LANGSTON, A. L., I. R. BRICKNELL y A. E. ELLIS, 1998 Iron binding capacity of peripheral blood leucocyte lysates from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), pp. 111-116 in *Methodology in fish diseases research*, edited by A. C. Barnes, G. A. Davidson, M. P. Hiney *et al.* Fisheries Research Services, Aberdeen.
- LANGSTON, A. L., R. JOHNSTONE y A. E. ELLIS, 2001 The kinetics of the hypoferrae-mic response and changes in levels of alternative complement activity in diploid and triploid Atlantic salmon, following injection of lipopolysaccharide. Fish Shellfish Immunol. **11**: 333-345.
- LEE, E-Y., H-H. PARK, Y-T. KIM, J-K. CHUNG y T-J. CHOI, 2001 Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gene **274**: 237-243.
- LEE, H.S., J. WANG, L. TIAN, H. M. JIANG, M. A. BLACK *et al.*, 2004 Sensitivity of 70-mer oligonucleotides and cDNAs for microarray analysis of gene expression in *Arabidopsis* and its related species. Plant Biotechnol. J. **2**: 45-57.
- LEE, J. Y., I. HIRONO y T. AOKI, 2000 Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Dev. Comp. Immunol. **24**: 407-415.



- LEIRO, J., M. ORTEGA, M. L. SANMARTIN Y F. M. UBEIRA, 2000 Non-specific responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) adherent cells to microsporidian spores. Vet. Immunol. Immunopathol. **75**: 81-95.
- LEONG, J-AC., G. D. TROBRIDGE, C. H. Y. KIM, M. JOHNSON y B. SIMON, 1998 Interferon-inducible Mx proteins in fish. Immunol. Rev. **166**: 349-363.
- LEU, J. H., M. S. CHANG, C. W. YAO, C. K. CHOU, S. T. CHEN *et al.*, 1998 Genomic organization and characterization of the promoter region of the round-spotted pufferfish (*Tetraodon fluviatilis*) JAK1 kinase gene. Biochim. Biophys. Acta **1395**: 50-56.
- LEU, J. H., S. J. YAN, T. F. LEE, C. M. CHOU, S. T. CHEN *et al.*, 2000 Complete genomic organization and promoter analysis of the round-spotted pufferfish JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2 genes. DNA Cell Biol. **19**: 431-446.
- LI, F. L., y C. P. LU, 2006 Purification and characterization of alpha2-macroglobulin from grass carp *Ctenopharyngodon idellus*: cloning a segment of the corresponding gene. Fish Shellfish Immunol. **20**: 474-481.
- LI, J., R. PETERS, S. LAPATRA, M. VAZZANA Y J. O. SUNYER, 2004 Anaphylatoxin-like molecules generated during complement activation induce a dramatic enhancement of particle uptake in rainbow trout phagocytes. Dev. Comp. Immunol. **28**: 1005-1021.
- LI, J., D. R. BARREDA, Y. A. ZHANG, H. BOSHRA, A. E. GELMAN ET AL., 2006 B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. Nat. Immunol. **7**: 1116-1124.
- LI, R. W., y G. C. WALDBIESER, 2006 Production and utilization of a high-density oligonucleotide microarray in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. BMC Genomics **7**: 134.
- LIE, Ø., Ø. EVENSEN, A. SØRENSEN y E. FRØYSADAL, 1989 Study on lysozyme activity in some fish species. Dis. Aquat. Org. **6**: 1-5.
- LILLEHAUG, A., A. RAMSTAD, K. BÆKKEN y L. J. REITAN, 1993 Protective immunity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated at different water temperatures. Fish Shellfish Immunol. **3**: 143-156.
- LIN, R., P. E. TARR Y T. C. JONES, 1995 Present status of the use of cytokines as adjuvants with vaccines to protect against infectious diseases. Clin. Infect. Dis. **21**: 1439-1449.
- LIU, L., K. FUJIKI, B. DIXON y R. S. SUNDICK, 2002a Cloning of a novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CC chemokine with a fractalkine-like stalk and a TNF decoy receptor using cDNA fragments containing Au-rich elements. Cytokine **17**: 71-81.



- LIU, M., R. REIMSCHUESSEL y B. A. HASSEL, 2002b Molecular cloning of the fish interferon stimulated gene, 15 kDa (ISG15) orthologue: a ubiquitin-like gene induced by nephrotoxic damage. *Gene* **298**: 129-139.
- LO, D., L. FENG, M. J. CARSON, M. CROWLEY, M. PAUZA *et al.*, 1999 Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunol. Rev.* **169**: 225-239.
- LONG, Q., E. QUINT, S. LIN y M. EKKER, 2000 The zebrafish scyba gene encodes a novel CXC-type chemokine with distinctive expression patterns in the vestibulo-acoustic system during embryogenesis. *Mech. Dev.* **97**: 183-186.
- López-Castejon, G., M. P. Sepulcre, F. J. Roca, B. Castellana, J. V. Planas *et al.*, 2007 The type II interleukin-1 receptor (IL-1RII) of the bony fish gilthead seabream *Sparus aurata* is strongly induced after infection and tightly regulated at transcriptional and post-transcriptional levels. *Mol. Immunol.* **44**: 2772-2780.
- Lovoll, M., T. Kilvik, H. Boshra, J. Bogwald, J. O. Sunyer *et al.*, 2006 Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* **58**: 168-179.
- LOWENTHAL, J. W., T. E. O'NEIL, A. DAVID, G. STROM y M. E. ANDREW, 1999 Cytokine therapy: a natural alternative for disease control. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **72**: 183-188.
- LUND, J. M., L. ALEXOPOULOU, A. SATO, M. KAROW, N. C. ADAMS *et al.*, 2004 Recognition of single-stranded RNA viruses by Tolllike receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 5598-5603.
- LUND, V., y J. A. OLAFSEN, 1998 A comparative study of pentraxin-like proteins in different fish species. *Dev. Comp. Immunol.* **22**: 185-194.
- LUTFALLA, G., H. R. CROLLIUS, N. STANGE-THOMANN, O. JAILLON, K. MOGENSEN *et al.*, 2003 Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics* **4**: 29.
- Mackenzie, S., C. Liarte, D. Iliev, J. V. Planas, L. Tort *et al.*, 2004 Characterization of a highly inducible novel CC chemokine from differentiated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Immunogenetics* **56**: 611-615.
- MACKENZIE, S., D. ILIEV, C. LIARTE, H. KOSKINEN, J. V. PLANAS *et al.*, 2006 Transcriptional analysis of LPS-stimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol. *Mol. Immunol.* **43**: 1340-1348.
- MACMICKING, J. D., 2004 IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends Immunol.* **25**: 601-609.



- MACMICKING, J., Q. W. XIE y C. NATHAN, 1997 Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 323-350.
- MAGNADÓTTIR, B., 2006 Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* **20**: 137-151.
- MAGNADÓTTIR, B., H. JÓNSDÓTTIR, S. HELGASON, B. BJÖRNSSON, T. JØRGENSEN *et al.*, 1999 Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I: The effects of environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol. B* **122**: 173-180.
- MAGNADÓTTIR, B., H. JÓNSDÓTTIR, S. HELGASON, B. BJÖRNSSON, S. T. SOLEM *et al.*, 2001 Immune parameters of immunized cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **11**: 75-89.
- MAGNADÓTTIR, B., S. H. BAMBIR, B. K. GUDMUNDSDÓTTIR, L. PILSTRÖM y S. HELGASON, 2002 Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in naturally and experimentally infected cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish Dis.* **25**: 583-597.
- MALE, D., y I. ROITT, 1996 Introduction to the immune system, pp. 1-12, in *Immunology*, edited by I. M. Roitt, J. Brostoff and D. K. Male. Mosby, Londres.
- MARTIN, S. A., S. C. BLANEY, D. F. HOULIHAN y C. J. SECOMBES, 2006 Transcriptome response following administration of a live bacterial vaccine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol. Immunol.* **43**: 1900-1911.
- MASON, A. J., I. N. CHOTIMAH, P. BERTANI y B. BECHINGER, 2006 A spectroscopic study of the membrane interaction of the antimicrobial peptide Pleurocidin. *Mol. Membr. Biol.* **23**: 185-194.
- MATEJUSOVA, I., B. FELIX, T. SORSA-LESLIE, J. GILBEY, L. R. NOBLE *et al.*, 2006 Gene expression profiles of some immune relevant genes from skin of susceptible and responding Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) infected with *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) revealed by suppressive subtractive hybridisation. *Int. J. Parasitol.* **36**: 1175-1183.
- MATSUYAMA, T., A. FUJIWARA, C. NAKAYASU, T. KAMAISHI, N. Oseko *et al.*, 2006 Gene expression of leucocytes in vaccinated Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during the course of experimental infection with *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunol.* (*in press*).
- MATZINGER, P., 1998 An innate sense of danger. *Immunology* **10**: 399-415.
- McBeath, A. J., M. SNOW, C. J. Secombes, A. E. Ellis y B. Collet, 2007 Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish Shellfish Immunol.* **22**: 230-241.



- MEDZHITOV, R., y C. A. JR JANEWAY, 1998 An ancient system of host defence. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 12-15.
- MEDZHITOV, R., y C. A. JR JANEWAY, 2000 How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin. Immunol.* **12**: 185-188.
- MEDZHITOV, R., y C. A. JR JANEWAY, 2002 Decoding the patterns of self and non-self by the innate immune system. *Science* **296**: 298-300.
- MESEGUER, J., M. A. ESTEBAN, A. LOPEZ-RUIZ y E. BIELEK, 1994 Ultraestructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio* L.). *Anat. Rec.* **239**: 468-474.
- MEURS, E., K. CHONG, J. GALABRU, N. S. THOMAS, I. M. KERR *et al.*, 1990 Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* **62**: 379-390.
- MEYORACH, D., J. L. ZHOU, X. SONG y K. B. ELKON, 1998 Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J. Exp. Med.* **188**: 387-392.
- MILES, P. R., L. BOWMAN, A. RENGASAMY, y L. HUFFMAN, 1998 Constitutive nitric oxide production by rat alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* **274**: 360-368.
- MILEV-MILOVANOVIC, I., S. LONG, M. WILSON, E. BENGTON, N. W. MILLER *ET AL.*, 2006 Identification and expression analysis of interferon gamma genes in channel catfish. *Immunogenetics* **58**: 70-80.
- MILLER, N. W., y L. W. CLEM, 1984 Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. *J. Immunol.* **133**: 2356-2359.
- MULERO, V., M. A. ESTEBAN, J. MUÑOZ y J. MESEGUER, 1994 Non-specific cytotoxic response against tumour target cells mediated by leucocytes from seawater teleosts, *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* **57**: 351-358.
- MULERO, V., y J. MESEGUER, 1998 Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **8**: 143-156.
- MURPHY, P. M., M. BAGGIOLINI, I. F. CHARO, C. A. HEBERT, R. HORUK *et al.*, 2000 International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**: 145-176.
- MURRAY, C. K., y T. C. FLETCHER, 1976 The immunohistochemical localisation of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *J. Fish Biol.* **9**: 329-334.



- NAGAI, T., J. MUTSURO, M. KIMURA, Y. KATO, K. FUJIKI *et al.*, 2000 A novel truncated isoform of the mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) from the common carp (*Cyprinus carpio*). Immunogenetics **51**: 193-200.
- NAJAKSHIN, A. M., L. V. MECHETINA, B. Y. ALABYEV y A. V. TARANIN, 1999 Identification of an IL-8 homolog in lamprey (*Lampetra fluviatilis*): early evolutionary divergence of chemokines. Eur. J. Immunol. **29**: 375-382.
- Nakao, M., T. Kajiya, Y. Sato, T. Somamoto, Y. Kato-Unoki *et al.*, 2006 Lectin pathway of bony fish complement: identification of two homologs of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*). J. Immunol. **177**: 5471-5479.
- NAM, B-H., E. YAMAMOTO, I. HIRONO y T. AOKI, 2000 A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with HIRAME rhabdovirus. Dev. Comp. Immunol. **24**: 13-24.
- NAM, B-H., I. HIRONO y T. AOKI, 2003 Bulk isolation of immune response related genes by expressed sequenced tags of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leukocytes stimulated with ConA/PMA. Fish Shellfish Immunol. **14**: 467-476.
- Nam, B-H., J. Y. Byon, Y. O. Kim, E. M. Park, Y. C. Cho *et al.*, 2006 Molecular cloning and characterisation of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) interleukin-6 gene. Fish Shellfish Immunol. (*In press*).
- NASCIMENTO, D. S., A. VALE, A. M. TOMAS, J. ZOU, C. J. SECOMBES *et al.*, 2007 Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-12 p40 and p35 subunits. Mol. Immunol. **44**: 2277-2291.
- NATHAN, C., 1992 Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J **6**: 3051-3064.
- NAUTA, A. J., M. DAHA, C. VAN KOOTEN, AND A. ROOS, 2003 Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. Trends Immunol. **24**: 148-154.
- NEUMANN, N. F., D. FAGAN y M. BELOSEVIC, 1995 Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leucocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. Dev. Comp. Immunol. **19**: 473-482.
- NEUMANN, N. F., J. L. STAFFORD, D. BARREDA, A. J. AINSWORTH y M. BELOSEVIC, 2001 Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. Dev. Comp. Immunol. **25**: 807-825.
- Ngai, P. H., y T. B. Ng, 2007 A mannose-specific tetrameric lectin with mitogenic and antibacterial activities from the ovary of a teleost, the cobia (*Rachycentron canadum*). Appl. Microbiol. Biotechnol. **74**: 433-438.



- NOGA, E. J., AND U. SILPHADUANG, 2003 Piscidins: a novel family of peptide antibiotics from fish. *Drug News Perspect* **16**: 87-92.
- Nonaka, M., y A. Kimura, 2006 Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics* **58**: 701-713.
- O'FARRELL, C., N. VAGHEFI, M. CANTONNET, B. BUTEAU, P. BOUDINOT *et al.*, 2002 Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection. *J. Virol.* **76**: 8040-8049.
- OATES, A. C., P. WOLLBERG, S. J. PRATT, B. H. PAW, S. L. JOHNSON *et al.*, 1999 Zebrafish stat3 is expressed in restricted tissues during embryogenesis and stat1 rescues cytokine signaling in a STAT1-deficient human cell line. *Dev. Dyn.* **215**: 352-370.
- ODOM, E. W., Y G. R. VASTA, 2006 Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (*Morone saxatilis*). *J. Biol. Chem.* **281**: 1698-1713.
- OPPENHEIM, J. J., O. M. Z. HOWARD y E. GOETZL, 2000 Chemotactic factors, neuropeptides, and other ligands for seven transmembrane receptors, pp. 985-1021 in *Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defence*, edited by Academic Press, London.
- ORDÁS, M. C., E. ABOLLO, M. M. COSTA, A. FIGUERAS y B. NOVOA, 2006. Molecular cloning and expression analysis of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) of turbot and sea bream. *Mol. Immunol.* **43**: 882-890.
- ORDÁS, M. C., M. M. COSTA, F. J. ROCA, G. LOPEZ-CASTEJON, V. MULERO *et al.*, 2007 Turbot TNFalpha gene: molecular characterization and biological activity of the recombinant protein. *Mol. Immunol.* **44**: 389-400.
- ORTUNO, J., M. A. ESTEBAN y J. MESEGUER, 2000 Kinetics of hydrogen peroxyde production during *in vitro* respiratory burst of sea bream (*Sparus aurata* L.) head-kidney leucocytes, as measured by flow cytometric method. *Fish Shellfish Immunol.* **10**: 725-729.
- OSHIUMI, H., T. TSUJITA, K. SHIDA, M. MATSUMOTO, K. IKEO *et al.*, 2003 Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics* **54**: 791-800.
- OTTINGER, C. A., S. C. JOHNSON, K. V. EWART, L. L. BROWN y N. W. ROSS, 1999 Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by mannose-binding lectin. *Comp. Biochem. Physiol. C* **123**: 53-59.
- OVERTURF, K., Y S. LAPATRA, 2006 Quantitative expression (Walbaum) of immunological factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after



- infection with either *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, or infectious haematopoietic necrosis virus. J Fish Dis **29**: 215-224.
- PARICHY, D. M., D. G. RANSOM, B. PAW, L. I. ZON y S. L. JOHNSON, 2000 An orthologue of the kit-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. Development **127**: 3031-3044.
- PASCHALL, J. E., M. F. OLEKSIK, J. D. VANWYE, J. L. ROACH, J. A. WHITEHEAD *et al.*, 2004 FunnyBase: a systems level functional annotation of *Fundulus* ESTs for the analysis of gene expression. BMC Genomics **5**: 96.
- PASHOV, A., A. KENDEROV, S. KYURKCHIEV, I. KEHAYOV, S. HRISTOVA *et al.*, 2002 Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire. Int. Immunol. **14**: 453-461.
- PELEGRIN, P., J. GARCIA-CASTILLO, V. MULERO y J. MESEGUER, 2001 Interleukin-1beta isolated from a marine fish reveals up-regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines. Cytokine **16**: 67-72.
- PESTKA, S., C. D. KRAUSE y M. R. WALTER, 2004 Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunol. Rev. **202**: 8-32.
- PINTO, R. D., D. S. NASCIMENTO, A. VALE y N. M. SANTOS, 2006 Molecular cloning and characterization of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) CD8alpha. Vet. Immunol. Immunopathol. **110**: 169-177.
- PINTO, R. D., D. S. NASCIMENTO, M. I. REIS, A. DO VALE y N. M. DOS SANTOS, 2007 Molecular characterization, 3D modelling and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-10. Mol. Immunol. **44**: 2066-2075.
- PLANT, K. P., y R. L. THUNE, 2004 Cloning and characterisation of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Mx gene. Fish Shellfish Immunol. **16**: 391-405.
- PRAVEEN, K., D. L. EVANS y L. JASO-FRIEDMANN, 2004 Evidence for the existence of granzyme-like serine proteases in teleost cytotoxic cells. J. Mol. Evol. **58**: 449-459.
- PRAVEEN, K., D. L. EVANS y L. JASO-FRIEDMANN, 2006 Constitutive expression of tumor necrosis factor-alpha in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. Mol. Immunol. **43**: 279-291.
- PRESS, MCL., B. H. DANNEVIG, y T. LANDSVERK, 1994 Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Shellfish Immunol. **4**: 79-93.



- PURCELL, M. K., K. M. NICHOLS, J. R. WINTON, G. KURATH, G. H. THORGAARD *et al.*, 2006 Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Immunol.* **43**: 2089-2106.
- RAPPOLEE, D. A., AND Z. WERB, 1992 Macrophage-derived growth factors, pp. 87-140 in *Current topics in microbiology and immunology 181—macrophage biology and activation*, edited by S. W. Russell and S. Gordon. Springer, Berlin.
- RAUCH, G., M. KALBE y T. B. REUSCH, 2006 One day is enough: rapid and specific host-parasite interactions in a stickleback-trematode system. *Biol. Lett.* **2**: 382-384.
- REBL, A., E. SIEGL, B. KOLLNER, U. FISCHER y H. M. SEYFERT, 2007 Characterization of twin toll-like receptors from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evolutionary relationship and induced expression by *Aeromonas salmonicida*. *Dev. Comp. Immunol.* **31**: 499-510.
- REDDY, E. P., A. P. KORAPATI, P. CHATURVEDI y S. RANE, 2000 IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene* **19**: 2532-2547.
- REIS, M. I., D. S. NASCIMENTO, A. DO VALE, M. T. SILVA y N. M. DOS SANTOS, 2007a Molecular cloning and characterisation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caspase-3 gene. *Mol. Immunol.* **44**: 774-783.
- REIS, M. I., A. DO VALE, C. PINTO, D. S. NASCIMENTO, C. COSTA-RAMOS *et al.*, 2007b First molecular cloning and characterisation of caspase-9 gene in fish and its involvement in a gram negative septicemia. *Mol. Immunol.* **44**: 1765-1775.
- RENN, S. C., N. AUBIN-HORTH y H. A. HOFMANN, 2004 Biologically meaningful expression profiling across species using heterologous hybridization to a cDNA microarray. *BMC Genomics* **5**: 42.
- RICHARDSON, M. P., B. H. TAY, B. Y. GOH, B. VENKATESH y S. BRENNER, 2001 Molecular cloning and genomic structure of a gene encoding interferon regulatory factor in the pufferfish (*Fugu rubripes*). *Mar. Biotechnol.* **3**: 145-151.
- RISE, M. L., S. R. M. JONES, G. D. BROWN, K. R. VON SHALBURG, W. S. DAVIDSON *et al.*, 2004a Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Physiol. Genomics* **20**: 21-35.
- RISE, M. L., K. R. VON SHALBURG, G. D. BROWN, M. A. MAWER, R. H. DEVLIN *et al.*, 2004b Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics. *Genome Res.* **14**: 478-490.



- ROBERGE, C., D. J. PAEZ, O. ROSSIGNOL, H. GUDERLEY, J. DODSON *et al.*, 2007 Genome-wide survey of the gene expression response to saprolegniasis in Atlantic salmon. *Mol. Immunol.* **44**: 1374-1383.
- ROBERTS, R. M., L. LIU, Q. GUO, D. LEAMAN y J. BIXBY, 1998 The evolution of the type I interferons. *J. Interferon Cytokine Res.* **18**: 805-816.
- ROBERTSEN, B., 2006 The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* **20**: 172-191.
- ROBERTSEN, B., G. TROBRIDGE y J. C. LEONG, 1997 Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Dev. Comp. Immunol.* **21**: 397-412.
- ROBERTSEN, B., V. BERGAN, T. ROKENES, R. LARSEN y A. ALBUQUERQUE, 2003 Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J. Interferon Cytokine Res.* **23**: 601-612.
- ROBERTSEN, B., J. ZOU, C. J. SECOMBES y J. A. LEONG, 2006 Molecular and expression analysis of an interferon-gamma-inducible guanylate-binding protein from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* **30**: 1023-1033.
- ROCA, F. J., M. L. CAYUELA, C. J. SECOMBES, J. MESEGUER y V. MULERO, 2007 Post-transcriptional regulation of cytokine genes in fish: A role for conserved AU-rich elements located in the 3'-untranslated region of their mRNAs. *Mol. Immunol.* **44**: 472-478.
- RODRIGUES, P. N., S. VAZQUEZ-DORADO, J. V. NEVES y J. M. WILSON, 2006 Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Dev. Comp. Immunol.* **30**: 1156-1167.
- ROMBOUT, J. H. W. M., y E. P. H. M. JOOSTEN, 1998 Mucosal immunity, pp 39-40 in *Handbook of vertebrate immunology*, edited by P-P. Pastoret, P. Griebel, H. Bazin and A. Govaerts. Academic Press, New York.
- ROMBOUT, J. H. W. M., N. TAVERNE, M. VAN DE KAMP y A. J. TAVERNE-THIELE, 1993 Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* **17**: 309-317.
- ROSZELL, L. E., y R. S. ANDERSON, 1993 *In vitro* immunomodulation by pentachlorophenol in phagocytes from an estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*, as measured by chemiluminescence activity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **25**: 492-496.
- ROTLANT, J., D. PARRA, R. PETERS, H. BOSHRA y J. O. SUNYER, 2004 Generation, purification and functional characterization of three C3a anaphylatoxins in rainbow trout: role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 815-828.



- RUBENSTEIN, J. L., A. E. BRICE, R. D. CIARANELLO, D. DENNEY, M. H. PORTEUS *et al.*, 1990 Subtractive hybridization system using single-stranded phagemids with directional inserts. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4833-4842.
- SAEIJ, J. P., R. J. STET, A. GROENEVELD, L. B. VERBURG-VAN KEMENADE, W. B. VAN MUISWINKEL *et al.*, 2000 Molecular and functional characterization of a fish inducible-type nitric oxide synthase. *Immunogenetics* **51**: 339-346.
- SAERA-VILA, A., J. A. CALDUCH-GINER, I. NAVARRO y J. PEREZ-SANCHEZ, 2007 Tumour necrosis factor (TNF)alpha as a regulator of fat tissue mass in the Mediterranean gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* (*In press*).
- SAKAI, M., y R. SAVAN, 2004 Characterization of zebrafish immunoglobulin heavy chain (IGH) locus, pp. 94-100 in *Proceeding of JSPS-NRCT International Symposium*, Kasetsart University, Thailand.
- SARGENT, T. D., y I. B. DAWID, 1983 Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* **222**: 135-139.
- SARMENTO, A., F. MARQUES, A. E. ELLIS y A. AFONSO, 2004 Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* **16**: 79-92.
- SAVAN, R., y M. SAKAI, 2002 Analysis of expressed sequence tags (EST) obtained from common carp, *Cyprinus carpio* L., head kidney cells after stimulation by two mitogens, lipopolysaccharide and concavalin-A. *Comp. Biochem. Physiol.* **131**: 71-82.
- SAVAN, R., T. KONO, A. AMAN y M. SAKAI, 2003 Isolation and characterization of a novel CXC chemokine in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Mol. Immunol.* **39**: 829-834.
- SAVAN, R., A. AMAN, M. NAKAO y M. SAKAI, 2005a Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Immunogenetics* **57**: 458-463.
- SAVAN, R., A. AMAN, K. SATO, R. YAMAGUCHI y M. SAKAI, 2005b Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur. J. Immunol.* **35**: 3320-3331.
- SCAPIGLIATI, G., F. BUONOCORE, S. BIRD, J. ZOU, P. PELEGRIN *et al.*, 2001 Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 beta. *Fish Shellfish Immunol.* **11**: 711-726.
- SCAPIGLIATI, G., S. COSTANTINI, G. COLONNA, A. FACCHIANO, F. BUONOCORE *et al.*, 2004 Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 429-441.



- SCHADT, E. E., J. LAMB, X. YANG, J. ZHU, S. EDWARDS *et al.*, 2005 An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nat. Genet.* **37**: 710-717.
- SCHRODER, K., P. J. HERTZOG, T. RAVASI y D. A. HUME, 2004 Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**: 163-189.
- SECOMBES, C. J., 1992 The phylogeny of cytokines, in *The Cytokine Handbook*, edited by A. W. Thomson. Academic Press, London.
- SECOMBES, C. J., 1996 The non-specific Immune system: cellular defences, pp. 63-103 in *The fish immune system: Organisms, pathogen & environment*, edited by G. Iwama and T. Nakanishi. Academic Press Inc, San Diego.
- SECOMBES, C. J., 2002 Cloning and bioactivity of fish cytokines and their relevance to disease resistance. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **22**: 110-116.
- SECOMBES, C. J., L. J. HARDIE AND G. DANIELS, 1996 Cytokines in fish: an update. *Fish Shellfish Immunol.* **6**: 291-304.
- SECOMBES, C. J., J. ZOU, K. LAING, G. D. DANIELS y C. CUNNINGHAM, 1999 Cytokine genes in fish. *Aquaculture* **172**: 93-102.
- SECOMBES, C. J., T. WANG, S. HONG, S. PEDDIE, M. CRAMPE *et al.*, 2001 Cytokines and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 713-723.
- SEGAL, E., M. SHAPIRA, A. REGEV, D. PETER, D. BOTSTEIN *et al.*, 2003 Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nat. Genet.* **34**: 166-176.
- SEPULCRE, M. P., G. LOPEZ-CASTEJON, J. MESEGUER y V. MULERO, 2007 The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Mol. Immunol.* **44**: 2019-2026.
- SHAI, O., Q. D. MORRIS, B. J. BLENCOWE y B. J. FREY, 2006 Inferring global levels of alternative splicing isoforms using a generative model of microarray data. *Bioinformatics* **22**: 606-613.
- SHARP, G. J. E., y C. J. SECOMBES, 1993 The role of reactive species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* **25**: 55-60.
- SHEPHARD, K. L., 1994 Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fisheries* **4**: 401-429.
- SHTRICHMAN, R., y C. E. SAMUEL, 2001 The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 251-259.
- SILPHADUANG, U., A. COLORNI y E. J. NOGA, 2006 Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Dis. Aquat. Organ.* **72**: 241-252.



- SINYAKOV, M. S., M. DROR, H. M. ZHEVELEV, S. MARGEL y R. R. AVTALION, 2002 Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. *Vaccine* **20**: 3668-3674.
- SMITH, V. J., J. M. FERNANDES, S. J. JONES, G. D. KEMP y M. F. TATNER, 2000 Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* **10**: 243-260.
- SOANES, K. H., K. FIGUEREIDO, R. C. RICHARDS, N. R. MATTATALL Y K. V. EWART, 2004 Sequence and expression of C-type lectin receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* **56**: 572-584.
- SRINIVASA RAO, P. S., T. M. LIM Y K. Y. LEUNG, 2001 Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. *Infect. Immun.* **69**: 5689-5697.
- SRINIVASAN, K., L. SHIUE, J. D. HAYES, R. CENTERS, S. FITZWATER ET AL., 2005 Detection and measurement of alternative splicing using splicing-sensitive microarrays. *Methods* **37**: 345-359.
- STAFFORD, J. L., y M. BELOSEVIC, 2003 Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 539-554.
- STAFFORD, J. L., N. F. NEUMANN Y M. BELOSEVIC, 2001 Products of proteolytic cleavage of transferring induce nitric oxide response of goldfish macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 101-115.
- STAFFORD, J. L., K. K. ELLSTAD, K. E. MAGOR, M. BELOSEVIC y B. G. MAGOR, 2003 A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 685-698.
- STAINIER, D.Y., B. FOUQUET, J. N. CHEN, K. S. WARREN, B. M. WEINSTEIN *et al.*, 1996 Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* **123**: 285-292.
- SONG, Y-L., T. LIN y G-H. KOU, 1989 Cell-mediated immunity of the eel, *Anguilla japonica* (Temminck & Schlegel), as measured by the migration inhibition test. *J. Fish Dis.* **12**: 117-123.
- STANSBERG, C., S. SUBRAMANIAM, B. COLLET, C. J. SECOMBES y C. CUNNINGHAM, 2005 Cloning of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) IL-1 receptor associated protein. *Fish Shellfish Immunol.* **19**: 53-65.
- STEINSHAMN, S., M. H. BEMELMANS, L. J. VAN TITS, K. BERGH, W. A. BUURMAN *et al.*, 1996 TNF receptors in murine *Candida albicans* infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defense. *J. Immunol.* **157**: 2155-2159.



- STENVIK, J., y T. O. JORGENSEN, 2000 Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. *Immunogenetics* **51**: 452-461.
- STREISINGER, G., C. WALKER, N. DOWER, D. KNAUBER y F. SINGER, 1981 Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **291**: 293-296.
- STREITER, R. M., P. J. POLVERINI, S. L. KUNKEL, D. A. ARENBERG, M. D. BURDICK *et al.*, 1995 The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **270**: 27348-27356.
- SUBRAMANIAM, S., C. STANSBERG y C. CUNNINGHAM, 2004 The interleukin 1 receptor family. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 415-428.
- SUMATHY, K., K. V. DESAI y P. KONDAIAH, 1997 Isolation of transforming growth factor-beta2 cDNA from a fish, *Cyprinus carpio* by RT-PCR. *Gene* **191**: 103-107.
- SUN, B. J., y P. NIE, 2004 Molecular cloning of the viperin gene and its promoter region from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **101**: 161-170.
- SUNYER, J. O., y J. D. LAMBRIS, 1998 Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunol. Rev.* **166**: 39-57.
- SUNYER, J. O., L. TORT y J. D. LAMBRIS, 1997a Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Biochem. J.* **326**: 877-881.
- SUNYER, J. O., L. TORT y J. D. LAMBRIS, 1997b Structural C3 diversity in fish: characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *J. Immunol.* **158**: 2813-2821.
- SUNYER, J. O., I. K. ZARKADIS y J. D. LAMBRIS, 1998 Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol. Today* **19**: 519-523.
- SUNYER, J. O., H. BOSHRA, G. LORENZO, D. PARRA, B. FREEDMAN *ET AL.*, 2003 Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity. *Immunol. Res.* **27**: 549-564.
- SUZUKI, Y., y T. LIDA, 1992 Fish granulocytes in the process of inflammation. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**: 149-160.
- SWAROOP, A., N. AGARWAL, J. R. GRUEN, D. BICK y S. M. WEISSMAN, 1991 Differential expression of novel Gs alpha signal transduction protein cDNA species. *Nucleic Acids Res.* **19**: 4725-4729.
- TABETA, K., P. GEORGEL, E. JANSSEN, X. DU, K. HOEBE *et al.*, 2004 Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 3516-3521.



- TAFALLA, C., y B. NOVOA, 2000 Requirements for nitric oxide production by teleost fish head kidney macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **24**: 623-631.
- TAFALLA, C., y B. NOVOA, 2001 Respiratory burst of turbot (*Scophthalmus maximus*) macrophages in response to experimental infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Fish Shellfish Immunol.* **11**: 727-734.
- TAFALLA, C., A. FIGUERAS y B. NOVOA, 1999 Role of nitric oxide on the replication of a fish rhabdovirus, viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) on macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **72**: 249-256.
- TAFALLA, C., A. FIGUERAS y B. NOVOA, 2001a Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) alters turbot (*Scophthalmus maximus*) macrophage nitric oxide production. *Dis. Aquat. Org.* **47**: 101-107.
- TAFALLA, C., A. FIGUERAS y B. NOVOA 2001b. Cytotoxic activity against pre-labeled RTG-2 cells in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J. Fish Dis.* **24**: 169-175.
- TAFALLA, C., R. ARANGUREN, C. J. SECOMBES, J. L. CASTRILLO, B. NOVOA *et al.*, 2003 Molecular characterisation of sea bream (*Sparus aurata*) transforming growth factor beta1. *Fish Shellfish Immunol.* **14**: 405-421.
- TAFALLA, C., R. ARANGUREN, C. J. SECOMBES, A. FIGUERAS y B. NOVOA, 2004 Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. *Fish Shellfish Immunol.* **16**: 11-24.
- TAKAHASHI, M., D. IWAKI, A. MATSUSHITA, M. NAKATA, M. MATSUSHITA *ET AL.*, 2006 Cloning and characterization of mannose-binding lectin from lamprey (Agnathans). *J. Immunol.* **176**: 4861-4868.
- TASUMI, S., T. OHIRA, I. KAWAZOE, H. SUETAKE, Y. SUZUKI *et al.*, 2002 Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *J. Biol. Chem.* **277**: 27305-27311.
- TAYLOR, I. S., B. ADAM, M. VEVERKOVA, M. F. TATNER, C. LOW *et al.*, 2005 T-cell antigen receptor genes in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **18**: 445-448.
- THIMME, R., G. FRESE, G. KOCHS y O. HALLER, 1995 Mx1 but not MxA confers resistance against tick-borne Dhori virus in mice. *Virology* **211**: 296-301.
- TROBRIDGE, G. D., y J. A. C. LEONG, 1995 Characterization of a rainbow trout Mx gene. *J. Interferon Cytokine Res.* **15**: 691-702.
- TROBRIDGE, G. D., P. P. CHIOU y J. A. C. LEONG, 1997 Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *J. Virol.* **71**: 5304-5311.
- TSOI, S. C., J. M. CALE, I. M. BIRD, V. EWART, L. L. BROWN *et al.*, 2003 Use of human cDNA microarrays for identification of differentially expressed genes in



- Atlantic salmon liver during *Aeromonas salmonicida* infection. Mar. Biotechnol. **5**: 545-554.
- TSOI, S. C., V. EWART, S. PENNY, K. MELVILLE, R. S. LIEBSCHER *et al.*, 2004 Identification of immune-relevant genes from Atlantic salmon using suppression subtractive hybridization. Mar. Biotechnol. **6**: 199-214.
- VALLEJO, A. N., N. W. MILLER y L. W. CLEM, 1992 Antigen processing and presentation in teleost immune responses. Ann. Rev. Fish Dis. **2**: 73-89.
- VAN MUISWINKEL, W. B., 1995 The piscine immune system: Innate and acquired immunity in *Fish Diseases and Disorders. Vol 1. Protozoan and metazoan infections*, edited by P. T. K. Woo. CAB International. Oxford, UK.
- VASTA, G. R., H. AHMED, S. DU Y D. HENRIKSON, 2004 Galectins in teleost fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity. Glycocon. J. **21**: 503-521.
- VILAIN, C., M-C. WETZEL, L. DU PASQUIER y J. CHARLEMAGNE, 1984 Structural and functional analysis of spontaneous anti-nitrophenyl antibodies in three cyprinid fish species: Carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) tench (*Tinca tinca*). Dev. Comp. Immunol. **8**: 611-622.
- VILCEK, J., y G. C. SEN, 1996 Interferons and other cytokines, pp. 375-399 in *Fields Virology*, edited by B. N Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.
- VILCEK, J., y T. H. LEE, 1991 Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. J. Biol. Chem. **266**: 7313-7316.
- VON SCHALBURG, K. R., M. L. RISE, G. A. COOPER, G. D. BROWN, A. R. GIBBS *et al.*, 2005 Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray. BMC Genomics **6**: 126.
- VOSS, E. W. JR., J. L. FRYER Y G. M. BANOWETZ, 1978 Isolation, purification, and partial characterization of a lectin from chinook salmon ova. Arch. Biochem. Biophys. **186**: 25-34.
- WANG, T., M. WARD, P. GRABOWSKI y C. J. SECOMBES, 2001 Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. Biochem. J. **358**: 747-755.
- WANG, T., J. W. HOLLAND, N. BOLS Y C. J. SECOMBES, 2005 Cloning and expression of the first nonmammalian interleukin-11 gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. FEBS J **272**: 1136-1147.
- WANG, X. H., y K. Y. LEUNG, 2000 Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. Microbiology **146**: 989-998.
- WARR, G. W., 1995 The immunoglobulin genes of fish. Dev. Comp. Immunol. **19**: 1-12.



- WHITE, A., T. C. FLETCHER, M. B. PEPYS y B. A. BALDO, 1981 The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid P-Component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. *Comp. Biochem. Physiol. C* **69**: 325-329.
- WILLIAMS, D. M., B. G. GRUBBS, S. PARK-SNYDER, R. G. RANK y L. F. BONEWALD, 1996 Activation of latent transforming growth factor beta during *Chlamydia trachomatis*-induced murine pneumonia. *Res. Microbiol.* **147**: 251-262.
- WILSON, M., E. BENGTON, N. W. MILLER, L. W. CLEM, L. DU PASQUIER *et al.*, 1997 A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4593-4597.
- WILSON, M. R., y G. W. WARR, 1992 Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Ann Rev Fish Dis* **2**: 201-221.
- WRIDE, M. A., y E. J. SANDERS, 1995 Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat. Embryol. (Berl)* **191**: 1-10.
- YABU, T., H. HIROSE, I. HIRONO, T. KATAGIRI, T. AOKI *et al.*, 1998 Molecular cloning of a novel interferon regulatory factor in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **7**: 138-144.
- YANG, Y. H., y T. SPEED, 2002 Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 579-588.
- YANO, T., 1996 The non-specific immune system: Humoral defense, pp. 105-157 in *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*, edited by G. Iwama and T. Nakanishi. Academic Press, San Diego.
- YIN, Z., T. J. LAM y Y. M. SIN, 1997 Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* **7**: 93-104.
- YOUSIF, A. N., L. J. ALBRIGHT y T. P. T. EVELYN, 1994 *In vitro* evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.* **19**: 15-19.
- ZHANG, Y., y J. GUI, 2004 Molecular characterization and IFN signal pathway analysis of *Carassius auratus* CaSTAT1 identified from the cultured cells in response to virus infection. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 211-227.
- ZHANG, Y., Q. ZHANG, X. DEQUAN, H. CHENGYU y G. JIANFANG, 2003 Identification of antiviral relevant genes in cultured fish cells induced by UV-inactivated virus. *Chinese Society Bulletin* **48**: 581-588.
- Zhang, Y. A., J. Zou, C. I. Chang y C. J. Secombes, 2004 Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **101**: 259-269.
- ZHANG, Y. B., y J. F. GUI, 2004 Identification of two novel interferon-stimulated genes from cultured CAB cells induced by UV-inactivated grass carp hemorrhage virus. *Dis. Aquat. Org.* **60**: 1-9.



- ZHANG, Y. B., C. Y. HU, J. ZHANG, G. P. HUANG, L. H. WEI *et al.*, 2003 Molecular cloning and characterization of crucian carp (*Carassius auratus* L.) interferon regulatory factor 7. *Fish Shellfish Immunol.* **15**: 453-466.
- ZHANG, Y. B., Q. LI Y J. F. GUI, 2004 Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon. *Immunogenetics* **56**: 68-75.
- ZHANG, Y. X., y S. L. CHEN, 2006 Molecular identification, polymorphism, and expression analysis of Major Histocompatibility Complex Class IIA and B genes of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biotechnol.* **8**: 611-623.
- ZOU, J., Scottish Fish Immunology Research Centre, University of Aberdeen, UK. Personal communication.
- Zou, J., S. Bird, J. Truckle, N. Bols, M. Horne *et al.*, 2004a Identification and expression analysis of an IL-18 homologue and its alternatively spliced form in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Eur. J. Biochem.* **271**: 1913-1923.
- ZOU, J., Y. YOSHIURA, J. M. DIJKSTRA, M. SAKAI, M. OTOTAKE *et al.*, 2004b Identification of an interferon gamma homologue in Fugu, *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol.* **17**: 403-409.
- ZOU, J., C. MERCIER, A. KOUSSOUNADIS Y C. SECOMBES, 2007 Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. *Mol. Immunol.* **44**: 638-647.
- ZURCHER, T., J. PAVLOVIC y P. STAEHELI, 1992 Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology* **187**: 796-800.

17

DETERMINANTES GENÉTICOS DE LA VIRULENCIA EN LOS PROCESOS INFECCIOSOS EN ACUICULTURA

DETERMINANTES GENÉTICOS DE LA VIRULENCIA EN LOS PROCESOS INFECCIOSOS EN ACUICULTURA

M. L. Lemos

Universidad de Santiago de Compostela

C. R. Osorio

Universidad de Santiago de Compostela

Resumen

Los factores de virulencia microbianos son los mecanismos mediante los cuáles los microorganismos patógenos pueden multiplicarse en un hospedador y causar un daño en sus células y tejidos. Estos mecanismos son tremendamente complejos y variados y pueden ser distintos para cada microorganismo, aunque hay algunos más extendidos entre los diferentes patógenos como pueden ser los mecanismos de obtención de nutrientes (especialmente del hierro) a partir del hospedador, los sistemas que les permiten evadir los mecanismos de defensa de éste, o la producción de sustancias citotóxicas. Estos factores de virulencia son comunes a los patógenos de muchos vertebrados, incluyendo los peces, e incluso invertebrados. Desde el punto de vista genético, estos mecanismos frecuentemente están codificados por *clusters* de genes que se expresan de forma coordinada y que están regulados al nivel de la transcripción por sistemas de regulación específicos. Entre ellos cabe destacar el regulador transcripcional Fur, que



actúa como regulador global de múltiples genes que están controlados por los niveles de hierro, manteniendo la homeostasis intracelular de este nutriente y regulando otros muchos genes, entre ellos diversos factores de virulencia, o la regulación mediante el *quorum sensing* que activa ciertos genes cuando se alcanza una determinada densidad celular bacteriana. Algunos factores de virulencia de los patógenos de peces se encuentran codificados por genes localizados en plásmidos, que se convierten en plásmidos de virulencia, como es el caso de *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* o *Photobacterium damsela*. Es frecuente también que algunos de estos factores estén codificados por islas genómicas denominadas islas de patogenicidad, aunque son todavía poco conocidas en los patógenos de peces.

Los procesos infecciosos dependen de las interacciones entre el patógeno y el hospedador, interacciones que en los patógenos de peces están todavía escasamente estudiadas. Con objeto de identificar genes relacionados con el proceso infeccioso en las bacterias se han puesto a punto en los últimos años una serie de técnicas moleculares que persiguen aislar y caracterizar los determinantes genéticos de la virulencia. Entre ellas cabe destacar las técnicas que permiten aislar genes bacterianos que se expresan durante la infección, como el IVET para la selección de promotores génicos que se expresan *in vivo* o la mutagénesis mediante transposones marcados (STM), y técnicas que permiten la identificación de genes relacionados con la virulencia como la mutagénesis por transposición *in vivo* o la hibridación sustractiva que permite comparar dos genomas bacterianos completos.

Abstract

Microbial virulence factors are mechanisms by which pathogenic microorganisms can multiply inside the host and can cause an injury in their cells and tissues. These mechanisms are very complex and diverse and can be different for each microorganism, although some of them are widespread among different pathogens. Among these factors could be cited the mechanisms to obtain nutrients (especially iron) from the host, mechanisms that allow the pathogen to overcome the host defenses, or the production of cytotoxic substances. These virulence factors are common to many vertebrates,



including fish, and even invertebrates. These mechanisms are often encoded by gene clusters that are coordinately expressed and that are regulated at the transcriptional level by specific regulatory pathways. Among them we can cite the transcriptional regulator *Fur*, which acts as a global regulator of multiple iron regulated genes, maintaining the cell iron homeostasis and regulating many other genes including those codifying for virulence factors. Other important regulatory system is the quorum sensing, which turns on certain genes when a particular bacterial cell density is reached. Several virulence factors in fish pathogens are encoded by genes harbored by plasmids that become then virulence plasmids. This is the case of *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* or *Photobacterium damsela*. Very often some of the virulence factors are encoded by genomic islands named pathogenicity islands, although these are not yet very well known among fish pathogens.

Infective processes depend on interactions between the pathogen and the host, interactions that are poorly studied in fish pathogens. To identify bacterial genes related to the infective process, several molecular techniques have been developed during the last years. By means of these techniques the genetic determinants of virulence can be isolated and characterized. Among them we can cite the techniques to isolate bacterial genes expressed during the infection, such as IVET (in vivo expression technology) to select the promoters that are expressed in vivo or the signature-tagged transposon mutagenesis (STM) that identifies genes specifically involved in virulence. Other techniques that allow the identification of genes related to virulence are the in vivo transposon mutagenesis or the suppression subtractive hybridization that permits to compare two whole bacterial genomes.

1. INTRODUCCIÓN

La capacidad de un microorganismo para multiplicarse en un hospedador y provocar una infección, depende de la posesión de una serie de mecanismos que conocemos como *factores de virulencia*, un término un tanto ambiguo, no exento de controversia, que refleja la complejidad que subyace en todo proceso infeccioso. Evidentemente la posesión de estos factores de virulencia viene determinada genéticamente en el microorganismo, aunque su expresión en un momen-



to dado y su eficacia dependen también del medio circundante, y especialmente de las condiciones específicas que se encuentren en el hospedador. En realidad, el que el contacto de un microorganismo potencialmente virulento con un vertebrado hospedador resulte en el desarrollo de un proceso infeccioso, y finalmente en la aparición de los síntomas de una enfermedad, depende de complejas interacciones entre el hospedador y el patógeno, interacciones que todavía estamos lejos de comprender del todo, y en las que tan importante es el carácter patógeno del microorganismo, como el grado de susceptibilidad del hospedador a ese microorganismo particular.

La elucidación de estos mecanismos de virulencia y su caracterización molecular se ha ido consiguiendo paulatinamente en los patógenos humanos, pero dista todavía mucho de completarse en los microorganismos patógenos de peces y moluscos, aunque también es cierto que los mecanismos básicos de infección guardan mucha similitud entre patógenos similares de diferentes hospedadores. En este sentido los patógenos de peces se comportan de forma similar a los patógenos de otros vertebrados, aunque existen también diferencias notables en cuanto a los factores de virulencia específicos de cada patógeno y al grado de contribución relativa de cada uno de ellos al desarrollo de la infección. Se puede comprender pues que el conocimiento en profundidad de los diferentes factores de virulencia y de las interacciones hospedador-patógeno es crucial para poder diseñar estrategias eficaces de prevención y tratamiento de las infecciones microbianas, uno de los principales factores limitantes del cultivo de cualquier especie acuícola.

La primera aproximación para identificar los determinantes genéticos que determinan el carácter patógeno de un microorganismo consistió en la identificación de genes individuales que podrían jugar algún papel en el proceso. La estrategia general consistía en la clonación del gen correspondiente y mediante los posteriores procesos de mutación y complementación, siguiendo los clásicos postulados de Koch, se podía determinar si estaba relacionado con el fenotipo de virulencia. De esta forma se han podido identificar genes importantes en la virulencia y sigue siendo un método válido, aunque esta estrategia obvia frecuentemente las complejas interacciones entre diferentes



factores de virulencia dentro del mismo microorganismo y olvida asimismo la otra parte fundamental del proceso infeccioso: las células del hospedador. Por ello se han diseñado estrategias y herramientas (que comentaremos más adelante) que han permitido identificar específicamente secuencias génicas que se expresan durante el proceso infeccioso. Por otra parte, está ampliamente demostrado actualmente que en muchos factores de virulencia no está involucrado un único gen, sino que frecuentemente estos factores están codificados por grupos o *clusters* de genes que se expresan de forma coordinada y que están sometidos a complejos procesos de regulación génica, muchos de los cuáles responden a estímulos medioambientales.

En los últimos años, y debido a los rápidos avances en la secuenciación de los genomas bacterianos, se ha puesto claramente de manifiesto que las bacterias, a diferencia de los eucariotas, han obtenido una proporción significativa de su diversidad genética a través de la adquisición de secuencias o fragmentos de DNA a partir de otras bacterias más o menos alejadas taxonómicamente. Esta transferencia génica horizontal entre células de bacterias diferentes produce genomas extremadamente dinámicos en los que una porción sustancial del DNA puede ser añadido o deleccionado de un genoma bacteriano en un único evento. Entre las múltiples secuencias que pueden adquirirse por transferencia horizontal, unas de las más frecuentes e importantes son precisamente las que codifican distintos factores de virulencia, pudiendo ganarse grandes fragmentos de DNA que incluso pueden transformar una cepa inicialmente avirulenta en una cepa capaz de producir una infección (OCHMAN *et al.* 2000).

2. FACTORES DE VIRULENCIA BACTERIANOS

No es el propósito de este capítulo el hacer una descripción exhaustiva de todos los potenciales factores de virulencia que pueden existir en los microorganismos. Simplemente mencionaremos algunos de los más importantes entre los que han sido descritos hasta el momento en los patógenos bacterianos de peces, que son los patógenos de importancia en acuicultura más estudiados en este sentido.



Los factores de virulencia pueden dividirse *grosso modo* en dos grandes categorías: los que permiten la colonización e invasión del hospedador (dan lugar a una infección propiamente dicha) y los que provocan daños o alteraciones en los tejidos del mismo (desarrollo de la enfermedad). Entre los primeros podemos destacar la presencia de fimbrias y adhesinas que permiten la adherencia a las células del hospedador, la motilidad y quimiotaxis que permiten a los microorganismos alcanzar tejidos específicos, la presencia de cápsulas y características de superficie celular que impiden la fagocitosis por los macrófagos, las variaciones en los antígenos de superficie que permiten evadir la actuación de los anticuerpos, o la presencia de mecanismos de obtención del hierro a partir de las transferrinas y hemoproteínas, que les permiten a los microorganismos multiplicarse en un entorno *a priori* hostil para el crecimiento. Entre los mecanismos que dañan los tejidos y células del hospedador podemos destacar especialmente la producción de exotoxinas, endotoxinas y enzimas como metaloproteasas, serin-proteasas, fosfolipasas o hemolisinas. La importancia de cada uno de estos factores varía de unos patógenos a otros, incluso entre especies próximas. Así, mientras que *Vibrio anguillarum*, *V. vulnificus* o *P. damsela* subsp *damsela* producen proteasas extracelulares, hemolisinas o citotoxinas, otros vibrios como *V. salmonicida* parecen no producir ninguna de esas sustancias.

Uno de los factores más universalmente extendidos entre los diferentes patógenos es la presencia de mecanismos de asimilación de hierro. La importancia de este elemento radica en que es un nutriente esencial para el metabolismo celular y por tanto para la multiplicación bacteriana y actúa además como regulador de la expresión de muchos genes. Sin embargo, el hierro, a pesar de ser un elemento abundante en el cuerpo de los vertebrados no se encuentra en forma libre en el hospedador y prácticamente todo está formando parte de las hemoproteínas o enlazado por las transferrinas. Por tanto, para conseguir este nutriente esencial, los microorganismos patógenos han desarrollado estrategias para obtenerlo a partir de los tejidos del hospedador. En los patógenos de peces se han descrito dos mecanismos básicos: uno que conlleva la producción de sustancias quelantes de hierro de bajo peso molecular, denominadas sideróforos, que se unen al hierro



con una altísima afinidad y pueden por tanto «secuestrarlo» de las transferrinas. Una vez unidos al hierro, los ferri-sideróforos son introducidos de nuevo en la célula a través de receptores y transportadores de membrana (Figura 1). Otro sistema independiente de la producción de sideróforos es la utilización directa de hemo o hemoglobina como fuentes de hierro a través de receptores específicos de membrana que se describen en el siguiente apartado.

Es importante destacar que la caracterización de la mayor parte de los factores de virulencia descritos se ha realizado mediante ensayos *in vitro*, y en muy pocos casos se ha demostrado que dichos factores se produzcan también durante la multiplicación en el hospedador. Únicamente en *V. anguillarum* se ha demostrado *in vivo* la importancia de la posesión de los mecanismos de asimilación de hierro para el desarrollo eficaz de la infección. Asimismo, en la mayor parte de los patógenos

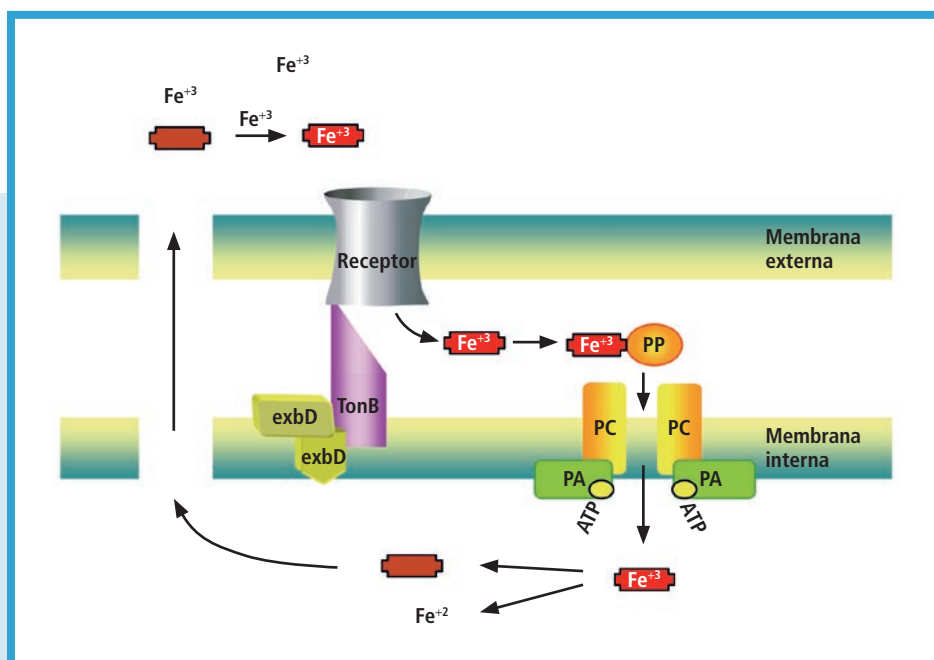


FIGURA 1.

Esquema general del mecanismo de obtención de hierro mediante sideróforos en los patógenos bacterianos Gram-negativos.



se necesita una combinación de varios de estos factores para producir una infección con éxito.

3. GENES DE TRANSPORTE DE HEMO Y SISTEMAS TonB: UN EJEMPLO DE SISTEMAS COMUNES A DIFERENTES PATÓGENOS

Uno de los sistemas de obtención de hierro a partir del hospedador que más se han estudiado en los patógenos de peces son los mecanismos que se basan en la utilización de la hemina y la hemoglobina como fuentes de hierro (LEMONS y OSORIO 2007). En *V. anguillarum* se ha identificado un cluster de nueve genes implicados en la utilización de hemo, genes que codifican: un receptor de membrana externa (*huvA*) que sirve como receptor específico del grupo hemo, dos genes de función todavía desconocida (*huvZX*) aunque probablemente implicados en la metabolización del hemo; tres genes de un sistema TonB (*tonB1exbB1D1*) que proporcionan la energía necesaria para el transporte; y tres genes involucrados en el transporte del grupo hemo desde el periplasma al citoplasma (*huvBCD*) que forman un sistema de transporte a través de la membrana del tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*). La proteína HuvB constituye la proteína de unión de hemo en el periplasma, HuvC es una permeasa de membrana interna y HuvD sería la ATPasa del transportador de tipo ABC. La mutación de cada uno de los genes del sistema, ha demostrado que los genes *huvAZBCD* son esenciales para la utilización de hemo como fuente de hierro por *V. anguillarum*, mientras que *huvZ* es prescindible. HuvZ no parece tener una función en el transporte de hemo, estando relacionada probablemente con el metabolismo del hemo dentro de la célula. El análisis transcripcional, mediante RT-PCR, demostró que los 9 genes están organizados en 3 unidades transcripcionales: (1) *huvA*, (2) *huvXZ*, y (3) *tonB1exbB1D1-huvBCD*. Mediante la construcción de fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* y posterior análisis de la actividad β -galactosidasa, se ha demostrado que los promotores de las 3 unidades están regulados por hierro a través del regulador transcripcional Fur (MOURINO *et al.* 2004; 2006) (ver Figura 4).



Se ha comprobado además que existe también en este sistema una variabilidad entre las diferentes cepas de *V. anguillarum*, puesto que no todas las cepas poseen el gen *huvA* que codifica el receptor de hemo. Así, en las cepas que carecen de *huvA* se identificó un segundo gen, *huvS*, codificante también de un receptor de membrana, y que está presente en todas las cepas que carecen de HuvA, siendo además ambos receptores funcionalmente intercambiables (MOURIÑO *et al.* 2006). La existencia en *V. anguillarum* de diferentes receptores para grupos hemo, sugiere que se trata de un sistema de obtención de hierro de gran importancia para la multiplicación de esta bacteria en los tejidos del pez.

Además del sistema TonB ligado al transporte de hemo, *V. anguillarum*, al igual que otros vibrios, posee un segundo sistema TonB denominado TonB2. Mediante la construcción de mutantes del sistema TonB1, TonB2 y dobles mutantes TonB1-2, se ha comprobado que los receptores de hemo pueden utilizar indistintamente cualquiera de los dos sistemas, mientras que el sistema TonB2 es exclusivo para la utilización del transporte de hierro mediante el sideróforo anguibactina. Aunque la mutación de ambos sistemas por separado conlleva una disminución de la virulencia, la mutación del sistema TonB2 produce un acusado descenso en el grado de virulencia de *V. anguillarum*, demostrando que es un sistema básico en el mecanismo de infección (STORK *et al.* 2004).

Un sistema similar al de *V. anguillarum* se ha caracterizado también en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, en dónde existen homólogos de los genes *huvZXBCD* (denominados *hutZXBCD*) y *tonBexbBD* descritos en *V. anguillarum*, así como un nuevo gen, *hutW*, ausente en el cluster de *V. anguillarum* pero del que sí existen homólogos descritos en otras especies, y que está asociado a los genes de transporte de hemo. A diferencia de *V. anguillarum*, el receptor de membrana de hemo, *hutA*, no se encuentra formando parte del cluster, lo cual es similar a lo descrito en otros vibrios. La organización espacial de estos genes, caracterizados en *P. damsela* subsp. *piscicida*, es muy similar a la ya descrita en el cromosoma de otras bacterias, como *V. cholerae* (Figura 2). Curiosamente esta organización génica es idéntica en *P. damsela* subsp. *damsela* (*Vibrio damsela*), una bacteria que puede

infectar tanto a peces como a otras especies acuícolas, e incluso puede ser patógeno humano. Los 9 genes que forman el cluster (aparte del receptor *hutA*) se transcriben en 2 operones, uno formado por los genes *hutWXZ* y otro por el resto, comenzando la transcripción por el gen *tonB* y continuando hasta el *hutD*. Los niveles de expresión del mRNA para estas 3 unidades transcripcionales, demuestran que todas están reguladas por los niveles de hierro a través del regulador transcripcional Fur, demostrando claramente que este sistema sirve a la célula como mecanismo de obtención de hierro (Juiz-Río *et al.* 2005).

El análisis de la distribución de los genes del transporte de hemo en cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* de diversos orígenes ha demostrado que no todas las cepas son homogéneas en la presencia de los diferentes genes. Concretamente, el gen *hutA*, que codifica el receptor de membrana, solamente se encuentra intacto en las cepas de origen japonés y en todas las cepas de la subsp. *damsela*, pero está inactivado en todas las cepas de origen europeo y americano

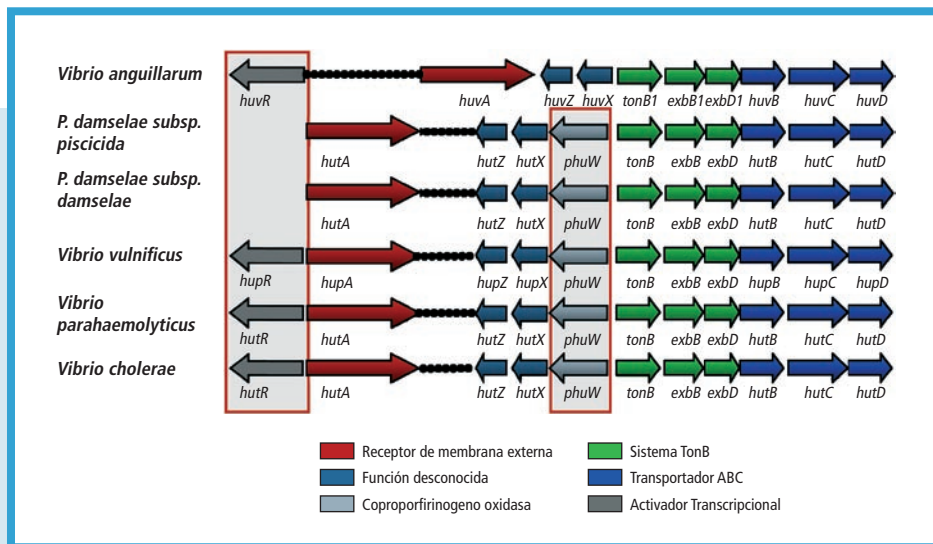


FIGURA 2.

Organización de los genes del sistema de transporte de hemo en varios patógenos de peces de la familia *Vibrionaceae*. Se incluye a modo comparativo la misma región genómica de *Vibrio cholerae*. Se enmarcan las principales diferencias entre especies.



analizadas, constituyendo un pseudogen. Estos resultados sugieren la existencia de 2 poblaciones clonales diferentes en *P. damselae* subsp *piscicida*, lo cual es particularmente interesante desde el punto de vista epidemiológico. La existencia de este gen inactivado indica que al igual que en *V. anguillarum*, debe existir otro receptor funcional, el cual todavía no ha sido caracterizado (Juiz-Rio et al. 2005).

4. PLÁSMIDOS Y VIRULENCIA

Aunque la presencia de plásmidos es común en muchos patógenos bacterianos de peces, codificando típicamente mecanismos de resistencia a antibióticos, en pocos casos se ha podido correlacionar la presencia de estos elementos genéticos extracromosómicos con la virulencia. Sin embargo, en algunos patógenos de peces se ha demostrado claramente que parte de los genes que codifican factores de virulencia residen en plásmidos, convirtiéndose éstos en elementos imprescindibles para la virulencia del microorganismo.

Uno de los casos más estudiados y dónde se ha demostrado sin lugar a dudas la relación con la virulencia, es el plásmido pJM1 de *V. anguillarum*. Este plásmido de 65 kb, presente en la mayor parte de las cepas pertenecientes al serotipo O1, contiene la mayoría de los genes necesarios para la biosíntesis de anguibactina (un agente quelante que le permite a la célula microbiana obtener hierro con una elevada eficiencia a partir de las transferrinas del suero del hospedador) y la síntesis de una proteína de membrana externa de 86 kDal (codificada por el gen *fatA*) que actúa como receptor específico del complejo hierro-sideróforo para el posterior transporte del sideróforo al interior celular. Todo el sistema está regulado positivamente por la acción de la proteína AngR, codificada también en el plásmido y negativamente por la proteína Fur y por 2 RNA antisentido codificados en el propio plásmido. De las 59 ORFs que contiene, aproximadamente un tercio están relacionadas con el metabolismo del hierro, y otro tercio son de función todavía desconocida (STORK et al. 2002). Es de destacar el hecho de que los genes implicados en la obtención de hierro están organizados en clusters flanqueados por secuencias de inserción, formando estructuras de tipo transposón, que sugieren una organiza-



ción modular de las diferentes secuencias. Se ha demostrado también que este plásmido, aunque muy conservado entre diferentes cepas presenta una elevada micro-heterogeneidad entre cepas de diferentes orígenes. La eliminación de este plásmido conlleva una drástica reducción en la virulencia para los peces de las cepas que lo poseen (STORK *et al.* 2002).

La complejidad de estos factores de virulencia viene ilustrada por el hecho de que existen otras muchas cepas patógenas de *V. anguillarum* que carecen de este plásmido. Dichas cepas poseen también un sistema de asimilación de hierro basado en la síntesis de sideróforos, pero los genes que lo codifican están agrupados en un fragmento cromosómico de aproximadamente 20 kb (BALADO *et al.* 2006). Este fragmento codifica la síntesis y transporte de un sideróforo, denominado vanchrobactina, de estructura completamente distinta a la de anguibactina codificada en el plásmido pJM1. Curiosamente, al menos una parte de este fragmento que codifica la vanchrobactina está también presente en las cepas que poseen el plásmido, pero en éstas el sistema de asimilación de hierro funcional parece ser únicamente el plasmídico.

Otro caso paradigmático es *Aeromonas salmonicida*, en la que la presencia de diferentes plásmidos de pequeño tamaño está ampliamente documentada. Recientemente se ha demostrado que uno de estos plásmidos de unas 6 kb codifica un efector que es secretado por un mecanismo de secreción de tipo III, un importante factor de virulencia en esta bacteria mediante el cual la célula bacteriana secreta e introduce en el citoplasma de las células del hospedador la toxina AexT, una toxina ADP-ribosilante considerada como uno de los principales factores de virulencia de esta bacteria imprescindible para el establecimiento de la infección (BURR *et al.* 2005). El gen *aopP* presente en el plásmido codifica una proteína efectora que interfiere con la expresión génica de las células del hospedador mediante la inhibición del factor nuclear de transcripción kappa B (FEHR *et al.* 2006). A tenor de los datos disponibles hasta el momento es posible que también otros plásmidos de *A. salmonicida* jueguen un papel determinante en la virulencia de esta bacteria.

Otro ejemplo recientemente caracterizado es la codificación de una toxina apoptótica en un plásmido de *Photobacterium damsela*



subsp. *piscicida*. Se ha demostrado que esta exotoxina (AIP56) induce la apoptosis de los macrófagos y neutrófilos de dorada, con la resultante lisis de estos fagocitos. Esta toxina está presente únicamente en las cepas virulentas y está claramente demostrado que es uno de los principales factores de virulencia que posee esta bacteria (DO VALE *et al.* 2005). No se descarta actualmente que otros mecanismos de virulencia como la síntesis de sideróforos esté también codificada por genes plasmídicos en *P. damselae*.

Recientemente se ha demostrado asimismo que en *Mycobacterium marinum* la producción de una toxina apoptótica y necrotizante de tipo macrólido, la micolactona F, está codificada en un plásmido.

5. ISLAS DE PATOGENICIDAD

En las enfermedades infecciosas son de especial importancia las islas patogénicas bacterianas (PAIs o *pathogenicity islands*), segmentos multigénicos de las cepas virulentas, que suelen estar ausentes en miembros avirulentos de la misma especie. Tras la descripción de la primera isla de patogenicidad en cepas de *E. coli* extraintestinales (HACKER *et al.* 1990), las PAIs han despertado un gran interés en los últimos años debido al papel que juegan en la virulencia de bacterias como *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis*, entre otras. Estos elementos, con una longitud de decenas de kilobases, suelen portar genes involucrados en la virulencia. Frecuentemente se integran cerca de genes codificadores de tRNAs, generando pequeñas duplicaciones del sitio de inserción, y se piensa que su inserción es catalizada por integrasas similares a las de algunos fagos lisogénicos, codificadas en la propia isla de patogenicidad. En la gran mayoría de los casos se desconoce el modo exacto de transferencia de estas islas, y de hecho tan sólo se ha demostrado la movilidad de dos PAIs: la isla que contiene el gen para la toxina de choque tóxico en *Staphylococcus aureus* se ha descrito que puede ser transferida entre cepas con la ayuda de un fago *helper* (LINDSAY *et al.* 1998). El segundo ejemplo es la HPI (high pathogenicity island) de *Yersinia pseudotuberculosis* que codifica un sistema de síntesis y transporte para el sideróforo yersiniabactina, y que si bien puede transmi-

tirse horizontalmente, se desconoce por completo el mecanismo que emplea para ello (LESIC y CARNIEL 2005).

Hasta el momento, son pocos los ejemplos de islas de patogenicidad descritas en patógenos de importancia en acuicultura, si bien esto puede explicarse por el lento avance de la aplicación de la genómica estructural y funcional a dichos patógenos. En el patógeno de peces *P. damsela* subsp. *piscicida*, se identificó recientemente (OSORIO *et al.* 2006) un cluster de genes, responsable de la síntesis de un sideróforo, que probablemente constituye una isla de patogenicidad que ha sido adquirida por transferencia horizontal. Curiosamente, la organización génica de esta región de unas 35 kb resultó ser muy similar a la de la HPI de *Yersinia* (Figura 3). Al igual que ésta contiene varios genes involucrados en la biosíntesis y transporte de sideróforos, destacando la presencia de genes que codifican enzimas biosintéticas de gran tamaño del tipo de las péptido-sintetasas no ribosómicas, complejos multienzimáticos organizados en diferentes módulos catalíticos. La inactivación de uno de estos genes biosintéticos produce un marcado descenso de la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida*, lo que de nuevo demuestra la importancia que tienen los mecanismos de asimilación de hierro para el desarrollo de las infecciones bacterianas. Es de destacar el hecho de que esta isla de patogenicidad no se encuentra en todas las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, sino únicamente en los aislados de origen europeo, lo que refuerza la idea de que ha sido ganada probablemente por transferencia horizontal.

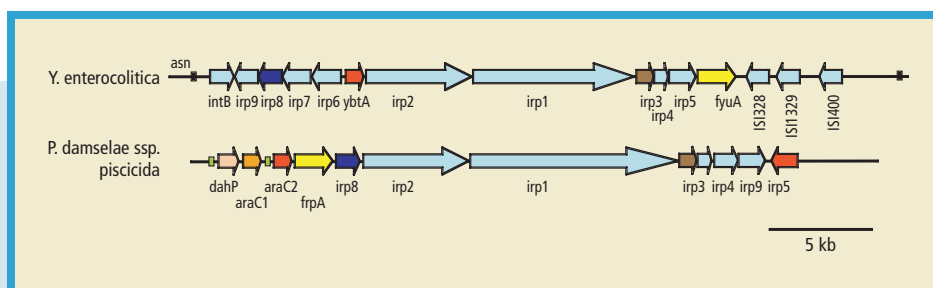


FIGURA 3.

Organización de los genes de una isla de patogenicidad en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, comparada con la isla homóloga de *Yersinia enterocolitica*.



Es de esperar que en un futuro próximo el avance en la disponibilidad de datos genómicos de los microorganismos, permita que nuestro conocimiento sobre la contribución de las islas de patogenicidad a la virulencia en patógenos de peces y moluscos se vea incrementada sustancialmente.

6. REGULACIÓN GÉNICA Y VIRULENCIA

Además de las funciones fisiológicas en las que interviene, el hierro juega un papel determinante como regulador de diferentes factores de virulencia como toxinas, enzimas, adhesinas, etc. Sin embargo, a pesar de la importancia de este metal, concentraciones superiores a los niveles fisiológicos producen una inhibición del crecimiento, llegando a la toxicidad. Por tanto, los niveles intracelulares de hierro deben estar estrictamente controlados (ANDREWS *et al.* 2003). Se ha demostrado que en muchos microorganismos estos niveles de hierro están regulados por una proteína reguladora denominada «Fur» (*Ferric Uptake Regulator*) (PANINA *et al.* 2001). Esta proteína actúa como regulador transcripcional de prácticamente todos los genes implicados en los procesos celulares dependientes de hierro (síntesis de: sideróforos, proteínas de membrana, toxinas, aminoácidos, rutas metabólicas reguladas por hierro, etc.) (Figura 4), actuando en muchos casos a través de un intermediario, un pequeño RNA denominado RyhB. La proteína Fur, originalmente encontrada en *E. coli*, ha sido caracterizada en muchos otros microorganismos diferentes y también en los patógenos de peces *V. anguillarum* y en *P. damselae* (JULÍZ-RÍO *et al.* 2004), siendo una proteína muy conservada entre las diferentes especies, lo que indica su carácter determinante en el metabolismo celular, siendo también por tanto esencial para la virulencia bacteriana, aunque esto todavía no ha sido demostrado fehacientemente en todos los patógenos, especialmente en los de peces.

Por otra parte, se han identificado en numerosas especies bacterianas otros reguladores transcripcionales que son reguladores positivos de los genes de síntesis y transporte de sideróforos. La acción concertada de reguladores positivos y negativos en bacterias capaces de utilizar diferentes fuentes de hierro, asegura que los genes codifi-

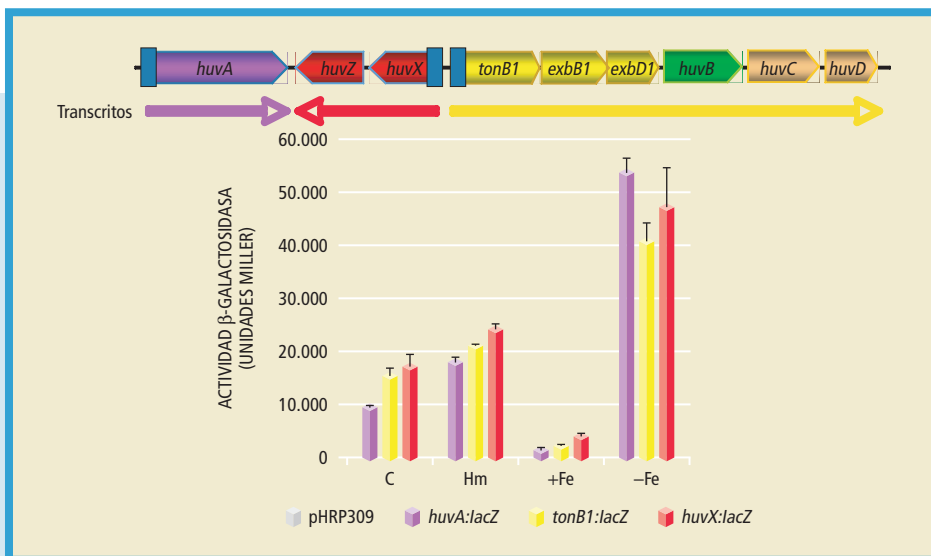


FIGURA 4.

Ejemplo de regulación por hierro de los 3 promotores del cluster de transporte de hemo de *Vibrio anguillarum*. La expresión génica se cuantifica mediante la actividad β-galactosidasa de fusiones transcripcionales entre cada promotor y el gen indicador *lacZ*. C: medio control; Hm: células en presencia de hemo; +Fe: células con un exceso de hierro; -Fe: células con déficit de hierro.

cadore de funciones específicas de transporte de este ión se expresen de forma máxima únicamente bajo las condiciones apropiadas. Todos estos activadores están codificados por genes a su vez regulados por la proteína Fur y son reguladores capaces de responder a la presencia del sideróforo unido al hierro. La mayoría están codificados dentro del propio *cluster* de genes de biosíntesis y/o transporte de sideróforos y pueden ser de tres tipos básicos, (i) factores sigma alternativos, (ii), sistemas clásicos de dos componentes, y (iii) activadores de la familia AraC. Estos últimos, si bien originalmente se describieron como activadores de genes relacionados con el metabolismo de los azúcares, en los últimos años se han descubierto varios miembros de esta familia que activan genes de síntesis y transporte de sideróforos. En todos los casos son activadores codificados por genes regulados negativamente



por la proteína Fur, y que para ejercer su acción positiva precisan de la previa interacción con el sideróforo respectivo.

7. REGULACIÓN GÉNICA MEDIANTE QUORUM SENSING

Las células bacterianas utilizan pues sistemas de señal intracelulares que les permiten detectar y procesar diversa información del ambiente, pero también existen sistemas que les permiten percibir información procedente de otras células bacterianas mediante mecanismos de comunicación intercelular que regulan la transcripción de múltiples genes. Este sistema de comunicación denominado *quorum sensing* depende de la producción de una o varias moléculas señal, feromonas o autoinductores, que permiten a una bacteria determinar la densidad de población celular en cada momento. Este mecanismo de comportamiento multicelular regula diversos procesos fisiológicos como la bioluminiscencia, la biosíntesis de antibióticos, la transferencia de plásmidos por conjugación o precisamente la producción de diversos factores de virulencia. Parece que este tipo de mecanismos persiguen asegurar que la infección bacteriana sea exitosa superando los mecanismos de defensa del hospedador. A una baja densidad de células bacterianas probablemente el sistema inmune sea capaz de atajar la infección. Por el contrario, la producción simultánea por un elevado número de bacterias de uno o más factores de virulencia, aseguraría que los sistemas de defensa se vean superados e incapaces de eliminar la infección. El éxito evolutivo de esta estrategia parece confirmado por su presencia en un elevado número de bacterias patógenas diferentes.

En las bacterias Gram-negativas la familia mejor conocida de moléculas señal son las lactonas de N-acil-homoserina (AHLs), mientras que en bacterias Gram-positivas se trata frecuentemente de péptidos con modificaciones post-traduccionales. Aunque este tipo de sistemas todavía se conocen poco en los patógenos de peces, se ha demostrado que todas las cepas de bacterias diferentes como *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *V. salmonicida* o *V. vulnificus* (BRUHN *et al.* 2005) producen autoinductores de la familia de las AHLs. En *V. anguillarum*, dónde se ha estudiado



más en profundidad el *quorum sensing*, se ha demostrado que este mecanismo regula la síntesis de proteasas, la producción de pigmentos y la formación de biopelículas, todos ellos factores necesarios para la supervivencia en el agua y en el hospedador (MILTON 2006). Este tipo de sistemas de regulación génica están recibiendo mucha atención últimamente porque podrían permitir el desarrollo de nuevos métodos de control de las infecciones, mediante la utilización de sustancias que interfieran con la síntesis o transmisión de los autoinductores, interrumpiendo de esta manera la comunicación intercelular y por tanto la expresión de genes esenciales, y especialmente de los relacionados con la virulencia y regulados mediante el *quorum sensing*. En este sentido, algunos datos recientes apuntan a que ésta puede ser una vía prometedora para el control de la vibriosis en peces (MILTON 2006).

8. HERRAMIENTAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DETERMINANTES GENÉTICOS DE LA VIRULENCIA

Durante los últimos años hemos asistido al desarrollo de numerosas técnicas de biología molecular que representan herramientas muy valiosas para la detección y caracterización de genes bacterianos relacionados con la virulencia. De especial interés son las técnicas que permiten la identificación de genes cuya expresión tiene lugar durante el proceso infectivo, como las denominadas IVET y STM. Otras metodologías alternativas posibilitan la identificación de genes candidatos a estar involucrados en la virulencia, si bien su papel final en el proceso, y/o su expresión en condiciones *in vivo*, precisan ser corroboradas mediante experimentos adicionales. Además, el análisis de las secuencias de genomas bacterianos completos, y las aplicaciones de la proteómica, son cada vez una fuente más útil de información biológica para el estudio de las bases genéticas de la virulencia bacteriana. A continuación exponemos algunas de las técnicas más utilizadas para la identificación de posibles determinantes genéticos de la virulencia en bacterias, con especial énfasis en



aquellas metodologías que han sido aplicadas con éxito al estudio de patógenos de la acuicultura.

9. EXPRESIÓN *IN VIVO* DE GENES BACTERIANOS DURANTE LA INFECCIÓN

La mayor parte de nuestro conocimiento actual acerca de los determinantes moleculares de la patogenicidad bacteriana, proviene de estudios realizados con cultivos *in vitro*. Sin embargo, la patogenicidad es una propiedad multifactorial que únicamente se manifiesta en su totalidad en condiciones *in vivo*, situación en la cual las condiciones ambientales difieren notablemente con respecto a las de laboratorio. Además, las condiciones *in vivo* están sujetas a variaciones a medida que la infección progresa, en respuesta a la inflamación, degradación tisular y dispersión del agente infeccioso de un lugar a otro del organismo infectado. Por tanto, los patógenos bacterianos sufrirán durante el proceso infeccioso, cambios en la disponibilidad de nutrientes y otros sustratos, y estos cambios redundarán en cambios en la expresión génica de la bacteria. El entorno que la bacteria se encuentra cuando infecta un hospedador, tiene una influencia determinante en la tasa de multiplicación bacteriana y en el tamaño de la población del patógeno, así como en la producción de factores de virulencia. Es por ello que en la actualidad existe un interés creciente por conocer qué ocurre en la expresión génica en un patógeno bacteriano cuando se encuentra dentro del hospedador infectado. Métodos genéticos novedosos nos revelan como se comportan las bacterias durante la infección, dando respuesta a numerosos interrogantes, como por ejemplo qué factores de virulencia se producen en diferentes momentos de la infección, como se regula la síntesis de factores de virulencia, y qué tipo de nutrientes se hacen disponibles a medida que progresa la infección y como los utiliza la bacteria.

Dentro de las técnicas genético-moleculares desarrolladas en los últimos años para determinar la expresión *in vivo* de genes bacterianos, así como su posible papel en la virulencia, haremos hincapié en dos de ellas que han sido utilizadas con éxito en el estudio de patóge-



nos bacterianos de la acuicultura: *In vivo expression technology* (IVET), y *Signature-tagged transposon mutagenesis* (STM).

9.1. In Vivo Expression Technology (IVET)

La técnica de expresión *in vivo* o IVET, es un método de selección positiva de genes bacterianos cuya expresión es inducida específicamente cuando la bacteria se encuentra infectando un hospedador. Diseñada inicialmente por MAHAN *et al.* (1993), se basa en utilizar una cepa de la especie a estudiar que porte una mutación en un gen biosintético de forma que su crecimiento *in vivo* esté muy atenuado o prácticamente impedido, siendo la mutación en el gen *purA* (biosíntesis de purinas) el caso más utilizado. Dicha cepa se complementa con una genoteca construida en un plásmido suicida (pIVET1) que contiene los genes *purA* y *lacZ* sin sus respectivos promotores, de forma que se generan fusiones transcripcionales entre fragmentos del genoma de la cepa a estudiar y los genes *purA* y *lacZ*. Seleccionando con el antibiótico correspondiente al gen de resistencia contenido en pIVET1 (ampicilina), los plásmidos suicidas se integran en el cromosoma mediante recombinación homóloga. La posterior selección de clones con fenotipo PurA+ en el hospedador, es un poderoso medio de selección positiva de promotores que se han expresado *in vivo*. El gen *purA* del plásmido está además fusionado al gen *lacZ*, de forma que los clones PurA+ recuperados tras el pase por el hospedador, pueden ser analizados posteriormente en placas de medio MacConkey con lactosa, para descartar aquellos promotores que también se expresan en condiciones *in vitro*. De esta forma, se aíslan específicamente aquellos promotores que únicamente se expresan durante el proceso infectivo (Figura 5).

Esta técnica sin embargo tiene también algunas limitaciones. Así, genes que se expresan *in vivo* pero que también se expresan *in vitro*, son eliminados del análisis. Por otra parte, genes que se expresan muy activamente durante la infección se ven altamente favorecidos en el resultado final, mientras que genes que solamente se expresan transitoriamente o durante un período concreto del proceso infectivo, o que se expresan a bajos niveles, estarán infra-representados. Debido a algunas de estas limitaciones en la técnica de IVET, durante los años subsiguientes a su desarrollo han ido surgiendo variantes de esta

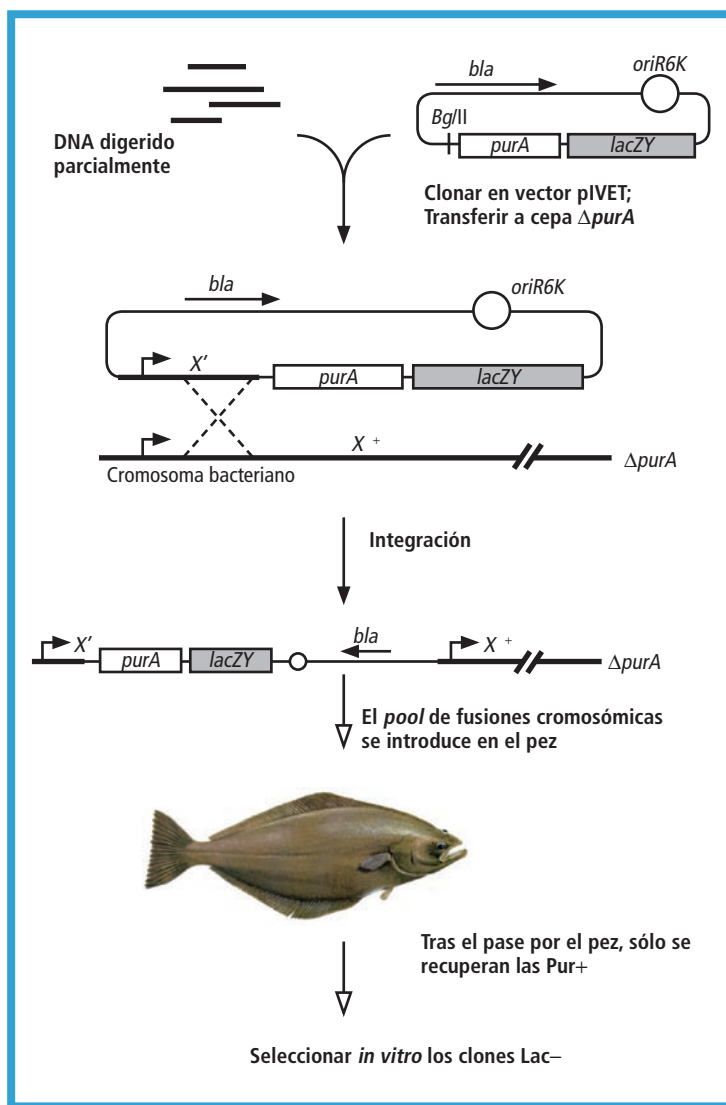


FIGURA 5. Esquema general de la técnica IVET para la identificación de promotores que se expresan *in vivo*.

técnica que tratan de mejorarla en algunos aspectos. Este es el caso de la variante conocida como RIVET (*recombinase-based IVET system*), diseñada para poder monitorizar espacial- y temporalmente los patrones de la expresión génica durante la infección (CAMILI *et al.* 1994). Posteriores modificaciones incluyeron el uso de genes de resistencia a



antibióticos en vez del gen *purA*, evitando de este modo la necesidad de construir previamente mutantes auxotróficos en la cepa bacteriana a estudiar (MAHAN *et al.* 1995).

Dentro de los numerosos genes que se expresan *in vivo* y que han sido identificados por IVET, abundan especialmente los genes involucrados en: adquisición de metales (fundamentalmente el hierro), síntesis y adquisición de nucleótidos y cofactores, reparación de DNA, modificaciones de la membrana, termotolerancia, y resistencia a cambios en la osmolaridad y el pH (SMITH 1998; MAHAN *et al.* 2000).

Aplicando la técnica de IVET, FERNÁNDEZ *et al.* (2004) identificaron 14 loci génicos en *Yersinia ruckeri* cuya expresión se induce específicamente durante la infección en trucha. Cuatro de los clones correspondieron a genes relacionados con la síntesis y el transporte del sideróforo ruckerbactina, lo cual sugiere una vez más que los sistemas de captación de hierro deben jugar un papel preponderante durante los procesos infectivos, y su expresión durante los mismos se ve incrementada con respecto a las condiciones en medios de cultivo *in vitro*. Además, la relevancia de estos genes en la virulencia se demostró mediante la construcción de mutantes por inactivación génica de dos de estos genes, *rucC* y *rupG*, comprobándose que la mutación de estos genes conlleva una notable disminución en la virulencia de esta bacteria para peces. Otros genes de expresión inducida *in vivo*, determinados mediante IVET en *Y. ruckeri* incluyen genes de sistemas de secreción tipo IV, genes de proteínas de sistemas reguladores de dos componentes, así como otros similares a genes descritos en otras especies y con un papel en la virulencia, como por ejemplo genes relacionados con la adherencia y genes de hemolisinas.

9.2. Signature-Tagged transposon mutagenesis (STM)

En la década de 1980 tuvo lugar el desarrollo de sistemas basados en la mutagénesis con transposones seleccionables (SLAUCH y SILHAVY 1991), que permitieron la generación de mutantes y su estudio fenotípico. Desde entonces, han sido muchos los genes relacionados con la virulencia descubiertos gracias al uso de transposones. La técnica denominada *Signature-Tagged transposon mutagenesis* ó STM, es un sistema de selección negativa, en el cual un hospedador es infectado experimentalmente con



un conjunto de mutantes obtenidos por inserción de transposones que poseen marcajes únicos (*sequence-tags*), y tras el paso por el organismo hospedador se identifican los mutantes individuales que no han sido capaces de sobrevivir en el mismo. La principal ventaja de la STM estriba en el hecho de que identifica directamente genes involucrados en la virulencia, y no indirectamente por su expresión *in vivo*, como ocurría con el IVET. Realmente, su principal estrategia de operación es identificar genes cuya función es necesaria para la supervivencia de la bacteria dentro del hospedador. Por tanto, esta técnica posibilita una nueva forma de abordar el estudio de las interacciones patógeno-hospedador. Sin embargo, también posee algunas limitaciones. La más importante es la infra-representación de genes cuya mutación conlleve un lento crecimiento, genes que codifiquen funciones redundantes, y genes cuya mutación pueda ser complementada en una población mixta de la especie (por ejemplo genes que codifican factores secretados al medio externo).

La STM, originalmente diseñada por HENSEL *et al.* (1995), ha sido aplicada con éxito en especies tan dispares como *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* o *Haemophilus influenzae*. Recientemente, se utilizó para identificar genes involucrados en la virulencia en el patógeno de peces *Streptococcus iniae* (MILLER y NEELY 2005). Estos autores realizaron un análisis con 1128 mutantes por transposición, seleccionando finalmente 41 mutantes potenciales que fueron incapaces de sobrevivir en un modelo experimental con pez cebra. El estudio detallado de los genes que habían sido inactivados por los transposones, reveló que correspondían a varias categorías, incluyendo genes relacionados con la síntesis de material capsular, serín-proteasas, transportadores de metabolitos, así como genes de función desconocida. Este estudio fue particularmente determinante para demostrar la importancia de la cápsula en la virulencia de *Streptococcus iniae* para peces.

10. MUTAGÉNESIS POR TRANSPOSICIÓN IN VIVO

Con este nombre se describe la utilización de transposones para mutagenizar directamente una especie bacteriana a estudiar, tanto en condiciones de laboratorio como ambientales (en oposición a la trans-



posición *in vitro*, donde lo que se mutageniza es el DNA bacteriano previamente purificado). Se trata de una denominación en sentido amplio, dado que dependiendo del transposón utilizado así como del procedimiento empleado en la selección de los mutantes, el tipo de información obtenida es diferente. La situación más sencilla estriba en utilizar un transposón (por ejemplo Tn5 ó Tn10) para generar una biblioteca de mutantes al azar. Esta aproximación es de utilidad para identificar genes cuya mutación produzca un efecto fácilmente detectable, como por ejemplo la pérdida de una característica fenotípica visualizable en cultivos *in vitro*. De esta forma se pueden identificar genes de biosíntesis de sideróforos (mediante réplicas de los mutantes en placas de medios indicadores para la producción de sideróforos), genes de proteasas, lipasas, DNasas etc. Una vez identificados estos genes, debe procederse a su inactivación y posterior ensayo en modelos experimentales de infección para determinar si juegan un papel en la virulencia.

Una aplicación específica ampliamente utilizada es la que se basa en el uso de transposones que contienen genes indicadores como el de la fosfatasa alcalina (*phoA*) que, tras su inserción en el cromosoma, generan fusiones traduccionales con el gen *phoA*. La actividad fosfatasa alcalina solamente se detectará en los mutantes en los cuales el transposón se haya insertado en la pauta de lectura correcta dentro de un gen que codifique un producto de membrana o un producto de exportación, dado que la PhoA solamente es activa cuando es exportada a través de la membrana citoplasmática hasta el periplasma, donde el entorno oxidante hace que la fosfatasa alcalina adquiera su estado dimérico activo. Muchos genes que codifican determinantes de la virulencia, corresponden bien a proteínas de membrana, o bien a proteínas secretadas (FINLAY y FALKOW 1997), con lo cual esta técnica es de gran utilidad para la identificación de factores de virulencia.

Dentro de los patógenos de peces, la técnica de mutagénesis por transposición con el uso del gen *phoA* como indicador, ha sido utilizada para identificar genes de virulencia en *Edwardsiella tarda* (SRINIVASA RAO *et al.* 2003). Estos autores generaron una colección de 450.000 mutantes por transposición, e identificaron 490 mutantes con actividad PhoA. Utilizando el pez gourami azul (*Trichogaster trichopterus*) como modelo experimental de infección, seleccionaron de entre esos 490 clones positi-



vos, 15 mutantes de *E. tarda* que mostraron una disminución significativa en la virulencia con respecto a la cepa parental. Los tres mutantes más atenuados en su virulencia contenían inserciones en genes relacionados con el transporte de fosfato inorgánico. Cuatro mutantes con atenuación moderada, mostraron contener inserciones en un gen homólogo a un gen regulador del sistema de secreción de tipo III de *Salmonella enterica*. Otros mutantes contenían inserciones en genes relacionados con la adherencia de la bacteria a células del hospedador, así como en genes codificadores de enzimas secretadas, como GadB, IsoR y KatB, que juegan un papel en otorgarle a la bacteria resistencia frente a los fagocitos del hospedador. Este estudio vino a corroborar la gran utilidad de la mutagénesis por transposición con *TnphoA* en la identificación de genes relacionados con la virulencia en patógenos de peces.

11. TÉCNICAS BASADAS EN LA HIBRIDACIÓN SUSTRACTIVA

La virulencia bacteriana es un proceso multifactorial que, en última instancia, viene determinada por el contenido genético de la célula. Por tanto, es de esperar que existan diferencias en el bagaje genético entre cepas con distinto grado de virulencia. La comparación de dos genomas microbianos, uno de una cepa virulenta y otro de una cepa avirulenta de la misma especie ha demostrado ser un método de gran utilidad para identificar regiones génicas específicas de cepas virulentas. Algunas de estas diferencias en el contenido genético pueden ser la causa de la expresión de factores de virulencia específicos.

Las técnicas de hibridación sustractiva permiten la identificación de diferencias entre dos genomas, o de diferencias en los patrones de expresión génica en un mismo organismo pero bajo dos condiciones ambientales diferentes (SAGERSTRÖM *et al.* 1997). La SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*), se basa en la combinación de la hibridación DNA-DNA y de la PCR, para aislar secuencias génicas presentes en una cepa y ausentes en otra cepa relacionada. Se trata de una técnica sencilla que no depende de la expresión de mRNA ni de síntesis de cDNA. El fundamento de la hibridación sustractiva se publicó por primera vez en 1996 (DIATCHENKO *et al.* 1996), y se aplicó al estudio comparativo



de genomas bacterianos en 1998 (AKOPYANTS *et al.* 1998), momento desde el cual se ha convertido en una herramienta muy utilizada en estudios de genética molecular microbiana. A pesar de que existen diferentes métodos para llevarla a cabo, se puede resumir la base de la teoría de la hibridación sustractiva de forma simple. Se llama *tester* a la muestra de DNA genómico que contiene las secuencias de interés y *driver* a la muestra de referencia contra la que se va a realizar el experimento. Los DNAs genómicos de *tester* y *driver* se digieren con un enzima de restricción (normalmente *RsaI*), y a continuación se procede a la ligación a los extremos de dichos fragmentos de unos oligonucleótidos («adaptadores»), que son diferentes entre la muestra *tester* y la *driver*. Posteriormente las muestras conjuntas de *tester* y *driver* se someten a dos hibridaciones, y los fragmentos que hibridan entre sí son sucesivamente eliminados, con lo cual el DNA que permanezca sin hibridar será representativo de secuencias específicas del DNA *tester*. Estas secuencias específicas se detectan finalmente por amplificación mediante PCR, los productos de amplificación se clonan en vectores adecuados obteniéndose de esta forma una genoteca de sustracción.

La hibridación sustractiva se ha aplicado con notable éxito al estudio de diferentes patógenos de la acuicultura, siempre comparando una cepa virulenta con otra no virulenta de la misma especie. Como resultado se han podido identificar numerosos genes de presencia diferencial en *Aeromonas hydrophila* (ZHANG *et al.* 2000), en *Vibrio vulnificus* biotipo 2 (LEE *et al.* 2005), y en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (JUIZ-RIO *et al.* 2005; OSORIO *et al.* 2006). En *A. hydrophila*, se identificaron múltiples genes que mostraron estar ausentes en cepas avirulentas y presentes en casi todas las cepas virulentas, y que podrían considerarse como genes universales de virulencia en esta especie. Entre estos se incluyen el gen de la hemolisina (*hlyA*), de una proteasa (oligopeptidasa A), así como el gen de una proteína de multiresistencia a fármacos, entre otros. Otros genes que mostraron una presencia más variable entre cepas virulentas son los genes de síntesis del antígeno O y genes de un sistema de restricción-modificación de tipo II. La aplicación de la SSH entre cepas de *Vibrio vulnificus* del biotipo 2 (*tester*) y biotipo 1 (*driver*), permitió identificar genes específicos de las cepas que causan la vibriosis de la anguila. Curiosamente, parte



de los genes aislados estaban contenidos en DNA extracromosómico, formando parte de un plásmido específico del biotipo 2, y la mayor parte de estos genes correspondieron a genes de transposasas. Otros genes identificados como específicos, codifican proteínas sin homología significativa con otras proteínas.

Cuando se compararon por SSH dos cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, se aislaron múltiples fragmentos genómicos de presencia diferencial entre cepas virulentas y avirulentas (Juiz-Rio *et al.* 2005). Una parte importante de estos genes, codifican proteínas relacionadas con la síntesis de sideróforos, demostrando una vez más la importancia de los mecanismos de adquisición de hierro en la virulencia bacteriana. Además, en este caso, se demostró que la mutación de uno de estos genes biosintéticos disminuía la virulencia de la bacteria en modelos experimentales en peces (OSORIO *et al.* 2006). Otros genes que se identificaron en esta especie mediante la aplicación de esta técnica, incluyen fragmentos de elementos móviles, como un elemento integrativo y conjugativo (ICE), así como numerosas transposasas. Los resultados exitosos obtenidos hasta el momento con la aplicación de la SSH a patógenos bacterianos de peces, demuestran que esta técnica representa una herramienta muy útil para identificar determinantes de la virulencia. Si bien la SSH no siempre detecta todas las diferencias génicas existentes entre pares de muestras, su principal ventaja radica en que permite realizar un análisis comparativo entre genomas sin necesidad de conocer la secuencia completa de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

- AKOPYANTS, N. S., A. FRADKOV, L. DIATCHENKO, J. E. HILL, P. D. SIEBERT, S. A. LUKYANOV, E. D. SVERDLOV y D. E. BERG, 1998 PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 13108-13113.
- ANDREWS, S. C., A. K. ROBINSON y F. RODRIGUEZ-QUIÑONES, 2003 Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 215-237.
- BALADO, M., C. R. OSORIO y M. L. LEMOS, 2006 A gene cluster involved in the biosynthesis of vanchrobactin, a chromosome-encoded siderophore produced by *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* **152**: 3517-3528.



- BRUHN, J. B., I. DALSGAARD, K. F. NIELSEN, C. BUCHHOLTZ, J. L. LARSEN y L. GRAM, 2005 Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria. *Dis. Aquat. Organ.* **65**: 43-52.
- BURR, S. E., D. PUGOVKIN, T. WAHLI, H. SEGNER y J. FREY, 2005 Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiology* **151**: 2111-2118.
- CAMILLI, A., D. T. BEATTIE y J. J. MEKALANOS, 1994 Use of genetic recombinations as a reporter of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2634-2638.
- DIATCHENKO, L., Y. F. LAU, A. P. CAMPBELL, A. CHENCHIK, F. MOQADAM, B. HUANG, S. LUKYANOV, K. LUKYANOV, N. GURSKAYA, E. D. SVERDLOV y P. D. SIEBERT, 1996 Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6025-6030.
- DO VALE, A., M. T. SILVA, N. M. DOS SANTOS, D. S. NASCIMENTO, P. REIS-RODRIGUES, C. COSTA-RAMOS, A. E. ELLIS y J. E. AZEVEDO, 2005 AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Mol. Microbiol.* **58**: 1025-1038.
- FEHR, D., C. CASANOVA, A. LIVERMAN, H. BLAZKOVA, K. ORTH, D. DOBBELAERE, J. FREY y S. E. BURR, 2006 AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF-kappaB signalling pathway. *Microbiology* **152**: 2809-2818.
- FERNÁNDEZ, L., I. MÁRQUEZ y J. A. GUIJARRO, 2004 Identification of specific *in vivo* induced (*ivi*) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5199-5207.
- FINLAY, B. B., y S. FALKOW, 1997 Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 136-147.
- HACKER, J., L. BENDER, J. WINGENDER, B. LUND, R. MARRE y W. GOEBEL, 1990 Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and haemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* **8**: 213-225.
- HENSEL, M., J. E. SHEA, C. GLEESON, M. D. JONES, E. DALTON y D. W. HOLDEN, 1995 Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**: 400-403.
- JUIZ-RIO S., C. R. OSORIO y M. L. LEMOS, 2005 Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of *hutA* pseudogenes. *Arch. Microbiol.* **183**: 347-358.
- JUIZ-RIO, S., C. R. OSORIO y M. L. LEMOS, 2004 Identification and characterisation of the *fur* genes in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and ssp. *damsela*. *Dis. Aquat. Organ.* **58**: 151-156.
- JUIZ-RIO, S., C. R. OSORIO, V. DE LORENZO y M. L. LEMOS, 2005 Subtractive hybridization reveals a high genetic diversity in the fish pathogen *Photobacterium*



- damselfae* subsp. *piscicida*: evidence of a SXT-like element. Microbiology **151**: 2659-2669.
- LEE, C.-T., C. AMARO, E. SANJUÁN y L.-I. HOR, 2005 Identification of DNA sequences specific for *Vibrio vulnificus* biotype 2 strains by suppression subtractive hybridization. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 5593-5597.
- LEMOs, M. L., y C. R. OSORIO, 2007 Heme, an iron supply for vibrios pathogenic for fish. Biometals. **20**: 615-626.
- LESIC, B. y E. CARNIEL, 2005 Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. J. Bacteriol. **187**: 3352-3358.
- LINDSAY, J. A., A. RUZIN, H. F. ROSS, N. KUREPINA y R. P. NOVICK, 1998 The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **29**: 527-543.
- MAHAN, M. J., D. M. HEITHOFF, R. L. SINSHEIMER y D. A. LOW, 2000 Assessment of bacterial pathogenesis by analysis of gene expression in the host. Annu. Rev. Genet. **34**: 139-164.
- MAHAN, M. J., J. M. SLAUCH y J. J. MEKALANOS, 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. Science **259**: 686-688.
- MAHAN, M. J., J. W. TOBIAS, J. M. SLAUCH, P. C. HANNA, R. J. COLLIER y J. J. MEKALANOS, 1995 Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 669-673.
- MILLER, J. D., y M. N. NEELY, 2005 Large-scale screen highlights the importance of capsule for virulence in the zoonotic pathogen *Streptococcus iniae*. Infect. Immun. **73**: 921-934.
- MILTON, D. L., 2006 Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. Int. J. Med. Microbiol. **296**: 61-71.
- MOURIÑO, S., C. R. OSORIO y M. L. LEMOS, 2004 Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. J. Bacteriol. **186**: 6159-6167.
- MOURIÑO, S., C. R. OSORIO, M. L. LEMOS y J. H. CROSA, 2006 Transcriptional organization and regulation of the *Vibrio anguillarum* heme uptake gene cluster. Gene **374**: 68-76.
- MOURIÑO, S., I. RODRÍGUEZ-ARES, C. R. OSORIO y M. L. LEMOS, 2005 Genetic variability of the heme uptake system among different strains of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*: identification of a new heme receptor. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 8434-8441.
- OCHMAN, H., J. G. LAWRENCE y E. A. GROISMAN, 2000 Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature **405**: 299-304.
- OSORIO, C. R., S. JUÍZ-RÍO y M. L. LEMOS, 2006 A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damselfae* subsp. *piscicida*



- is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island. Microbiology **152**: 3327-3341.
- PANINA, E. M., A. A. MIRONOV, y M. S. GELFAND, 2001 Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. Nucleic Acids Res. **29**: 5195-5206.
- SAGERSTRÖM, C. G., B. I. SUN y H. L. SIVE, 1997 Subtractive cloning: past, present, and future. Annu. Rev. Biochem. **66**: 751-783.
- SLAUCH, J. M., y T. J. SILHAVY, 1991 Genetic fusion as experimental tools. Methods Enzymol. **204**: 13-48.
- SMITH, H., 1998 What happens to bacterial pathogens *in vivo*?. Trends Microbiol. **6**: 239-243.
- SRINIVASA RAO, P. S., T. M. LIM y K. Y. LEUNG, 2003 Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. Infect. Immun. **71**: 1343-1351.
- STORK M, M. DI LORENZO, S. MOURIÑO, C. R. OSORIO, M. L. LEMOS y J. H. CROSA, 2004 Two *tonB* systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence. Infect. Immun. **72**: 7326-7329.
- STORK, M., M. DI LORENZO, T. J. WELCH, L. M. CROSA y J. H. CROSA, 2002 Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. Plasmid **48**: 222-228.
- ZHANG, Y. L., C. T. ONG y K. Y. LEUNG, 2000 Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. Microbiology **146**: 999-1009.

18

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE PROTOZOOS PARÁSITOS EN BIVALVOS

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE PROTOZOOS PARÁSITOS EN BIVALVOS

I. López Flores

Universidad de Granada
IFAPA

J. I. Navas Triano

IFAPA

M. A. Garrido Ramos

Universidad de Granada

C. Ruiz Rejón

Universidad de Granada

M. Ruiz Rejón

Universidad de Granada

R. de la Herrán Moreno

Universidad de Granada

Resumen

El desarrollo del diagnóstico molecular basado en la detección de secuencias específicas de ADN ha revolucionado el diagnóstico en la patología de moluscos. Las patologías infecciosas son especialmente rele-



vantes en la acuicultura de moluscos bivalvos debido principalmente a que el cultivo de estas especies se desarrolla en el medio natural, compartiendo hábitat con las poblaciones naturales. Este hecho disminuye la utilidad de la aplicación de las medidas tradicionales de erradicación de enfermedades parasitarias. Por otro lado, el desplazamiento con fines comerciales de animales vivos entre distintas zonas geográficas ha sido la principal fuente de propagación de las infecciones parasitarias. Por ello, el establecimiento de programas de vigilancia y monitorización de la presencia de los agentes etiológicos responsables de estas enfermedades, resulta un método de control adecuado para evitar su propagación. La caracterización de marcadores moleculares de ADN en las distintas especies de patógenos, permite la aplicación de técnicas de biología molecular tales como la PCR y la hibridación *in situ* al diagnóstico de parásitos en bivalvos. La elevada sensibilidad, especificidad y la mayor rapidez en la obtención de resultados cuando se procesa un elevado número de muestras con respecto a las técnicas histológicas, facilitan enormemente la aplicación de estas técnicas como herramientas para la identificación de patógenos presentes en bivalvos. En este trabajo, tras realizar una revisión general sobre el tema, presentamos las metodologías seguidas en el diseño de métodos de diagnóstico molecular para la detección de tres protozoos responsables de otras tantas enfermedades parasitarias, *Perkinsus olseni*, *Marteilia refringens* y *Bonamia ostreae*, desde el aislamiento y caracterización de secuencias específicas del genoma de cada uno de ellos, hasta la aplicación de estos marcadores moleculares para la detección e identificación taxonómica de la especie parasitaria en muestras naturales.

Abstract

The development of molecular diagnosis based on the detection of specific DNA sequences has revolutionized the diagnosis of mollusc pathologies. Infectious diseases are especially relevant in bivalve mollusc farming primarily because these species are grown in the natural medium, sharing a habitat with natural populations. This situation diminishes the utility of applying traditional measures of eradicating parasite infestations. On the other hand the transport of live animals for commerce between different geographic zones has been the main factor in the propagation of parasites. Therefore, the



establishment of programmes of vigilance and monitoring the presence of agents responsible for these diseases constitutes the proper control to avoid such propagation. The characterization of DNA molecular markers in the different pathogenic species permits the application of molecular biological techniques such as PCR and in situ hybridization in diagnosing parasites in bivalves. The high sensitivity, accurate specificity, and the greater speed in gaining results when a high number of samples are processed, with respect to histological techniques, enormously facilitate the application of these techniques as tools to identify pathogens present in bivalves. In the present work, after a general review, we present the methodology followed in the designing of a molecular diagnostic method for the detection of three protozoa responsible for many other parasite diseases: Perkinsus olseni, Marteilia refringens and Bonamia ostreae. We describe the method from isolation and characterization of sequences specific of the genome of each of these parasites, to the application of these molecular markers for the detection and taxonomic identification of the parasite species in the natural samples.

1. CONSIDERACIONES GENERALES

En la acuicultura en general, y en el cultivo de bivalvos en particular, uno de los factores más importantes a tener en cuenta es el riesgo de la presencia de contaminantes, agentes infecciosos o parásitos. La excelente capacidad del agua para transportar y difundir sustancias hace de la acuicultura una actividad estrechamente ligada al medio ambiente, en la que las condiciones sanitarias son mucho más difíciles de controlar que en la agricultura o la ganadería (Southgate 1993). Los bivalvos, a diferencia de los peces por ejemplo, raramente muestran síntomas externos de enfermedad hasta prácticamente los estadios finales, lo que les conduce casi inevitablemente a la muerte o a una condición que, en cualquier caso, no permite su comercialización. De este modo, cuando un parásito aparece en una zona de cultivo, puede extenderse rápidamente hasta proporciones epizooticas y provocar mortalidades masivas. La historia del cultivo de ostras en la costa atlántica francesa es un claro ejemplo de los efectos extremos que pueden provocar diferentes agentes infecciosos. Así, un iridovirus fue responsable de la desaparición de la ostra portuguesa *Crassostrea*



angulata de las costas francesas en los años 70 (COMPS *et al.* 1976), de donde también desapareció el cultivo de la especie autóctona, la ostra plana europea *Ostrea edulis*, debido a los efectos devastadores de los protozoos *Marteilia refringens* y *Bonamia ostreae* (GRIZEL *et al.* 1974; PICHOT *et al.* 1980). En ambos casos, se cree que los patógenos fueron introducidos en la zona mediante la importación incontrolada de ostras parasitadas. Actualmente, en esta zona, el cultivo de ambas especies ha sido sustituido por el cultivo de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*, debido a la resistencia que muestra a estas enfermedades.

El mejor, y casi único modo, de controlar el efecto perjudicial de los patógenos sobre los cultivos de bivalvos se limita al establecimiento de programas de prevención, para evitar la propagación de las enfermedades. La utilización de productos químicos o de vacunas no es apropiada, por la cantidad necesaria y el efecto que provocarían sobre el medio ambiente en el primer caso, y por el hecho de que los bivalvos no producen anticuerpos en el segundo. De este modo, el desarrollo de programas de vigilancia respecto a la presencia de parásitos, tanto en las zonas de cultivo como en poblaciones naturales, permite determinar las áreas endémicas o afectadas por cada una de las enfermedades parasitarias, y evitar la transferencia de animales procedentes de estas zonas a otras libres de la enfermedad. Es precisamente en este campo, en el de la vigilancia del estado sanitario de las poblaciones animales, en el que la utilización de marcadores moleculares para la detección y diagnóstico de parásitos, y por tanto la prevención de sus enfermedades, ha irrumpido con más fuerza. La metodología basada en el ADN ofrece técnicas de diagnóstico rápidas, fiables, muy sensitivas y específicas, que pueden ser fácilmente utilizadas de modo rutinario en el campo de la parasitología, como de hecho así está ocurriendo.

2. PRINCIPALES ENFERMEDADES PARASITARIAS DE LOS MOLUSCOS BIVALVOS

La Organización Mundial de Sanidad Animal, mediante la OIE (del francés *Office International des Épizooties*), en el Código Sanitario para los Animales Acuáticos (ANÓNIMO 2007) enumera siete parásitos eucariotas



como responsables de las principales enfermedades de los moluscos bivalvos: *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* (responsables de la Bonamiosis), *Haplosporidium nelsoni* (Haplosporidiosis o enfermedad MSX), *Marteilia refringens* (Marteiliosis o enfermedad de Aber), *Mikrocytos mackini* (Microcitosis) y *Perkinsus marinus* y *Perkinsus olseni* (Perkinsosis) (Tabla 1). Existen además otras enfermedades de origen vírico y bacteriano (principalmente virus tipo herpes y *Vibrio* spp. respectivamente; ver revisión en RENAULT y NOVOA 2004; PAILLARD 2004; PAILLARD *et al.* 2004) que han sido asociadas a mortalidades en criaderos, dos de las cuales acaban de ser reconocidas por la OIE (Anónimo, 2007). Los criterios que se siguen para incluir una enfermedad en esta lista son, en resumen, que se haya demostrado que causa pérdidas significativas en la producción o que afecte a poblaciones naturales, que se haya demostrado su etiología infecciosa, que puedan propagarla animales vivos, que existan zonas libres de la enfermedad, y que exista un método para su diagnóstico.

TABLA 1.

Agentes causantes de las enfermedades de declaración obligatoria de los moluscos bivalvos.

Parásito	Enfermedad	Hospedador habitual	Primera descripción
<i>Bonamia ostreae</i>	Bonamiasis	<i>Ostrea edulis</i>	PICHOT <i>et al.</i> 1980
<i>Bonamia exitiosa</i>	Bonamiasis	<i>Ostrea edulis</i>	HINE <i>et al.</i> 2001
<i>Haplosporidium nelsoni</i>	Enfermedad MSX	<i>Crassostrea virginica</i> <i>Crassostrea gigas</i>	HASKIN <i>et al.</i> 1966
<i>Marteilia refringens</i>	Marteiliasis	<i>Ostrea edulis</i> <i>Mytilus edulis</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i>	GRIZEL <i>et al.</i> 1974
<i>Mikrocytos mackini</i>	Microcitosis	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Ostreola conchaphila</i>	FARLEY <i>et al.</i> 1988
<i>Perkinsus marinus</i>	Perkinsosis	<i>Crassostrea virginica</i>	MACKIN, 1951
<i>Perkinsus olseni</i>	Perkinsosis	<i>Haliotis ruber</i> <i>Tapes decussatus</i> <i>Tapes philippinarum</i>	LESTER y DAVIS, 1981

2.1. Bonamiosis

El género *Bonamia* engloba a 4 especies que infectan a diferentes especies de ostras (CARNEGIE y COCHENNEC-LAUREAU 2004; CARNEGIE *et al.* 2006) (Figura 1). Dos de ellas, *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* han sido res-



pensables de mortalidades masivas de ostra plana europea (*Ostrea edulis*) en Europa y Estados Unidos, y de la ostra chilena (*Ostrea chilensis*) en Nueva Zelanda respectivamente (PICHOT *et al.* 1980; BALOUET *et al.* 1983; POLANCO *et al.* 1984; ELSTON *et al.* 1986; FRIEDMAN *et al.* 1989; HUDSON y HILL, 1991; McARDLE *et al.* 1991; CULLOTY *et al.* 1991; FRIEDMAN y PERKINS 1994; HINE *et al.* 2001). La bonamiosis en las costas francesas a finales de los años 70 terminó definitivamente con el cultivo de las ya diezgadas poblaciones de *O. edulis* en la región a causa de otra enfermedad parasitaria (Marteiliosis). Se trata de protozoos uninucleados que originan una infección sistémica en el hospedador, asociada con infiltraciones hemocíticas en todos los órganos excepto el músculo aductor. La proliferación del parásito provoca una debilitación del estado general del animal, que le conduce habitualmente a la muerte.

2.2. Haplosporidiosis

Haplosporidium nelsoni forma parte, junto a otras veintidós especies reconocidas, del género *Haplosporidium*. Este género está estrechamente relacionado con el género *Bonamia*, formando ambos parte de un grupo pequeño de protozoos endoparásitos (38 especies en total, BURRESON y FORD 2004; AZEVEDO *et al.* 2006), todos ellos parásitos de invertebrados, que constituyen el phylum Haplosporidia (Figura 1). *H. nelsoni* es el agente etiológico de la también conocida como enfermedad MSX (del inglés *Multinucleate Sphere X*) en la ostra americana *Crassostrea virginica*, que ha causado efectos devastadores en su cultivo a lo largo de la costa este de Norteamérica (HASKIN *et al.* 1966; ANDREWS y WOOD 1967; MATTHIESSEN *et al.* 1990; BARBER *et al.* 1997; SUNILA *et al.* 1999; STEPHENSON *et al.* 2003), considerándose también parásito de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (KATKANSKY y WARNER 1970; FRIEDMAN *et al.* 1991, FRIEDMAN 1996; KAMAISHI y YOSHINAGA 2002). La infección produce una alteración gradual de los túbulos del epitelio digestivo, y la esporulación en individuos juveniles causa habitualmente la muerte de los animales infectados.

2.3. Marteiliosis

Marteilia refringens es también un protozoo parásito, que junto a otras ocho especies de cinco géneros son parásitas de anélidos, crustáceos y bivalvos marinos, y constituyen el phylum Paramyxia (ver revisión en BERTHE *et al.* 2004) (Figura 1). Los miembros de este phylum



Phylum Paramyxea	Phylum Haplosporidia	Alveolata	Incertae sedis
Clase Martelliidea	Género Haplosporidium	Phylum Apicomplexa	Mikrocytos mackini
Género Martellia	<i>H. scolopi</i>		
<i>M. refringens</i>	<i>H. heterocirri</i>	Phylum Ciliata	
<i>M. sydneyi</i>	<i>H. marchouxi</i>		
<i>M. lengehi</i>	<i>H. potamillae</i>	Phylum Dinoflagellata	
<i>M. christenseni</i>	<i>H. vej dovskii</i>		
Género Martellioides	<i>H. imnodrili</i>	Perkinsidos	
<i>M. chungmuensis</i>	<i>H. nemertis</i>	Género Perkinsus	
<i>M. brachialis</i>	<i>H. caulleryi</i>	<i>P. marinus</i>	
Género Paramartellia	<i>H. ascidiarum</i>	<i>P. olseni/P. atlanticus</i>	
<i>P. orchestiae</i>	<i>H. cernovitovi</i>	<i>P. qugwadi</i>	
Class Paramyxidea	<i>H. pickfordi</i>	<i>P. chesapeakei/andrewsi</i>	
Género Paramyxa	<i>H. costale</i>	<i>P. mediterraneus</i>	
<i>P. paradoxa</i>	<i>H. louisiana</i>	<i>P. honshuensis</i>	
Incertae sedis	<i>H. nelsoni</i>		
Género Paramyxoides	<i>H. tumefaciens</i>		
<i>P. nephtys</i>	<i>H. armoricanum</i>		
	<i>H. cadomensis</i>		
	<i>H. parisi</i>		
	<i>H. lusitanicum</i>		
	<i>H. comatulae</i>		
	<i>H. monforti</i>		
	<i>H. edule</i>		
	Género Bonamia		
	<i>B. ostreae</i>		
	<i>B. exitiosa</i>		
	<i>B. perspora</i>		
	<i>B. roughleyi</i>		
	Género Minchinia		
	<i>M. chitonis</i>		
	<i>M. dentali</i>		
	<i>M. tapetis</i>		
	<i>M. teredinis</i>		
	Género Urosporidium		
	<i>U. fuliginosum</i>		
	<i>U. pelseneeri</i>		
	<i>U. crescens</i>		
	<i>U. fauricum</i>		
	<i>U. constantae</i>		
	<i>U. jiroveci</i>		
	<i>U. spissuli</i>		
	<i>U. cannoni</i>		

FIGURA 1.

Esquema sistemático de las especies de protozoos responsables de enfermedades de bivalvos de declaración obligatoria a la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (en negrita) y de los táxones con los que están relacionadas. Las especies del phylum Paramyxea no han mostrado una relación de parentesco estrecha con ningún otro phylum en los análisis filogenéticos realizados hasta el momento, al igual que ocurre con la especie *Mykrocytos mackini* (basados en las secuencias homólogas del gen 18S). Los nombres de los grupos incluidos en Apicomplexa, Ciliados y Dinoflagelados no se muestran debido a su gran número.



se caracterizan por dar lugar, durante su desarrollo en el hospedador, a estructuras multinucleadas; células secundarias que quedan dentro de la célula primaria y que albergarán en su interior a su vez a células terciarias con esporas y esporoplasmas. Los distintos géneros del phylum se diferencian por el número de células secundarias y terciarias, mientras que el número de esporoplasmas dentro de las células terciarias es característico de cada especie. *M. refringens* es responsable de la conocida como enfermedad de Aber en la ostra plana europea *Ostrea edulis* (GRIZEL *et al.* 1974), siendo también hospedadores habituales el mejillón del Mediterráneo *Mytilus galloprovincialis* y el mejillón azul *Mytilus edulis* (VILLALBA *et al.* 1993, a y b; FUENTES *et al.* 2002). *M. refringens* ha causado mortalidades masivas recurrentes en *O. edulis* durante las cuatro últimas décadas (GRIZEL *et al.* 1974; ALDERMAN 1979; FIGUERAS y MONTES 1988; ROBERT *et al.* 1991; VIRVILIS *et al.* 2003) que han contribuido, junto a las provocadas por *Bonamia ostreae*, a la práctica total desaparición del cultivo de esta especie en Europa. La infección se localiza en la glándula digestiva y está asociada a un descenso de los niveles de glucógeno. El crecimiento de los animales desnutridos cesa, y la inanición, junto a la esporulación del parásito en las células de los túbulos digestivos, parece ser la responsable finalmente de la muerte del animal.

2.4. Microcitos

Mikrocytos mackini es un protista que afecta a la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* en la costa noroeste de Canadá (FARLEY *et al.* 1988; BOWER *et al.* 1994), y se cree que las especies *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* y *Ostreola conchaphila* pueden ser incluso más susceptibles que *C. gigas* a la enfermedad (BOWER *et al.* 1997). Forma parte, junto a tres especies del género *Bonamia* (*B. ostreae*, *B. exitiosa* y *B. roughleyi*) del grupo de parásitos conocidos como «microcells» (KATKANSKY *et al.* 1969; CARNEGIE y COCHENNEC-LAUREAU 2004), debido a su apariencia a nivel de microscopia óptica: células pequeñas (<5 µm), esféricas y con un núcleo relativamente grande y excéntrico (BOWER *et al.* 1994). Sin embargo, los análisis ultraestructurales muestran diferencias significativas entre *Mikrocytos* y los Haplosporidia. Este parásito no aparece relacionado con ninguno de los grupos de protozoos



parásitos en los análisis filogenéticos llevados a cabo hasta el momento (CARNEGIE *et al.* 2003). Su posición basal en los árboles filogenéticos indica que se trata de un eucariota primitivo, sin relación aparente con ningún miembro de los táxones protistas conocidos hasta el momento. La infección de las células vesiculares del tejido conectivo da lugar a infiltraciones hemocíticas y necrosis del tejido, que se aprecian macroscópicamente como lesiones localizadas de color verdoso en el manto, palpos labiales y músculo aductor en las ostras infectadas.

2.5. Perkinsosis

En el género *Perkinsus* están reconocidas actualmente seis especies de protozoos que infectan a moluscos marinos en todo el mundo, algunos de los cuales están asociados a mortalidades masivas de los hospedadores (revisión en VILLALBA *et al.* 2004; DUNGAN y REECE 2006) (Figura 1). La Perkinsosis afecta a ostras, abalones, almejas, vieiras, ostras perlíferas, berberechos y mejillones, siendo probablemente la enfermedad que ha causado más pérdidas económicas en el sector. Después de diferentes afiliaciones taxonómicas basadas en datos morfológicos (MACKIN *et al.* 1950; MACKIN 1951; SPRAGUE 1954; MACKIN y BOSWELL 1956; MACKIN 1962; MACKIN y RAY 1966; PERKINS 1976; LEVINE 1978; VIVIER 1982), los análisis moleculares sugieren una mayor relación de las especies de *Perkinsus* con los dinoflagelados que con los apicomplexa (FONG *et al.* 1993; GOGGIN y BERKER 1993; ESCALANTE y AYALA 1995; REECE *et al.* 1997; SIDALL *et al.* 1997; DE LA HERRÁN *et al.* 2000; MURRELL *et al.* 2002; SILDARRIAGA *et al.* 2003), dentro del grupo de táxones conocidos como alveolados (ciliados, apicomplexa y dinoflagelados; CAVALIER-SMITH 1993). *Perkinsus marinus* fue la primera especie del género en ser descrita (con el nombre de *Dermocystidium marinum*) como responsable de la mortalidad masiva de ostras americanas, *Crassostrea virginica*, en el Golfo de Méjico (MACKIN *et al.* 1950). La segunda especie en ser descrita fue *Perkinsus olseni*, parásito del abalón *Haliotis ruber* en el sur de Australia (LESTER y DAVIS 1981). Posteriormente, se describió la especie *Perkinsus atlanticus* como responsable de mortalidades masivas en la almeja japonesa *Tapes decussatus* en el sur de Portugal (AZEVEDO 1989), y su presencia se describió en otras especies de almejas de las costas de España (ver revisión en VILLALBA *et*



al. 2004). Sin embargo, análisis moleculares demostraron posteriormente que en realidad *P. atlanticus* y *P. olseni* son la misma especie (MURRELL *et al.* 2002), lo cual le confiere a *P. olseni* un rango amplio de especies hospedadoras (de gasterópodos a bivalvos). Los efectos sobre los bivalvos varían desde un debilitamiento generalizado hasta la desnutrición severa que origina la paralización del crecimiento y la retracción del manto. En las infecciones más intensas, la proliferación del parásito origina una infiltración hemocítica masiva del epitelio, tejido conectivo, músculo, con parásitos presentes tanto en el interior de los hemocitos como libres, que finalmente originan destrucción de tejidos y pérdida de la estructura normal con la consiguiente disfunción del órgano. Macroscópicamente pueden observarse pequeñas pústulas sobre las branquias, palpos labiales y manto de los animales.

3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE PARÁSITOS DE MOLUSCOS BIVALVOS

Para llevar a cabo el control y la vigilancia de las infecciones parasitarias en animales acuáticos en general, es imprescindible contar con técnicas de diagnóstico apropiadas que permitan detectar e identificar a los agentes patógenos de forma fiable y rápida. Tradicionalmente, en moluscos bivalvos, este análisis se ha llevado a cabo mediante técnicas histológicas (microscopía óptica), en las que se trata de observar las estructuras propias de los parásitos en los tejidos del hospedador. Esta técnica permite además conocer los órganos o tejidos que se ven afectados y apreciar los daños asociados a la enfermedad. El análisis histológico permite también obtener información acerca del inicio y desarrollo de la infección. Sin embargo, esta metodología exige la formación de observadores experimentados y el estudio previo de la histología normal del hospedador. Incluso con estos conocimientos, algunos patógenos son difíciles de detectar en infecciones leves o en fases que no conllevan lesiones histológicas. Otra desventaja de esta metodología es la falta de especificidad, ya que la mera observación del parásito, en muchas ocasiones, no permite la discriminación e identificación entre especies relacionadas en base únicamente a las características morfológicas.



Una alternativa al estudio histológico es el cultivo del parásito, un método ampliamente utilizado en infecciones bacterianas y víricas en peces. En bivalvos también resulta útil cuando se trata de infecciones debidas a la bacterias. Sin embargo, como ocurre en el caso de *Vibrio tapetis* (responsable de la enfermedad del «anillo marrón» en almejas), su aislamiento puede verse dificultado por la presencia la amplia microbiota asociada a todo animal filtrador. Por otra parte, las principales enfermedades descritas en bivalvos están provocadas por protozoos y, hasta la fecha, sólo las especies del género *Perkinsus* (todas excepto una, *P. qugwadi*) pueden ser cultivadas. No obstante, el método carece igualmente de especificidad a la hora de la identificación taxonómica indiscutible de la especie del parásito cultivado y, al igual que la histología, requiere varios días de procesamiento en el laboratorio.

Con el objetivo de superar estos inconvenientes, las nuevas técnicas van encaminadas a poner de manifiesto la presencia del parásito por medio de la detección de sus proteínas o de su ADN. En el primer caso se trata de las técnicas inmunológicas, en las que se diagnostican los organismos patógenos utilizando anticuerpos específicos. Así, se han obtenido anticuerpos monoclonales frente a patógenos como *Bonamia ostreae* (ROGIER *et al.* 1991), *Marteilia* sp. (ROBLEDO *et al.* 1994) o *Perkinsus olseni* (GOGGIN *et al.* 1991). Sin embargo, resultados recientes en *Bonamia ostreae* sugieren que las diferencias serológicas entre aislados o cepas de la especie podrían ser el motivo de la limitada utilidad que este método ha demostrado para su aplicación al diagnóstico hasta el momento (CARNEGIE y COCHENNEC-LAUREAU 2004). En el segundo caso, los métodos basados en el ADN se sustentan en la detección de secuencias específicas del patógeno. Entre estas técnicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está revolucionando el diagnóstico de las enfermedades infecciosas en acuicultura. La sensibilidad, la especificidad y la rapidez son las cualidades más notables que posee el diagnóstico basado en la PCR. Si bien, esta técnica confirma la presencia del parásito en la muestra, no aporta datos sobre viabilidad del parásito, o si éste está sólo presente en el digestivo. A pesar de todo, el diagnóstico por PCR facilita la monitorización de agentes infecciosos en un número de elevado de muestras, proporcionando la posibilidad de realizar análisis de variación genética entre poblaciones.



Este carácter, está haciendo de ella una herramienta muy útil para el diagnóstico de parásitos en acuicultura en general y de moluscos bivalvos en particular.

Finalmente, la hibridación *in situ* sobre tejido resulta también una técnica apropiada para el diagnóstico de parásitos en bivalvos, en la que se aúnan los métodos histológico y molecular. En ella, una sonda de ADN es utilizada para la localización del parásito sobre cortes histológicos del animal, mediante la hibridación de la sonda con su región homóloga en el genoma del parásito. De nuevo, la mayor limitación para la utilización rutinaria de esta técnica en el diagnóstico de parásitos es el tiempo de procesamiento histológico en el laboratorio. Sin embargo, el uso combinado de la PCR y de la hibridación *in situ* resulta probablemente la metodología más completa para el diagnóstico de parásitos en bivalvos. De este modo, la presencia del parásito puede ser diagnosticada mediante PCR en las muestras objeto de análisis, y el producto amplificado puede ser utilizado como sonda para localizar a su vez al parásito en el tejido del hospedador. Para ello, lo más importante es disponer de un marcador molecular (fragmento de ADN del parásito amplificado) adecuado a los requerimientos de ambas técnicas, según se detalla en el apartado siguiente.

4. MARCADORES MOLECULARES DE ADN PARA PROTOZOOS PARÁSITOS DE MOLUSCOS BIVALVOS

El desarrollo de marcadores moleculares de ADN para los principales patógenos de bivalvos presenta la dificultad añadida del cultivo *in vitro* de los mismos. Como se ha comentado anteriormente, casi todas las especies del género *Perkinsus* pueden ser cultivadas, lo cual proporciona una valiosa fuente para la obtención de ADN del parásito. Esta posibilidad de cultivo ha facilitado la caracterización de diferentes genes y secuencias no codificadoras, y el inicio de un proyecto de secuenciación del genoma completo de la especie *Perkinsus marinus* (actualmente en curso; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=genomeprj>). Para el resto de protozoos parásitos de bivalvos, hasta



ahora, el cultivo *in vitro* no ha conseguido desarrollarse, y la purificación de sus células en condiciones adecuadas y en cantidad suficiente para la extracción de ADN no resulta sencilla en la mayoría de los casos. Habitualmente, las células del hospedador son purificadas junto con las del parásito, lo que interfiere posteriormente en la obtención de fragmentos de ADN específicos del primero. Del genoma de *Mikrocytos mackini*, de los apicomplexa y de los haplosporidios (y no en todas las especies) se conoce únicamente la secuencia del gen que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosómico (18S), y en algunos casos las secuencias espaciadoras que lo flanquean. De la mayoría de especies de los haplosporidios se conoce también la secuencia parcial del gen de la actina. La Tabla 2 reúne las secuencias conocidas del genoma de estos protozoos incluidas en la base de datos GenBank.

Por otro lado, el diseño de métodos de diagnóstico genético para la detección de parásitos en tejidos de bivalvos requiere la búsqueda de un marcador molecular que represente a una región del genoma que sea específica de cada una de las especies parásitas a diagnosticar. De este modo, pueden diseñarse cebadores específicos de esta región para su amplificación por PCR a partir de ADN obtenido de los animales parasitados, y el fragmento amplificado puede utilizarse como sonda en análisis de hibridación *in situ* sin que pueda producirse hibridación cruzada con otros microorganismos que puedan estar presentes en el hospedador (por ejemplo, parásitos oportunistas no relacionados con la enfermedad a diagnosticar). Además, para evitar en lo posible que un marcador molecular pudiera fallar a la hora de detectar una cepa particular de un patógeno, es conveniente obtener la secuencia de ADN del marcador a partir de tantos orígenes del parásito como sea posible. En este sentido, y teniendo en cuenta las dificultades arriba citadas para el aislamiento de regiones de ADN específicas de los protozoos parásitos de bivalvos, los espaciadores existentes entre los genes del núcleo que codifican para los ARNs ribosómicos resultan muy adecuados para su aplicación en este campo por varios motivos. En primer lugar, los genes que codifican para los ARNs ribosómicos, junto con los espaciadores existentes entre ellos, se encuentran repetidos varios cientos de veces en el genoma lo cual facilita su detección. La Figura 2 muestra la disposición de genes y espaciadores en la unidad de repetición de estas



secuencias. En segundo lugar, los genes nucleares codificadores de los ARNs ribosómicos se encuentran entre las secuencias de evolución más lenta a lo largo de la escala evolutiva, mientras que los espaciadores intergénicos, que al no tener función codificadora no están sometidos a presión selectiva, muestran una elevada divergencia en su secuencia entre especies, incluso entre especies muy relacionadas entre sí (HILLIS y DIXON 1991). En el contexto que nos ocupa, las características de esta familia de ADN repetido permite la amplificación mediante PCR de los espaciadores intergénicos del genoma de los parásitos, utilizando para ello cebadores diseñados en las regiones conservadas, en los genes ribosómicos, de otras especies. Una vez obtenida la secuencia de ADN del espaciador, ésta se utiliza para diseñar cebadores específicos para el parásito, que permiten detectar la presencia de cantidades pequeñas de su ADN en presencia de ADN del hospedador. La región de ADN amplificada, específica del parásito, puede utilizarse igualmente para su localización en las células o el tejido del hospedador mediante hibridación *in situ*. Este análisis, además de confirmar el diagnóstico positivo de la enfermedad obtenido por PCR, puede proporcionar otro tipo de información tal como qué órganos o tejidos son objeto de la infección, la presencia del parásito en localizaciones anómalas, grado y avance de la infección, determinar si hay más de una especie de parásito afectando al animal (infecciones mixtas), o la presencia de diferentes estadios de desarrollo del parásito (especialmente útil cuando se realizan estudios para conocer mejor el ciclo de vida del parásito y su presencia en hospedadores intermediarios, como se expondrá en el apartado siguiente).

TABLA 2.

Recopilación de las secuencias de ADN conocidas de los parásitos responsables de las principales enfermedades de bivalvos.

Especie	Gen o región	Tamaño (pb)	N	N.º de acceso a GenBank
<i>Marteilia refringens</i>	18S+ITS-1	2302	1	AJ250699*
	Anónima	475	1	AF394946
	IGS	358-3455	56	AJ604561*, AJ629352-376, AM292652, AM748037-043, AM504129-149
	ITS-1	407-411	117	AJ629334-351, DQ426545-644

(Continúa)



(Continuación)

Especie	Gen o región	Tamaño (pb)	N	N.º de acceso a GenBank
<i>M. sydneyi</i>	18S+ITS-1	298	6	AF159248, AY504628-632
<i>Marteilia</i> sp.	ITS-1	332-335	38	AY324551-588
<i>Haplosporidium costale</i>	18S Actina	1731-1791 657	2 1	U20858*, AF387122 AY450407
<i>Haplosporidium louisiana</i>	18S Actina	1702 622	1 4	U47851 AY450408-411
<i>Haplosporidium nelsoni</i>	18S Actina 16S-like	1745-1786 622 1745	2 1 1	AB080597, X74131* AY450412 U19538
<i>Haplosporidium lusitanicum</i>	18S	1789	1	AY449713
<i>Haplosporidium pickfordi</i>	18S	1635	1	AY452724
<i>Haplosporidium monforti</i>	18S*	1872	1	DQ219484
<i>Haplosporidium edule</i>	18S	1744	1	DQ458793
<i>Haplosporidium</i> sp.	18S	1744	1	AY781176
<i>Haplosporidia</i> sp.	18S Actina	1730-2077 641-1159	8 3	AY435093, DQ653412, AF492442, AY449712, AY449715-716, DQ653412 DQ444238, AY450423-424
<i>Bonamia ostreae</i>	18S 18S+ITS-1 18S+ITS-1+5.8S Actina	1276 498 1991 784-869	1 1 1 6	AF192759 AF162087 AF262995 AM410919-924
<i>Bonamia exitiosa</i>	18S+ITS-1	1956	1	DQ312295
<i>Bonamia perspora</i>	18S	1762	1	DQ356000
<i>Bonamia</i> sp.	18S ITS-1+5.8S	300-1749 207	8 2	AY923853-357, AY860060, AY542903, AF337563 AY539840, DQ312295
<i>Bonamia roughleyi</i>	18S	951	1	AF508801
<i>Mikrocytos mackini</i>	18S	1457	1	AF477623
<i>Mikrocytos</i> sp.	18S	523	1	DQ237912
<i>Minchinia teredinis</i>	18S Actina	1780-1781 622-704	2 3	U20319, U20320 AY450419-421
<i>Minchinia tapetis</i>	18S Actina	1747 619-724	1 3	AY449710 AY450416-418
<i>Minchinia chitonis</i>	18S Actina	1745 700-746	1 3	AY449711 AY450413-415
<i>Minchinia</i> sp.	18S	1682	1	EF165631
<i>Urosporidium crescens</i>	18S Actina	1831 622	1 1	U47852 AY450422

(Continúa)



(Continuación)

Especie	Gen o región	Tamaño (pb)	N	N.º de acceso a GenBank
<i>Urosporidium sp.</i>	18S	1809	1	AY449714
<i>Perkinsus marinus</i>	18S	1617-3816	6	LO7375, X75762, AF042708*, AF497479*, AF126013, AF324218
	ITS+5,8S	626-3816	41	AF497479*, AF149876*, AF126022*, AF150985*-990*, U07700*, AY295177*-199*, DQ370474-481
	IGS+5S	307-3816	2	S78416, AF497479*
	Actin	622-3981	6	U84287, U84288, AY436363*-365*, AY876350
	α y β tubulinas varias	1138-1162 20-1154	3 44	AF482399-401 AR179760-774, AY299656-683, AY527398
	Serin protease	518-3504	13	AY340222*-234
	SOD	876-3859	3	AY095212*, AY095213*, AY137780*
	TCD	10156	1	AY324383*
	HSP90	1877	1	AY391259
	28S	974	11	AY876319-329
	Desaturasas	1236-1374	3	CS608485, 495, 501
<i>Perkinsus olsenii</i>	18S	393-7559	2	AF509333*, AF295120
	ITS-1+5,8S	465-7559	70	AF472517*-523*, AF509333*, AF473840*, AF369967-979, U07701*, U07697*-699*, AY435092, AF441207-218, AF522321*, AY820757*, DQ516703*-715*, DQ194974-979, DQ370464-473, AF140295
	IGS+5S	1209-7559	24	AF509333*, AF140295, AF438150*, AF466540-527, AJ238400*, AF522321
	28S	7559	10	AF509333*, AY876330-335, DQ516679, DQ516683, DQ516685
	Actina	622-832	16	AY876351-357, DQ516693-695, EF204108-111, DQ019936-937
	ITS-1+5,8S+ITS-2	634	14	EF204081-094
	28S	971-973	4	EF204077-080
	PR L38	249	1	AY28805*
	FRSAIS	431	1	AY601756
	FRSGAFAT	705	1	AY601871
<i>Perkinsus chesapeaki</i>	18S	1803-7714	4	AF252288*, AF042707*, AF102171*, AY305326*
	ITS-1+5,8S	741-7714	41	AF440464*-471*, AF252288*, AF102171, AF091541, AY305326*,

(Continúa)



(Continuación)

Especie	Gen o región	Tamaño (pb)	N	N.º de acceso a GenBank
<i>Perkinsus chesapeaki</i> (cont.)	IGS+5S	1522-4121	3	AY876302*-318*, DQ370493-504
	28S	969-3773	15	AF252288, AF102171, AY305328*
	Actina	622-832	19	AY305327*, AY876336-349
				AY876358-374, DQ019938-939
<i>Perkinsus mediterraneus</i>	18S	1772-1786	9	AY517645-647, AY487831- 833, AY486139-441
	ITS-1+5,8S	643	21	AY487834-843, DQ370482-492
	Actina	622	4	EF204112-115
	28S	975-976	13	EF204095-107
<i>Perkinsus qugwadi</i>	ITS-1+5,8S	834	1	AF151528*
<i>Perkinsus honsuensis</i>	28S	1012-1014	4	DQ516680-682, DQ516684
	Actina	622	7	DQ516686-692
	ITS-1+5,8S	666-739	7	DQ516696*-698*, DQ516699-702
<i>Perkinsus</i> sp.	ITS-1+5,8S+ITS-2	648	13	EF204057-069

N, número de secuencias; ITS, espaciador transcrito interno de los genes ribosómicos; IGS, espaciador intergénico de los genes ribosómicos; SOD, superóxido dismutasa; TCD, transportador de cationes divalentes; HSP, proteína de choque térmico; PR L38, proteína ribosómica L38; FRSAIS, fosforibosilaminoimidazol sintetasa; FRSGAFAI, fosforibosilglicinamidaformiltransferasa.

* Genes o regiones de las que se ha obtenido la secuencia completa. La recopilación de secuencias de *Perkinsus* se ha actualizado a partir de la presentada por VILLALBA *et al.* 2004.

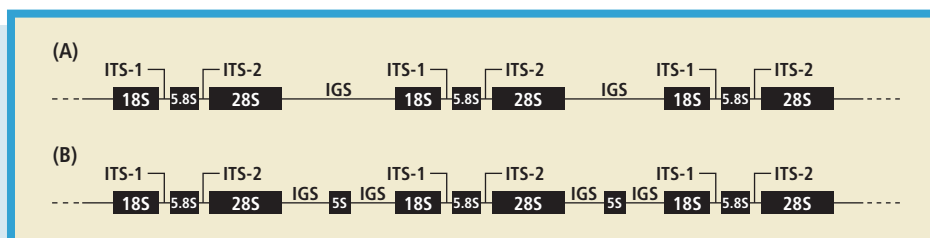


FIGURA 2.

Esquema de la organización de los genes ribosómicos. La unidad de está formada, de 5' a 3', por el gen 18S, espaciador transcrito 1 (ITS-1), gen 5.8S, espaciador transcrito 2 (ITS-2) y gen 28S. Las unidades de repetición están separadas por un espaciador intergénico (IGS), tal y como se muestra en el panel (A). En procariotas y en algunos eucariotas como *Perkinsus olseni*, el gen 5S se localiza junto al resto de genes ribosómicos, entre los genes 28S y 18S como aparece en el esquema (B).



Otras secuencias adecuadas para el diagnóstico molecular de parásitos son los intrones, y también regiones nucleotídicas variables presentes en los exones de otros genes que se encuentran presentes en un moderado número de copias en todos los genomas, y cuya secuencia no se encuentra tan conservada como lo está la de los genes ribosómicos, como por ejemplo los genes de la actina.

Además de la aplicación para el diagnóstico molecular, las secuencias de ADN repetido permiten también la identificación taxonómica, y son igualmente adecuadas para realizar análisis filogenéticos de las especies de parásitos. Todas las secuencias de ADN repetido siguen un modelo evolutivo denominado evolución concertada (DOVER 1986). Este término significa, básicamente, que los miembros de una familia génica no evolucionan independientemente de los otros miembros de la familia dentro del genoma. Esto origina finalmente que la variación de las secuencias dentro de un organismo sea muy baja. Debido a que las variantes que puedan aparecer por mutaciones se homogeneizan dentro de la familia multigénica en un genoma y además se fijan en las poblaciones de una especie, el resultado es una variación baja de las secuencias nucleotídicas entre los individuos de una misma especie (variabilidad intraespecífica) y, al mismo tiempo, una variación elevada de las secuencias de nucleótidos entre individuos que pertenecen a diferentes especies (divergencia interespecífica). Por tanto, la caracterización de las secuencias obtenidas de una familia multigénica de distintas especies de parásitos permite establecer los valores de variabilidad intraespecífica y divergencia interespecífica para ese marcador molecular. Una vez conocidos estos valores puede establecerse, en función de ese marcador, si los parásitos que infectan a un mismo hospedador en diferentes áreas geográficas o que infectan a distintas especies hospedadoras, pertenecen a la misma especie (o a diferentes especies o incluso a cepas distintas). De este modo, un marcador molecular basado en una secuencia de ADN repetido, diseñado para el diagnóstico de un parásito, puede ser al mismo tiempo un marcador taxonómico. Igualmente, si en lugar de utilizarse las secuencias más variables se utilizan las regiones génicas más conservadas, pueden realizarse también estudios filogenéticos encaminados a conocer la proximidad evolutiva existente entre los distintos táxones de parásitos o la ubicación de una especie o un grupo de especies en un phylum o grupo taxonómico previamente establecido.



5. APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES: DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *MARTEILIA REFRINGENS*, *PERKINSUS OLSENI* Y *BONAMIA OSTREAE*

En numerosas ocasiones, como se encuentra recogido en la bibliografía, se ha descrito en bivalvos la presencia de protozoos parásitos sin aclarar la especie a la que pertenecen (*Haplosporidia* sp., por ejemplo; Tabla 2), en localizaciones geográficas diferentes a las habituales, o en hospedadores en los que anteriormente no se había descrito su presencia. Esto se debe, principalmente, a que el diagnóstico se realizó a partir de la observación de muestras histológicas mediante microscopía óptica cuando no se tenía acceso a los datos moleculares necesarios, o simplemente, las técnicas basadas en ellos no se han podido aplicar al parásito presente en las muestras infectadas. En algunos de estos casos, se han descrito nuevas especies de parásitos que posteriores estudios ultraestructurales y/o moleculares han invalidado (es el caso de *Perkinsus atlanticus* = *Perkinsus olsenii* y de *Perkinsus andrewsi* = *Perkinsus chesapeakei*. MURRELL *et al.* 2002; BURRESON *et al.* 2005). Y al contrario, estudios similares han permitido la identificación *a posteriori* de una especie concreta o la descripción de una nueva especie parasitaria (CARNEGIE *et al.* 2006; DUNGAN y REECE 2006). Además de la importancia de la identificación molecular de los patógenos para el cultivo de bivalvos (extensión geográfica de la enfermedad o ampliación del rango de hospedadores), o para la descripción de nuevas especies de patógenos, hay otro aspecto para el que resultan muy interesantes: el estudio del ciclo de vida de los parásitos.

Excepto nuevamente en el caso de alguna especie del género *Perkinsus*, el ciclo de vida y el modo de transmisión de los principales parásitos de bivalvos es desconocido en su mayor parte. Se considera que, al menos en algunos casos, puede tratarse de ciclos de vida complejos en los que estén implicadas varias especies de hospedadores. Un ejemplo de ello es el caso de *Marteilia refringens*, donde la transmisión horizontal del parásito en su hospedador habitual (*Ostrea edulis*) ha sido descartada debido a la imposibilidad de la infección experimental



de animales sanos después de diferentes ensayos de inoculación y cohabitación (BERTHE *et al.* 1998). Hasta ahora, sólo se ha identificado una especie más implicada en el ciclo de vida de *M. refringens*, el copépodo *Paracartia grani* (AUDEMARD *et al.* 2002). *M. refringens* fue transmitida experimentalmente desde ostras infectadas a esta especie de copépodo, mientras que no se consiguió la transmisión del parásito en el sentido contrario (AUDEMARD *et al.* 2002). Podría existir por tanto, otra u otras especies igualmente implicadas en el ciclo de vida de *M. refringens*. También se plantean otras cuestiones como, por ejemplo, si el copépodo, en el medio natural, podría ser en realidad un hospedador alternativo del parásito en lugar de un hospedador intermediario. Este ejemplo ilustra claramente la importancia de la identificación de los parásitos en todos aquellos hospedadores en los que sean detectados. Si bien el análisis de la secuencia de un marcador específico puede detectar e identificar la especie del parásito presente en cualquier hospedador, no proporciona ninguna información acerca del estadio del ciclo de vida en el que se encuentra el parásito en ese hospedador en concreto. Sin embargo, la utilización del marcador como sonda específica en un análisis *in situ* permitiría detectar la presencia de diferentes formas del parásito que pudieran estar presentes y que no fueran reconocidas morfológicamente en un hospedador diferente al habitual.

A continuación, y como aplicación en los diferentes aspectos descritos anteriormente a lo largo del texto, presentamos los resultados y conclusiones que nuestro grupo de investigación ha obtenido en los últimos años tras el aislamiento (mediante amplificación por PCR) y caracterización de marcadores moleculares para el desarrollo de métodos de diagnóstico, y su utilización en estudios adicionales, realizados para los parásitos *Perkinsus olseni*, *Marteilia refringens*, y *Bonamia ostreae*.

5.1. Aplicación de marcadores moleculares: ***Perkinsus olseni***

La secuencia del genoma de *Perkinsus olseni* elegida para el desarrollo de nuestro método de diagnóstico molecular del parásito es el espaciador intergénico situado entre las unidades de repetición de los genes ribosómicos (IGS; Figura 2). El IGS es una región del genoma que



presenta un alto grado de variabilidad y una evolución más rápida en su secuencia que los genes ribosómicos y que los espaciadores internos (ITS-1 e ITS-2, Figura 2). Se ha estimado que las regiones más conservadas de la secuencia del IGS evolucionan 1,5 veces más rápidamente que la de los ITSs (BENA *et al.* 1998). El ADN de *Perkinsus* fue obtenido tras el aislamiento y obtención de esporas a partir de branquia de una almeja fina (*Ruditapes decussatus*) infectada procedente de Huelva.

5.1.1. Diseño de un método de diagnóstico para *Perkinsus olseni* mediante PCR

Para la amplificación por PCR del espaciador IGS, se utilizaron dos cebadores conservados (presentes en las secuencias de otras especies) localizados en los extremos 3' y 5' de los genes que codifican para los ARNs ribosómicos 28S y 18S respectivamente (Figura 3A). La Figura 3B muestra el fragmento amplificado de 1573 pb, según las condiciones descritas en DE LA HERRÁN *et al.* (2000). La comparación con secuencias depositadas en las bases de datos GenBank y EMBL (utilizando el algoritmo BLAST; ALTSCHUL *et al.* 1997) permitió identificar en la secuencia los últimos 57 pb del gen 28S, un espaciador intergénico de 238 pb, la secuencia completa del gen 5S (124 pb), el resto del espaciador IGS (1084 pb), y el extremo inicial del gen 18S (70 pb). Esta organización de los genes ribosómicos en *P. olseni*, con el gen 5S incluido en el espaciador intergénico, es excepcional entre los seres vivos. Sólo ocurre en bacterias y en algunas especies de hongos, de algas y de algunos protozoos. Entre éstos últimos, y más concretamente en el grupo de los Apicomplexa, se ha encontrado esta organización sólo en algunas especies.

La secuencia del espaciador entre los genes 5S y 18S, específica de *P. olseni*, fue utilizada para diseñar los cebadores PK1 y PK2, que amplifican un fragmento de 554 pb (Figura 3) sólo cuando se utiliza ADN del parásito o ADN de almejas finas (*R. decussatus*) infectadas, nunca a partir de ADN de almejas sanas. La especificidad de este fragmento del parásito con respecto a las especies hospedadoras se comprobó utilizándolo como sonda en un análisis de tipo Southern-blot frente a ADN de las almejas *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Venerupis pullastra*, *V. aurea* y *V. rhomboides*, no apareciendo hibridación cruzada con el genoma de ninguna de ellas. Los cebado-

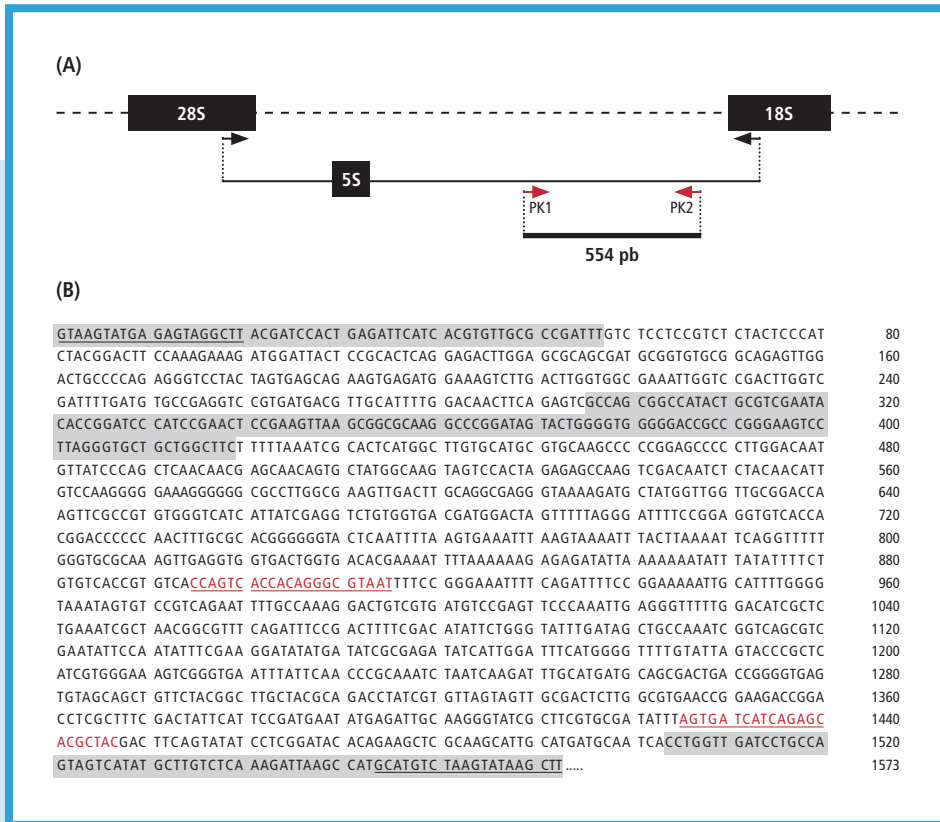


FIGURA 3.

Secuencia amplificada del espaciador intergénico (IGS) y diseño de cebadores específicos para *Perkinsus olseni*. El extremo 3' del gen 28S (posición 1 a 57), el gen 5S (posición 295 a 419) y el extremo 5' del gen 18S (posición 1503 a 1573) aparecen resaltados en gris. Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores; en rojo se marcan las secuencias de los oligonucleótidos PK1 y PK2.

res demostraron además una amplificación proporcional al grado de infección de las muestras: las almejas fuertemente infectadas (nivel 5 en la escala de Mackin, establecida con valores de 0,5 a 5), mostraron una mayor cantidad de producto amplificado, mientras que la cantidad de producto amplificado decrecía conforme el nivel de infección de las almejas analizadas también se iba reduciendo (niveles 3 y 1 respectivamente de la escala de Mackin) (Figura 4). Es importante destacar que

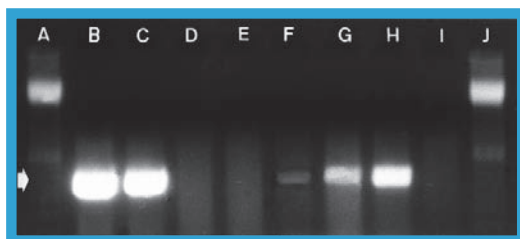


FIGURA 4.

Test de diagnóstico para *Perkinsus olseni*. Se utilizaron diferentes muestras de ADN para llevar a cabo la PCR de detección del parásito con los cebadores

PK1 y PK2. En las calles A y J, marcadores de ADN para determinación del tamaño del fragmento amplificado. Calles B y C, ADN de *Perkinsus olseni*. Calles D y E, ADN de almejas finas no infectadas. Calles F-H, ADNs de tejidos de almejas procedentes de cultivos con grado creciente de infección (grados de infección según la escala de Mackin: 1 en la calle F, 3 en la calle G y 5 en la calle H). Calle I, control negativo (sin ADN) de la PCR. La flecha señala los fragmentos de ADN amplificados, con un tamaño entre 500 y 600 pb.

infecciones del nivel 1 se consideran que corresponden con niveles difícilmente detectables por métodos histológicos tradicionales.

5.1.2. Aplicación del método de diagnóstico de *Perkinsus olseni* mediante PCR

La obtención de ADN de *Perkinsus olseni* se realiza habitualmente a partir de preesporangios cultivados en el medio denominado RFTM (del inglés *Ray's Fluid Thioglycollate Medium*), que por sí mismo es ya un diagnóstico de la presencia del parásito en el tejido del animal (Figura 5).

Nosotros hemos utilizado conjuntamente este método de cultivo con los métodos de hibridación *in situ* y PCR para confirmar la presencia de la especie *Perkinsus olseni* en diferentes especies de bivalvos del litoral suratlántico, donde la presencia del patógeno ha sido constatada desde 1989 (AZEVEDO 1989; NAVAS *et al.* 1992; RODRÍGUEZ *et al.* 1994; NAVAS *et al.* 2003). Este estudio se completa con el análisis del grado de diferenciación genética existente entre los aislados de *P. olseni* y otras especies del género *Perkinsus* (como se describirá detalladamente en el apartado siguiente). Con todo ello, se pretende descartar la existencia de diferentes especies de *Perkinsus* que pudieran infectar a las almejas en esta región geográfica.

Las zonas de procedencia de las almejas se muestran en la Figura 6. Las especies analizadas se recogen en la Tabla 3. Mediante PCR se

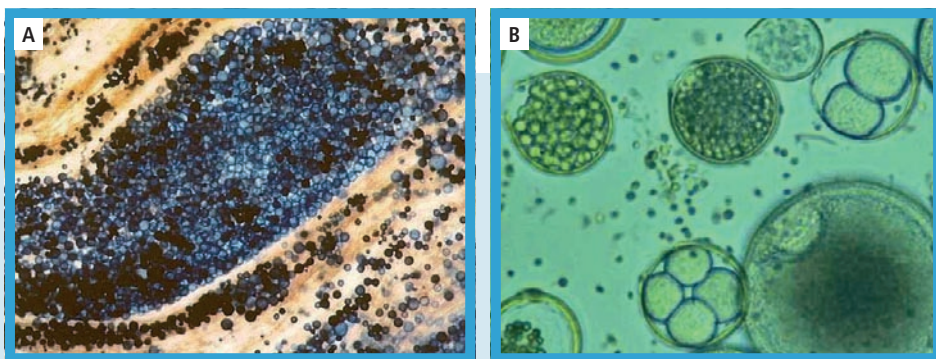


FIGURA 5.

Cultivo de *Perkinsus* en RFTM. (A) En la branquia de una almeja fina tras su tinción con lugol. El grado de infección corresponde a un nivel 5 (infección intensa) en la escala de Mackin. (B) Distintas fases de división del esporangio para la formación de esporas. Puede observarse la formación del tubo de expulsión y las esporas libres que nadan en el medio.

obtuvo amplificación con los cebadores específicos para *Perkinsus olseni* (PK1/PK2) en todas las muestras, y las células del parásito fueron detectadas en los tejidos mediante hibridación *in situ*, utilizando como sonda el fragmento amplificado (Figura 7). Así, se ha confirmado la infección por *P. olseni* en la almeja fina (*R. decussatus*), almeja japonesa (*R. phillipinarum*), pirulo (*V. aurea*) y madrealmeja (*V. pullastra*) del río Carreras (Huelva), en la almeja japonesa de la Bahía de Cádiz y en la almeja fina de Montijo (Cádiz).

5.1.3. Identificación taxonómica de *Perkinsus* en distintos hospedadores

La secuencia de los productos de PCR (ver clave en la Tabla 3) fue comparada con todas las secuencias homólogas pertenecientes a especies del género *Perkinsus* caracterizadas hasta el momento y depositadas en la base de datos GenBank (ver Tabla 2), las de las especies *P. olseni*, *P. chesapeakei* y *P. marinus*.

El resultado del análisis muestra que todos los amplificados se corresponden con secuencias de *Perkinsus olseni*. El grado medio de variación intraespecífica entre las secuencias obtenidas de almejas infectadas pro-

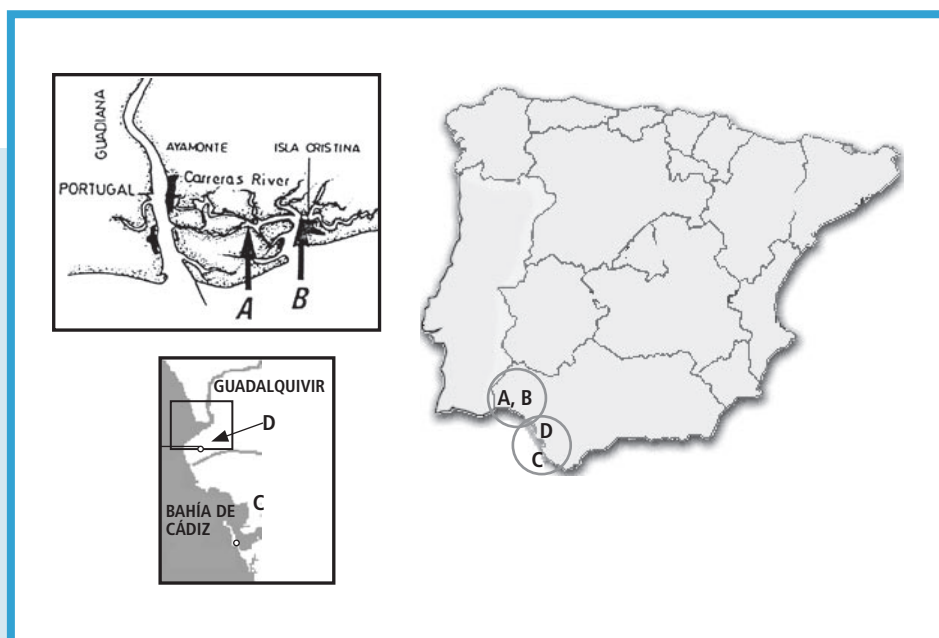


FIGURA 6.

Localización de las zonas de muestreo de almejas para el diagnóstico de *Perkinsus*.

En la provincia de Huelva en el Río Carreras, en Pinillos (A) y en Isla Cristina (B), y en la provincia de Cádiz, en la Bahía (C) y en la desembocadura del Río Guadalquivir (D).

cedentes de la costa suratlántica andaluza es del 0.6%. La variabilidad intraespecífica de las secuencias de *P. olsenii*, obtenidas de distintas especies hospedadoras de diferentes orígenes, varía entre 0-1.2% (valor

TABLA 3.

Descripción de las especies de almejas en las que se ha analizado la presencia de *Perkinsus*.

Especie hospedadora	Nombre común	Procedencia	Clave
<i>Ruditapes decussatus</i>	Almeja fina	Río Carreras (Pinillos, Huelva) Río Guadalquivir (Montijo, Cádiz)	1137RdRC 935RdRG
<i>Ruditapes phillippinarum</i>	Almeja japonesa	Río Carreras (Pinillos, Huelva) Saco Bahía Cádiz (Santi Baños, Cádiz)	1126RpRC 1127RpBC
<i>Venerupis aurea</i>	Pirulo	Río Carreras (Isla Cristina, Huelva)	1136VaRC
<i>Venerupis pullastra</i>	Madrealmeja	Río Carreras (Isla Cristina, Huelva)	1131VpRC

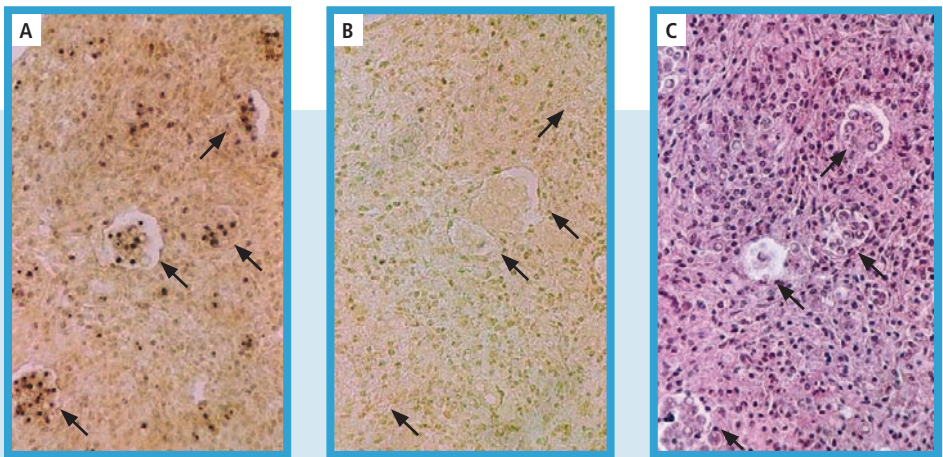


FIGURA 7.

Hibridación in situ para la detección de *Perkinsus olseni* sobre tejido conectivo del sistema digestivo de una almeja fina (*R. decussatus*). Las imágenes corresponden a tres cortes seriados del mismo tejido: (A) Sección hibridada utilizando como sonda el fragmento amplificado con los cebadores PK1 y PK2. (B) Control negativo (sin sonda), donde se observan los trofozoitos de *P. olseni* sin reacción positiva alguna. (C) Control histológico, sección teñida con hematoxilina-eosina donde se observan las células típicas de *P. olseni* rodeadas de granulocitos de la almeja.

medio 0.4%), mientras que el grado medio de variación cuando se comparan los dos conjuntos de secuencias entre sí es del 0.4% (Tabla 4). El grado de diferenciación entre *P. olseni* y *P. marinus* es del 20.7%, mientras que la diferenciación entre *P. marinus* y las secuencias de Huelva y Cádiz es del 21%. De modo similar, la divergencia entre *P. olseni* y *P. chesapeakei* es del 35%, el mismo valor que se encuentra al comparar las secuencias de las almejas andaluzas con las de *P. chesapeakei*. Por lo

TABLA 4.

Valores de distancia genética entre las secuencias PK1 y PK2 del IGS de Perkinsus spp.

	<i>P. olseni</i>	<i>Aislados Perkinsus</i>	<i>P. marinus</i>	<i>P. chesapeakei</i>
<i>P. olseni</i>	0,004			
<i>Aislados Perkinsus</i>	0,006	0,006		
<i>P. marinus</i>	0,207	0,210	—	
<i>P. chesapeakei</i>	0,349	0,354	0,398	0,045



tanto, el grado de diferenciación entre nuestras secuencias y las de *P. olseni* entra dentro del rango de variabilidad intraespecífica existente para este marcador molecular, lo cual identifica las secuencias como pertenecientes a la especie *P. olseni*. Los valores similares de divergencia interespecífica de los aislados y de *P. olseni* con respecto a las otras dos especies comparadas corroboran esta conclusión. Por otro lado, la divergencia interespecífica entre *P. marinus* y *P. chesapeakei* es del 40%. Todo esto queda reflejado en el correspondiente árbol filogenético (Figura 8). Todas las muestras amplificadas, se agrupan junto a las secuencias correspondientes a *P. olseni* en un clado soportado por un valor de bootstrap del 100%. En el análisis se incluye también una secuencia que obtuvimos del cultivo de una chirla (*Chamelea gallina* 906CgLG) procedente de Almería, con grado de infección ligero por *Perkinsus* (nivel 1 de la escala de Mackin), que igualmente se identifica con el resto de secuencias de *P. olseni*. La agrupación de *P. olseni* y *P. marinus* como las dos especies más próximas dentro de las tres analizadas coincide con los resultados obtenidos recientemente por otros autores utilizando las secuencias de los espaciadores ITS y del gen ribosómico 18S (ABOLLO *et al.* 2006; DUNGAN y REECE 2006).

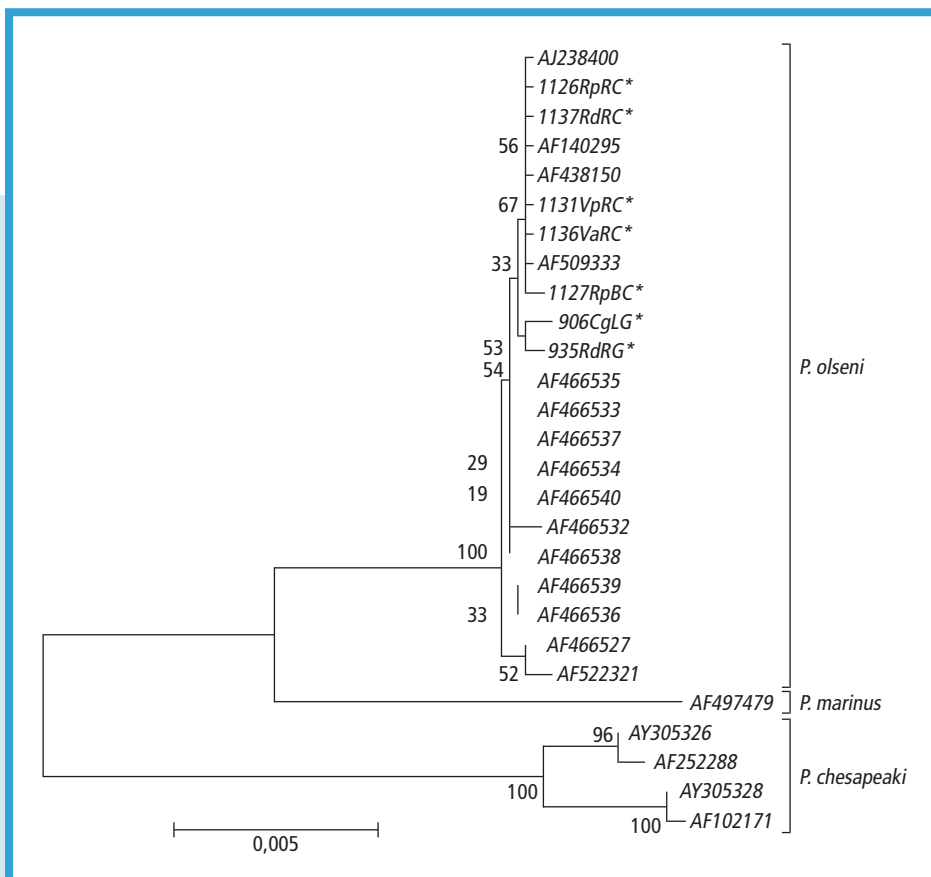
5.2. Aplicación de marcadores moleculares:

Marteilia refringens

De nuevo, y a la vista de los buenos resultados obtenidos en los estudios realizados con *Perkinsus olseni*, el IGS (espaciador intergénico de los genes ribosómicos, Figura 2) fue la secuencia elegida para el desarrollo de un método de diagnóstico molecular de *Marteilia refringens*. El material utilizado para su obtención fue ADN de *M. refringens* extraído de células del parásito, purificadas a partir de glándulas digestivas de ostras planas (*Ostrea edulis*) procedentes de Huelva.

5.2.1. Diseño de un método de diagnóstico para *Marteilia refringens* mediante PCR

Para la amplificación del espaciador IGS, se utilizó un cebador localizado en el extremo 5' del gen 28S, cuya secuencia nucleotídica se encuentra presente en táxones evolutivamente muy distantes (desde microorganismos hasta plantas superiores y mamíferos; BENA *et al.*


FIGURA 8.

Relaciones de parentesco entre los aislados de *Perkinsus* de diferentes especies de almejas de distintas localidades y entre *Perkinsus olseni* y otras especies de *Perkinsus*. El cladograma corresponde al árbol Neighbor-joining, construido utilizando el modelo Kimura-2p y utilizando el programa MEGA2. Las secuencias que pretendíamos identificar están marcadas con*. El número corresponde a la identificación de la muestra, las dos siguientes letras identifican a la especie de almeja y las dos últimas la localización geográfica. Rd, *Ruditapes decussatus*; Rp, *R. philippinarum*; Vp, *Venerupis pullastra*; Va, *V. aureus*; RC, río Carreras; BC, Bahía de Cádiz; RG, río Guadalquivir del Río Carreras (Huelva). De igual forma se identifica la secuencia obtenida de *Chamelea gallina* (chirla) procedente de La Garrucha (Almería); CgLG. En el resto de secuencias, el nombre corresponde al número de identificación de la secuencia en la base de datos GenBank. Los números indican valores de bootstrap de cada nodo del árbol.



1998). El cebador reverso fue diseñado en el extremo 3' del gen 18S de *Marteilia refringens* utilizando la secuencia del parásito (AJ250699, Tabla 2). Siguiendo las condiciones de PCR descritas en LÓPEZ-FLORES *et al.* (2004), se obtuvo un fragmento amplificado de aproximadamente 3,5 kb. Mediante la técnica de Southern-blot (hibridación sobre membrana) se determinó que el fragmento amplificado era específico del genoma de *M. refringens*, puesto que al ser utilizado como sonda mostró señal de hibridación sólo con muestras que contenían ADN del parásito, y ninguna señal con muestras que contenían únicamente ADN de ostras. A continuación, se obtuvo la secuencia completa del fragmento amplificado que se muestra en la Figura 9. La comparación de la secuencia nucleotídica con las secuencias depositadas en las bases de datos GenBank y EMBL (utilizando el algoritmo BLAST; ALTSCHUL *et al.* 1997) permitió establecer la secuencia correspondiente al espaciador, delimitada por los genes que codifican para los ARNs ribosómicos 28S y 18S. La secuencia del espaciador no mostró identidad con ninguna secuencia depositada en las bases de datos, lo cual indica que, muy probablemente, se trate de un fragmento de ADN que está presente únicamente en el genoma de *M. refringens*.

Una vez asegurada su especificidad, se procedió a diseñar los cebadores para el método de diagnóstico del parásito por PCR, llamados MT-1 y MT-2. Además, se diseñó una segunda pareja de cebadores, llamados MT-1B y MT-2B y localizados en el interior del fragmento amplificado por los cebadores MT-1 y MT-2, con la intención de poder utilizarlos en una segunda PCR o nested-PCR. La nested-PCR es una estrategia que permite aumentar considerablemente (al menos de 100 a 1000 veces) la sensibilidad de la técnica de PCR (SHARIF *et al.* 1999) y en la que, además, se ve incrementada también la especificidad, ya que los cebadores utilizados se encuentran presentes en la secuencia de ADN del producto amplificado en la primera PCR. El tamaño del fragmento amplificado en la primera PCR es de 525 pb y la nested-PCR da lugar a un fragmento de 358 pb. En ningún caso se obtiene amplificación cuando se utiliza ADN de ostras o mejillones sanos. En la Figura 9 se muestra la localización de los cebadores en la secuencia del IGS de *M. refringens*.

El límite de detección de los cebadores (y por tanto del método de diagnóstico) fue estimado mediante la utilización en la PCR de dilucio-

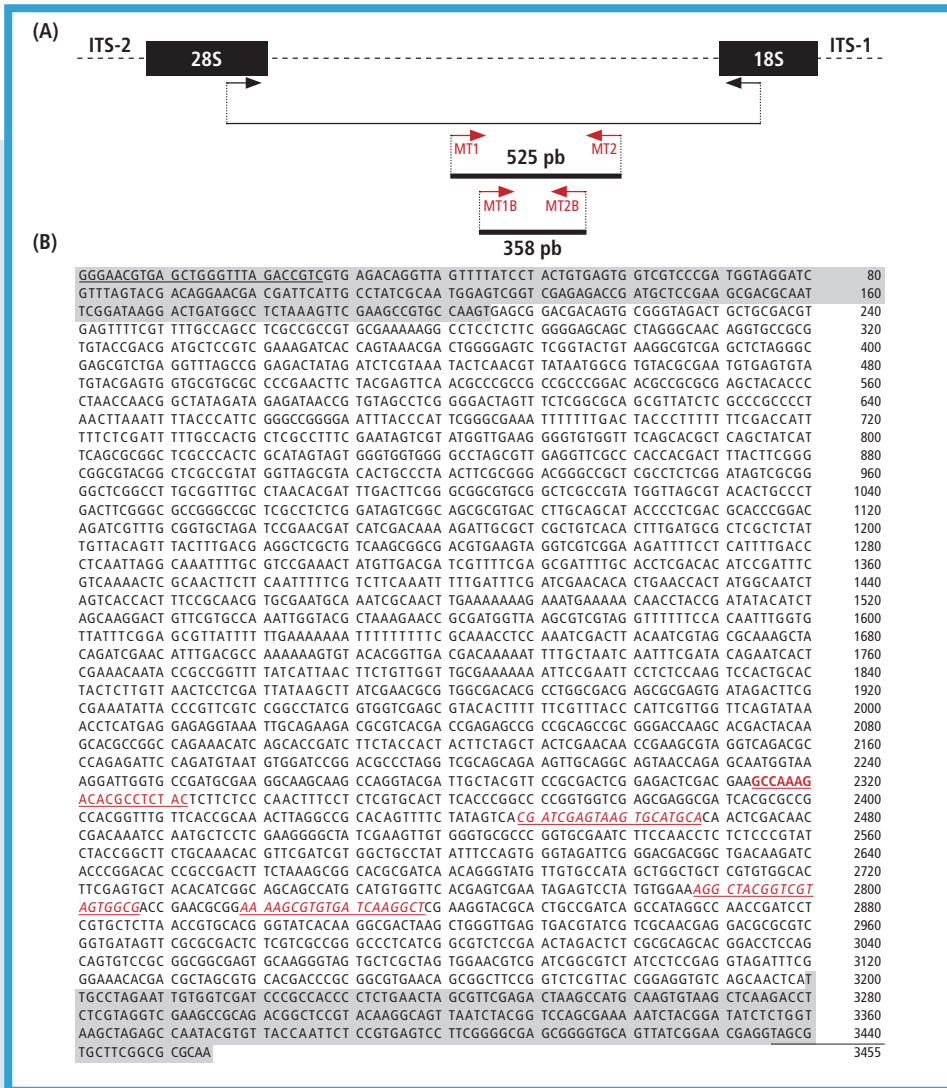


FIGURA 9.

Secuencia amplificada del espaciador intergénico (IGS) y diseño de cebadores específicos para *Marteilia refringens*. El extremo 3' del gen 28S (posición 1 a 205) y el extremo 5' del gen 18S (posición 3200 a 3455) aparecen resaltados en gris. Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores; en rojo se marcan las secuencias de los oligonucleótidos MT1 y MT2, y en rojo y cursiva la de los cebadores MT1B y MT2B utilizados en la nested-PCR.



nes de ADN del parásito purificado y en presencia de 1 microgramo de ADN del hospedador. Así, el método de diagnóstico tiene una sensibilidad que permite detectar la señal de amplificación hasta la dilución correspondiente a 5 pg (5×10^{-12} g) de ADN del parásito en la primera PCR y 0,5 fg (5×10^{-16}) en la nested-PCR, valores que disminuyen sensiblemente en presencia de ADN del hospedador (Tabla 5).

TABLA 5.

Límite de detección de ADN de *Marteilia refringens* mediante PCR con los cebadores MT.

Cebadores	Tamaño del producto amplificado	Límite de detección	
		ADN <i>M. refringens</i>	ADN <i>M. refringens</i> + ADN <i>O. edulis</i>
MT1/MT2	525 pb	5 pg	50 pg
MT1B/MT2B	358 pb	0,5 fg	50 fg

Finalmente, el método de diagnóstico puesto a punto en el laboratorio fue probado utilizando ADNs extraídos de glándulas digestivas de ostras cuyo grado de infección se había establecido previamente mediante citología (aposiciones de tejido procedente de la glándula digestiva de los bivalvos, teñidas y observadas al microscopio óptico). El resultado obtenido se muestra en la Figura 10, en la que puede apreciarse como la intensidad del producto amplificado es proporcional al grado de infección del hospedador.

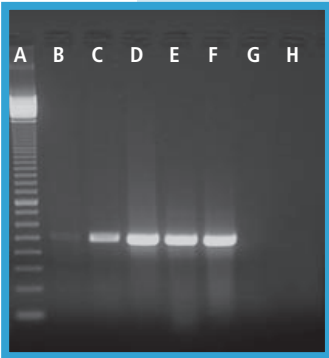
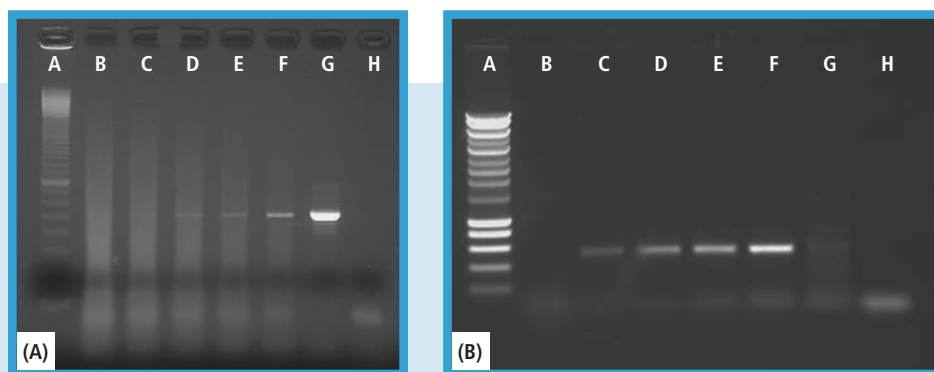


FIGURA 10.
Test de diagnóstico para *Marteilia refringens*. Los cebadores MT1 y MT2 se utilizaron para llevar a cabo la PCR de detección del parásito sobre diferentes muestras de ADN. En la calle A, marcador de peso molecular (100 bp, Roche). Calles B a D, ADN obtenido de glándula digestiva de ostras con grados de infección creciente. Calles E y F, ADN de *M. refringens*. Calle G, ADN de ostra no infectada. Calle H, control negativo (sin ADN) de la PCR.

5.2.2. Aplicación del método de diagnóstico de *Marteilia refringens* mediante PCR

La aplicación del método de diagnóstico sobre muestras infectadas se lleva a cabo utilizando ADN extraído de la glándula digestiva de los animales a analizar. En este sentido, es importante tener en cuenta un aspecto muy importante referido al diagnóstico molecular en este tipo de muestras, que es la posibilidad de una falsa interpretación de los resultados obtenidos. Para evitarlo, es imprescindible utilizar siempre un control negativo y un control positivo de la PCR, que nos indican que la amplificación es específica y no debida a una contaminación de laboratorio (ausencia de amplificación en el control negativo) y que la reacción ha funcionado correctamente (amplificación en el control positivo). Además, hay que tener presente una serie de consideraciones, como por ejemplo la posible ausencia de la amplificación debido a la presencia de sustancias inhibitoras de la reacción que han sido descritas (entre otros tipos de muestras) en la carne de las ostras (WILSON 1997). La utilización de diferentes cantidades de ADN en la reacción de PCR o la dilución del ADN permite, en muchos casos, obtener resultados positivos al disminuir la presencia de inhibidores de la reacción. La Figura 11 muestra dos ejemplos de inhibición de la reacción de PCR en distintos tipos de muestras, en las que el ADN ha sido extraído utilizando fenol/cloroformo y un *kit* comercial.

Mediante esta PCR hemos detectado la presencia de *Marteilia refringens* en tres especies de bivalvos de la costa de Huelva: en el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) (LÓPEZ-FLORES *et al.* 2004), en la ostra enana (*Ostrea stentina*) y en el longuerón (*Solen marginatus*) (LÓPEZ-FLORES *et al.* enviado para publicación). La infección fue confirmada mediante hibridación *in situ* en el mejillón y en el longuerón (Figura 12), mientras que no pudo detectarse la presencia del parásito en los tejidos de ninguna de las tres ostras enanas analizadas. Para ello, el fragmento de ADN amplificado mediante PCR fue marcado con digoxigenina (DIG) y utilizado como sonda para la detección del ADN del parásito sobre cortes semifinos del tejido de los animales. La ausencia de señal de hibridación en el caso de las ostras enanas puede ser explicada debido a que el parásito podría haber sido ingerido por

**FIGURA 11.**

Reacción de amplificación de *Marteilia refringens* con los cebadores MT1/MT2 partiendo de cantidades decrecientes de ADN. (A) ADN de glándula digestiva de *Ostrea stentina* obtenido mediante purificación con fenol/cloroformo. Calle A, marcador de peso molecular (100bp, Roche). La cantidad de ADN de la ostra infectada en las calles B a F es de 750 ng, 500 ng, 350 ng, 250 ng y 150 ng. La calle G corresponde al control positivo y la calle H al control negativo de la PCR. (B) ADN de *M. refringens* extraído a partir de células del parásito purificadas de *Mytilus galloprovincialis* mediante el uso de un *kit* comercial (QIAamp® Mini kit de QIAGEN). Calle A, marcador de peso molecular (200 pb, Eurogentec). La cantidad de ADN del parásito en las calles B a F es de 1 µl de ADN (<5ng/µl) en la calle B, y diluciones 1/3, 1/5 y 1/10 (del ADN utilizado en la calle B) en las calles C a E. Las calles F y G corresponden a controles positivos, y la calle H al control negativo de la PCR.

los animales, y no estar produciendo una infección. Por este motivo su ADN pudo ser detectado mediante PCR, pero ninguna de sus células se encontraba parasitando el tejido del hospedador.

Otro tipo de muestra en la que hemos obtenido amplificación por PCR utilizando este método de diagnóstico es en un producto enlatado, identificado como ostras del Pacífico (*Crassostrea gigas*) procedentes del Delta del Ebro. Sin embargo, la infección no pudo ser confirmada mediante hibridación *in situ*, debido que la conservación de los tejidos del animal no permitió la obtención de cortes semifinos para ser analizados. A pesar de no poder confirmar la infección *in situ* en este tipo de muestras por su conservación, la obtención de estos resultados puede resultar informativa en algunos casos, por ejemplo en lo que se refiere a la presencia del parásito en el medio natural del que proceden los animales.



Por otro lado, la mayor sensibilidad de la nested-PCR ha permitido detectar la presencia del parásito en dos tipos de muestras en las que normalmente resulta difícil obtener ADN en condiciones adecuadas para su amplificación mediante PCR. Una de ellas, procedente del Delta del Ebro, corresponde a zooplancton en el que se han identificado diferentes especies de copépodos, incluida la especie *Paracartia grani*, la única que hasta el momento ha demostrado estar implicada en el ciclo de vida de *M. refringens* (N. CARRASCO *et al.* 2007, a y b). En el segundo caso se trata de una muestra embebida en parafina de una chirla (*Chamelea gallina*) procedente de la Bahía de Palma (Mallorca), en la que se había diagnosticado la presencia de *Marteilia* sp. mediante histología. El ADN extraído a partir del tejido fijado no produjo amplificación detectable en la primera PCR, mientras que la nested-PCR proporcionó un fragmento que pudo ser secuenciado y utilizado como sonda para la confirmación de la presencia de *M. refringens* mediante hibridación *in situ* (Figura 12) (LÓPEZ-FLORES *et al.* enviado para publicación).

En los bivalvos de las especies *Solen marginatus* y *Chamelea gallina*, se trata de la primera vez que se documenta la presencia de *Marteilia refringens*. En *S. marginatus* recientemente se ha descrito la presencia de un parásito del género *Marteilia* mediante análisis histológicos, si bien la especie no ha sido determinada al no aplicarse en el estudio ningún análisis molecular (LÓPEZ y DARRIBA 2006). El análisis histológico de los tejidos permite detectar distintos estadios en el epitelio digestivo del hospedador, indicativos de la proliferación del parásito en el curso de la enfermedad. Por otro lado, estos estadios son los mismos que se pueden observar en el hospedador tipo (la ostra plana *Ostrea edulis*). Este hecho hace pensar que, probablemente, no se trate en ninguno de los dos casos de un hospedador intermediario involucrado en el ciclo de vida del parásito, ya que los hospedadores intermediarios albergan estadios diferentes del ciclo de vida de los parásitos. Para determinar si son hospedadores accidentales o si se trata de hospedadores habituales de *M. refringens*, deben llevarse a cabo estudios de su prevalencia en ésta y otras poblaciones, naturales y cultivadas, de estas especies.



5.2.3. Identificación taxonómica de *Marteilia* sp. en distintos hospedadores

La caracterización de las secuencias parciales clonadas del IGS del parásito obtenidas de ostras planas (*Ostrea edulis*) y mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) (la comprendida entre los cebadores de diagnóstico MT-1 y 2, Figura 9), nos ha permitido calcular la similitud entre ellas. El grado de variabilidad en este marcador molecular se encuentra por debajo del 2% (valor medio de distancia génica igual a 0,013), un valor que cabe esperar que corresponda a la variabilidad intraespecífica.

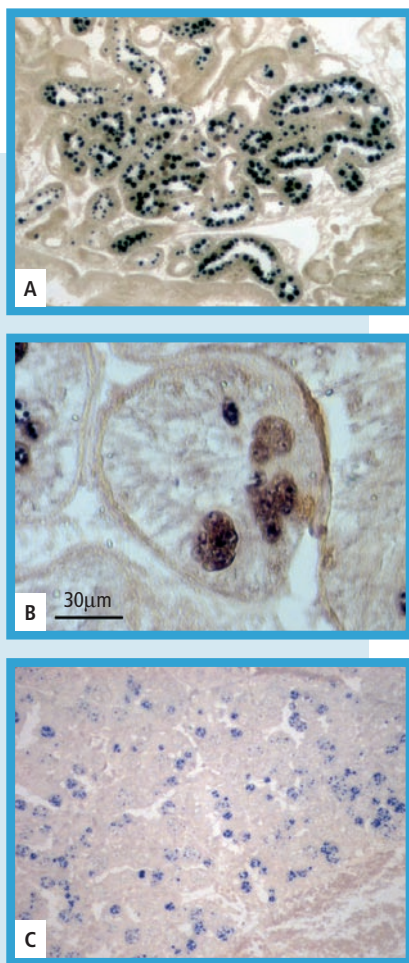


FIGURA 12.

Hibridación *in situ* para la confirmación de la infección por *Marteilia refringens* con la sonda MT1B/MT2B. Las imágenes corresponden a cortes de *Mytilus galloprovincialis* $\times 4$ (A), *Solen marginatus* (B) y *Chamelea gallina* $\times 40$ (C).



ca de este marcador en la especie *Marteilia refringens* (LÓPEZ-FLORES *et al.* 2004). Desafortunadamente, el valor de la divergencia interespecífica del IGS no puede calcularse, ya que esta secuencia no se ha caracterizado en ninguna de las especies reconocidas del género *Marteilia* (Tabla 2). El único dato que puede obtenerse es el de la secuencia del espaciador interno 1 de los genes ribosómicos (ITS-1, ver Figura 13). El valor de divergencia interespecífica entre *M. refringens* y *M. sydneyi* es superior al 45% entre las secuencias parciales comparadas (258 pb).

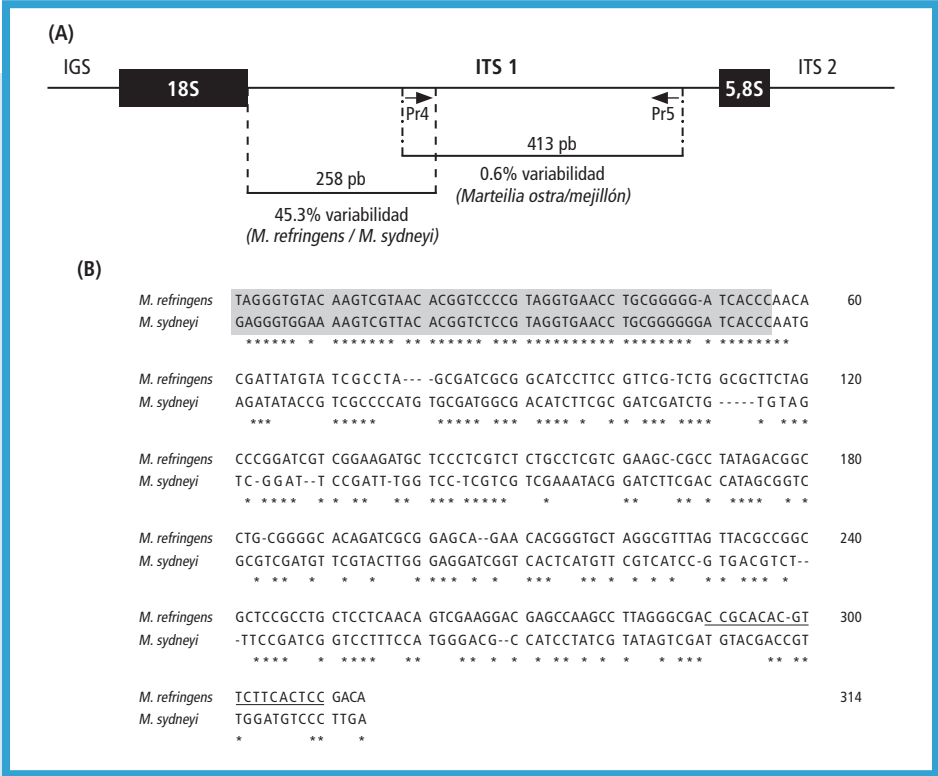


FIGURA 13.

Divergencia interespecífica entre *M. refringens* y *M. sydneyi* para la secuencia del ITS-1. (A) Localización en el espaciador ITS-1 de los fragmentos utilizados en las comparaciones de secuencias del parásito. (B) Alineamiento de un fragmento de 314 pb que corresponde al extremo 3' del gen ribosómico 18S (posiciones 1-56, resaltado en gris) y al fragmento de 258 pb del ITS-1 comparado entre las especies. Subrayada se señala la secuencia del cebador Pr4 diseñado en *M. refringens*.



La variabilidad intraespecífica de *M. sydneyi* en esta misma región es tan sólo del 0.2%, (entre 6 secuencias comparadas procedentes de 6 localizaciones geográficas diferentes, ver Tabla 2). Para *M. refringens*, este valor es del 1.5% en un fragmento de 413 pb (18 secuencias comparadas de 4 regiones geográficas diferentes). Aunque estos datos no corresponden a la misma región del ITS-1 al que se refieren los datos anteriores (ver Figura 13), y el valor de variabilidad intraespecífica puede variar con respecto a la región contigua al extremo 5' del gen 18S, la gran diferencia con respecto a la divergencia interespecífica permite la comparación global de los resultados entre estas dos especies del género *Marteilia* (Tabla 6). Teniendo en cuenta que la secuencia del IGS se considera que evoluciona más rápido que la del ITS, podría considerarse que la variabilidad del 2% entre las secuencias del IGS corresponde, muy probablemente, a la variabilidad intraespecífica de este marcador del genoma de *M. refringens*. Esta consideración se ve apoyada por el hecho de que la variabilidad (medida como la distancia génica media) entre las secuencias pertenecientes al parásito presente en diferentes especies hospedadoras, y procedentes de distintas regiones geográficas, se encuentra siempre próxima a este valor. La Tabla 7 recoge estos resultados, mostrando el porcentaje de la distancia génica obtenida para el IGS del parásito amplificado a partir de ADN obtenido de 6 especies de bivalvos distintas.

Por otro lado, cuando los valores de distancia de todas las secuencias de este marcador molecular se representan gráficamente, se obtiene un árbol en el que las secuencias se reparten en dos clados claramente diferenciados (con apoyo de bootstrap del 98%), lo cual indica la existencia de dos tipos de secuencias (Figura 14). Cabe destacar que en uno de estos clados se agrupan la mayoría de las secuencias del parásito procedente de la ostra plana *Ostrea edulis*, mientras

TABLA 6.

Valores de distancia genética entre las secuencias ITS-1 de *Marteilia refringens* y *Marteilia sydneyi*.

	<i>Marteilia refringens</i>	<i>Marteilia sydneyi</i>
<i>Marteilia refringens</i>	0,015	
<i>Marteilia sydneyi</i>	0,453	0,002



TABLA 7.

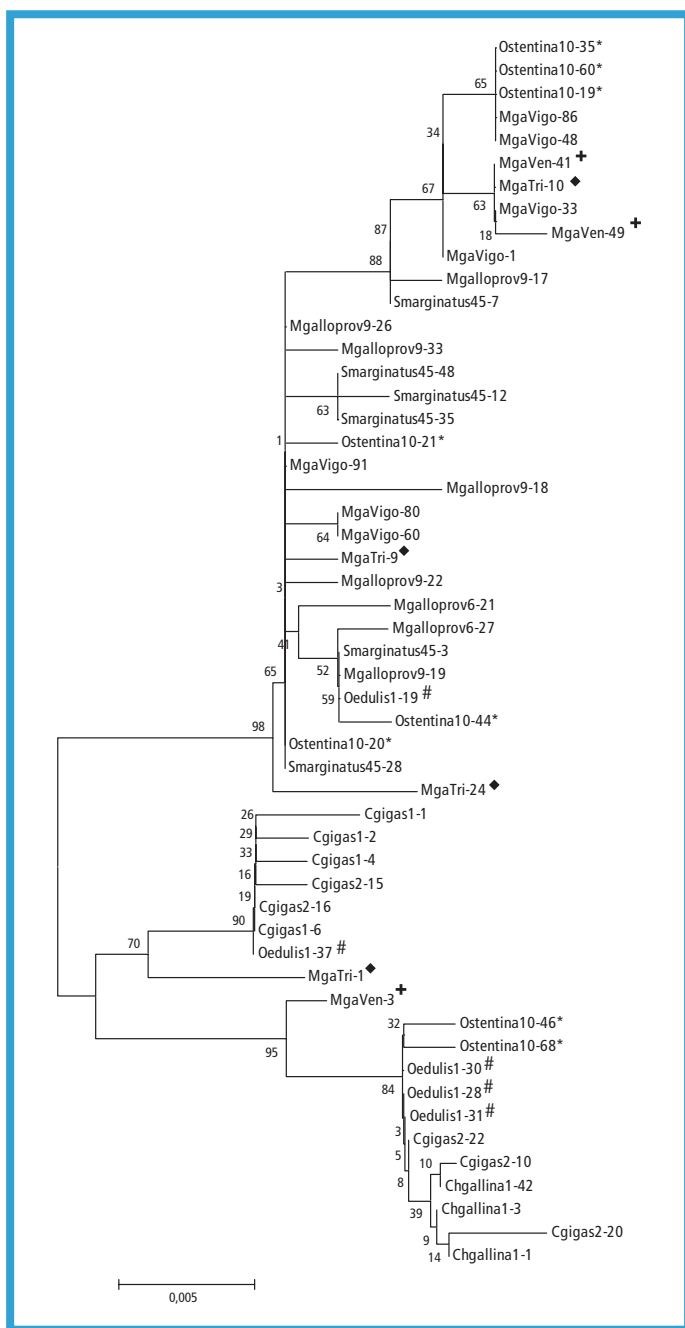
Valores de distancia genética entre las secuencias MT1 y MT2 del IGS de *Marteilia refringens*.

	<i>O. edulis</i>	<i>M. galloprov.</i>	<i>O. stentina</i>	<i>C. gallina</i>	<i>C. gigas</i>	<i>S. marginatus</i>
<i>O. edulis</i>	0,014					
<i>M. galloprov.</i>	0,020	0,010				
<i>O. stentina</i>	0,018	0,013	0,016			
<i>C. gallina</i>	0,009	0,026	0,021	0,000		
<i>C. gigas</i>	0,014	0,023	0,022	0,013	0,012	
<i>S. marginatus</i>	0,018	0,007	0,011	0,026	0,022	0,004

que en el otro lo hacen la mayoría de secuencias obtenidas de mejillones *Mytilus galloprovincialis*. En un análisis con resultados similares, utilizando las secuencias del ITS-1, Le Roux *et al.* (2001) concluyen que la diferenciación de las secuencias en función del hospedador permite diferenciar dos especies de *Marteilia* en Europa. Así, proponen que las secuencias del parásito procedentes de ostras (a las que llamaron «tipo O») corresponden a *Marteilia refringens*, mientras que las secuencias procedentes de mejillones (o «tipo M») corresponderían a la especie *Marteilia maurini*. Sin embargo, un estudio posterior en el que se analizan ostras y mejillones de tres zonas diferentes en España demuestra que los dos tipos de secuencias del ITS-1 obtenidos no se corresponden en todos los casos con el tipo de hospedador (Novoa *et al.* 2005). Nuestros primeros resultados, basados en secuencias del IGS del parásito obtenidas de *O. edulis* y *M. galloprovincialis* (LÓPEZ-FLORES *et al.* 2004) se ven así confirmados. Al incluir en el cladograma las secuencias del parásito obtenidas de distintos hospedadores, nuevamente aparecen secuencias de ambos tipos en algunos de ellos (Figura 14). Si bien la coinfección de un mismo hospedador con dos especies de parásitos es posible y frecuente, los resultados obtenidos nos llevan a pensar que las diferentes secuencias obtenidas representan simplemente a dos variantes de las secuencias IGS de *Marteilia refringens*.

5.3. Aplicación de marcadores moleculares: *Bonamia ostreae*

Los métodos para el diagnóstico de *Bonamia ostreae* por PCR que han sido diseñados hasta el momento están basados en la secuencia del


FIGURA 14.

Árbol Neighbor-joining (Kimura-2p) de secuencias MT1/MT2 de *Marteilia refringens*. Los nombres de las secuencias corresponden a la especie hospedadora y a la localización geográfica cuando corresponde: *Ostrea stentina* (Huelva), *Mytilus galloprovincialis* de Vigo, Trieste y Venecia, *Solen marginatus* (Huelva), *Ostrea edulis* (Huelva), *Crassostrea gigas* (Delta del Ebro) y *Chamelea gallina* (Palma de Mallorca). Las secuencias del parásito obtenidas de un mismo hospedador que aparecen en los dos clados están marcadas del siguiente modo: *O. stentina**, *O. edulis*#, *Mytilus galloprovincialis*+♦. El primer número corresponde al individuo y el segundo identifica al clon. Los números indican los valores de bootstrap de cada nodo del árbol.

gen 18S (CARNEGIE *et al.* 2000; COCHENNEC *et al.* 2000). Ninguno de ellos es específico para *B. ostreae*, ya que ambos amplifican el fragmento homólogo del genoma de otros haplosporidios, con cuyo ADN muestran también reacción cruzada mediante hibridación *in situ* (CARNEGIE y COCHENNEC-LAUREAU 2004). Nuestros intentos de amplificar el espaciador intergénico IGS, utilizando aproximaciones experimentales similares a las previamente utilizadas para *Perkinsus olseni* y *Marteilia refringens*, no han dado resultado por ahora. Tampoco ha sido posible obtener secuencias de genes como el ribosómico 5S, superóxido dismutasa, serin proteasa, arginasa o proteínas de choque térmico. Sin embargo, hemos podido obtener la secuencia del gen de la actina del genoma de *B. ostreae*, gracias principalmente a que la secuencia de este gen ha sido recientemente caracterizada en distintas especies del phylum Haplosporidia (REECE *et al.* 2004). Para ello, ha sido necesario utilizar condiciones de amplificación muy relajadas y la utilización combinada de diferentes parejas de cebadores de secuencia degenerada (Figura 15), hasta localizar una pareja de ellos que permite obtener el amplificado específico del parásito y que no amplifica la secuencia homóloga del genoma del hospedador, la ostra plana (*Ostrea edulis*).

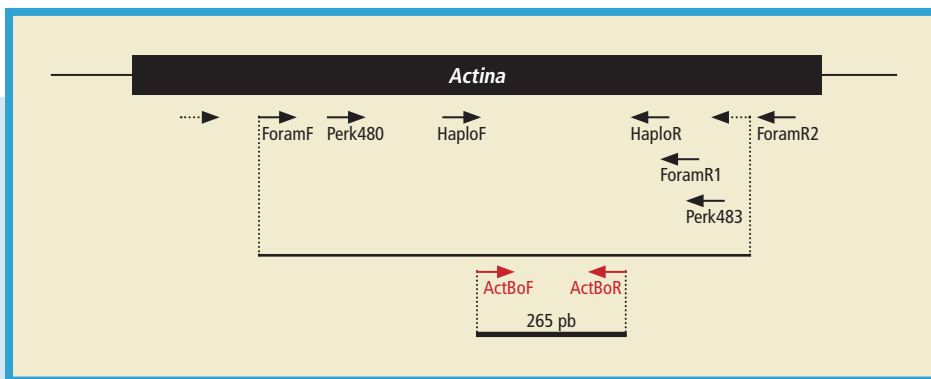


FIGURA 15.

Representación esquemática de las diferentes parejas de cebadores utilizadas para la amplificación del gen de la actina de *Bonamia ostreae*. Las líneas discontinuas representan cebadores de secuencia conservada, diseñados a partir del alineamiento de secuencias de aminoácidos pertenecientes a genes de la actina de diferentes organismos.



La obtención de la secuencia del gen de la actina de *Ostrea edulis*, nos ha permitido comparar las secuencias del parásito y del hospedador, y diseñar así una pareja de cebadores específica de las secuencias de *Bonamia ostreae*. La validez de los cebadores ha sido probada mediante la amplificación a partir de tejido de ostra infectado. La Figura 16 muestra cómo los cebadores diseñados permiten amplificar la secuencia específica del parásito a partir del ADN extraído de fragmentos de branquias parasitadas, sin amplificar el fragmento homólogo del genoma de la ostra. Los primeros análisis realizados apuntan además a que los cebadores podrían ser específicos para la secuencia de la actina de *Bonamia ostreae*, puesto que no producen amplificación alguna a partir de ADN de ostras infectadas con una especie del mismo género, *B. exitiosa* (ver Figura 16 y LÓPEZ-FLORES *et al.* 2007).

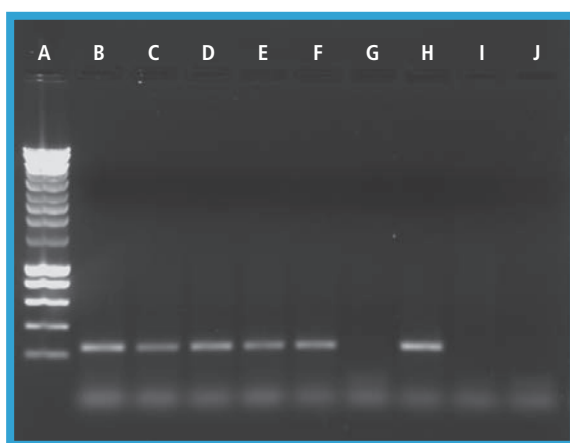


FIGURA 16.

Diagnóstico de *Bonamia ostrea* mediante PCR del gen de la actina con los cebadores ActBoF/ActBoR. Se obtiene amplificación específica (fragmento de 265 pb) a partir de ADN de branquia de *Ostrea edulis* con distinto grado de infección (estimado mediante

análisis histológico), intensa (calles B y C), moderada (calles D y E) y leve (calle F). No se obtiene amplificado alguno a partir de ADN de *Ostrea chilensis* infectada con *B. exitiosa* (calle G) o de ADN de *Ostrea edulis* sana (calle I). La calle H corresponde al control positivo (ADN de *B. ostreae*) y la calle J al control negativo (sin ADN) de la PCR. El marcador de peso molecular aparece en la calle A (200 pb, Eurogentec).

La secuencia del gen de la actina no se ha obtenido aún en las restantes especies del género *Bonamia*, *B. roughleyi*, *B. exitiosa* y *B. perspora*. La caracterización de esta secuencia en todas ellas permitirá



determinar si es posible diseñar cebadores específicos para cada especie basados en este gen. De este modo, además del desarrollo de un método de diagnóstico específico para cada uno de estos parásitos, podrán caracterizarse e identificarse los parásitos nombrados como *Bonamia* sp. que han sido descritos en diferentes especies de ostras de Chile y Argentina (I. Arzul, comunicación personal). Además, dará paso a otras aplicaciones, como la realización de análisis filogenéticos basados en un patrón evolutivo diferente al que siguen los genes ribosómicos, y que podrán realizarse a partir de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos, tal y como se ha hecho en otras especies relacionadas (REECE *et al.* 2004).

En conclusión se puede decir que las técnicas moleculares como la clonación y la secuenciación de regiones específicas de los genomas de los parásitos de moluscos bivalvos, por ejemplo las secuencias IGS e ITS de los genes ribosómicos nucleares y la de otros genes como la actina, y su posterior amplificación por PCR, se están convirtiendo en poderosas herramientas para detectar la presencia de tales parásitos tanto en material cultivado como procedente de la naturaleza. Hay que esperar que en los próximos años se siga avanzando en la caracterización molecular de tales regiones en los diferentes protozoos responsables de las principales enfermedades de los bivalvos, e incluso que se obtenga la secuencia completa del genoma de alguno de ellos. Todo ello permitirá implementar los programas de prevención, que resultan actualmente imprescindibles para evitar la propagación de las enfermedades parasitarias y el adecuado control de los cultivos de bivalvos.

BIBLIOGRAFÍA

- ABOLLO, E., S. M. CASAS, G. CESCIA y A. VILLALBA, 2006 Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol. Cell Probes* **20**: 323-329.
- ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER y D. J. LIPMAN, 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- ALDERMAN, D. J., 1979 Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Mar. Fish Rev.* **41**: 67-69.



- ANDREWS, J. D., y J. L. WOOD, 1967 Oyster mortality studies in Virginia. VI. History and distribution of *Minchinia nelsoni*, a pathogen of oysters in Virginia. Ches. Sci. **8**: 1-13.
- ANÓNIMO, 2007 Código Sanitario para los Animales Acuáticos, Organización Mundial de Sanidad Animal. URL: http://www.oie.int/esp/normes/fcode/E_summry.htm.
- AUDEMARD, C., F. LE ROUX, A. BARNAUD, C. COLLINS, B. SAUTOUR, P. G. SAURIAU, X. DE MONTAUDOIN, C. COUSTAU, C. COMBES y F. C. BERTHE, 2002 Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. Parasitology **124**: 315-323.
- AZEVEDO, C., 1989 Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. J. Parasitol. **75**: 627-635.
- AZEVEDO, C., P. BALSEIRO, G. CASAL, C. GESTAL, R. ARANGUREN, N. A. STOKES, R. B. CARNEGIE, B. NOVOA, E. M. BURRESON y A. FIGUERAS, 2006 Ultrastructural and molecular characterization of *Haplosporidium montforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*. J. Invertebr. Pathol. **92**: 23-32.
- BALOUET, G., M. PODER y A. CAHOUR, 1983 Haemocytic parasitosis: Morphology and pathology of lesions in the French flat oyster *Ostrea edulis* L. Aquaculture **34**: 1-14.
- BARBER, B. J., R. LANGAN y T. L. HOWELL, 1997 *Haplosporidium nelsoni* (MSX) epizootic in the Piscataqua river estuary (Maine New Hampshire, USA). J. Parasitol. **83**: 148-150.
- BENA, G., M. F. JUBIER, I. OLIVIERI y B. LEJEUNE, 1998 Ribosomal external and internal transcribed spacers: combined use in the phylogenetic analysis of *Medicago* (Leguminosae). J. Mol. Evol. **46**: 299-306.
- BERTHE, F. C. J., M. PERNAS, M. ZERABIB, P. HAFFNER, A. THÉBAULT y A. FIGUERAS, 1998 Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of its life cycle. Dis. Aquat. Org. **34**: 135-144.
- BERTHE, F. C. J., F. LE ROUX, R. D. ADLARD y A. FIGUERAS, 2004 Marteiliosis in molluscs: A review. Aquat. Living Resour. **17**: 433-448.
- BOWER, S. M., S. E. MCGLADDERY e I. M. PRICE, 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Ann. Rev. Fish Dis. **4**: 1-99.
- BOWER, S. M., D. HERVIO y G. R. MEYER, 1997 Infectivity of *Mikrocytos mackini*, the causative agent of Denman Island disease in Pacific oysters *Crassostrea gigas*, to various species of oysters. Dis. Aquat. Org. **29**: 111-116.



- BURRESON, E. M., y S. E. FORD, 2004 A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat. Living Resour.* **17**: 499-517.
- BURRESON, E. M., K. S. REECE y C. F. DUNGAN, 2005 Molecular, morphological and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**: 258-270.
- CARNEGIE, R. B., B. J. BARBER, S. C. CULLOTY, A. J. FIGUERAS y D. L. DISTEL, 2000 Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. *Dis. Aquat. Org.* **42**: 199-206.
- CARNEGIE, R. B., G. R. MEYER, J. BLACKBOURN, N. COCHENNEC-LAUREAU, F. C. J. BERTHE y S. M. BOWER, 2003 Molecular detection of the oyster parasite *Mikrocytos mackin*, and a preliminary phylogenetic analysis. *Dis. Aquat. Org.* **54**: 219-227.
- CARNEGIE, R. B., y N. COCHENNEC-LAUREAU, 2004 Microcell parasites of oysters: recent insights and future trends. *Aquat. Living Resour.* **17**: 519-528.
- CARNEGIE, R. B., E. M. BURRESON, HINE, M., N. A. STOKES, C. AUDEMARD, M. J. BISHOP y C. H. PETERSON, 2006 *Bonamia perspora* n. sp. (Haplosporidia), a parasite of the oyster *Ostreola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. *J. Eukaryot. Microbiol.* **53**: 232-245.
- CARRASCO, N., I. LÓPEZ-FLORES, M. ALCARAZ, D. FURONES, F. BERTHE e I. ARZUL, 2007a First record of *Marteilia* parasite (Paramyxia) in zooplakton populations in a natural estuarine environment. *Aquaculture* **269**: 63-70.
- CARRASCO, N., I. LÓPEZ-FLORES, M. ALCARAZ, D. FURONES, F. BERTHE e I. ARZUL, 2007b Dynamics of the parasite *Marteilia refrigerens* (Paramyxia) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology* (en prensa: doi:10.1017/S0031182007003009).
- CAVALIER-SMITH, T., 1993 Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* **57**: 953-994.
- COCHENNEC, N., F. LE ROUX, F. BERTHE y A. GERARD, 2000 Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.* **76**: 26-32.
- COMPS, M., J. R. BONANI, C. VAGO y A. CÁMPILLO, 1976 Une virose de l'huître Portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Paris. Série III. Sciences de la Vie.* **282**: 1991-1993.
- CULLOTY, S. C., B. NOVOA, M. PERNAS, M. LONGSHAW, M. F. MULCAHY, S. W. FEIST y A. FIGUERAS, 1991 Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Dis. Aquat. Org.* **37**: 73-80.



- DE LA HERRÁN, R., M. A. GARRIDO-RAMOS, J. I. NAVAS, C. RUIZ-REJÓN y M. RUIZ-REJÓN, 2000 Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. *Parasitology* **120**: 345-353.
- DOVER, G., 1986 Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet.* **2**: 159-165.
- DUNGAN, C. F., y K. S. REECE, 2006 In vitro propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* **53**: 316-326.
- ELSTON, R., C. A. FARLEY y M. L. KENT, 1986 Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis. Aquat. Org.* **2**: 49-54.
- ESCALANTE, A. A., y F. J. AYALA, 1995 Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**: 5793-5797.
- FARLEY, C. A., P. H. WOLF y R. ELSTON, 1988 A long-term study of «microcell» disease in oysters with a description of a new genus *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fish Bull.* **86**: 581-593.
- FIGUERAS, A. J., y J. MONTES, 1988 Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *Am. Fish Soc. Spec. Publ.* **18**: 38-46.
- FONG, D., R. RODRÍGUEZ, K. KOO, J. SUN, M. L. SOGIN, D. BUSHEK, D. T. J. LITTLEWOOD y S. E. FORD, 1993 Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Mol Mar Biol Biotechnol* **2**: 346-350.
- FRIEDMAN, C. S., 1996 Haplosporidian infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in California and Japan. *J. Shellfish Res.* **15**: 597-600.
- FRIEDMAN, C. S., T. McDOWELL, J. M. GROFF, J. T. HOLLIBAUGH, D. MANZER y R. P. HEDRICK, 1989 Presence of *Bonamia ostreae* among populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California, USA. *J. Shellfish. Res.* **8**: 133-137.
- FRIEDMAN, C. S., D. F. CLONEY, D. MANZER y R. P. HEDRICK, 1991 Haplosporidiosis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* **58**: 367-372.
- FRIEDMAN, C. S., y F. O. PERKINS, 1994 Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, USA. *J. Invertebr. Pathol.* **64**: 179-181.
- FUENTES, J., J. L. LÓPEZ, E. MOSQUERA, J. VÁZQUEZ, A. VILLALBA y G. ÁLVAREZ, 2002 Growth, mortality, pathological conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* crosses cultured in the Ría de Arousa (NW Spain). *Aquaculture* **213**: 233-251.



- GOGGIN, C. L., V. BOULO, E. MIALHE y K. COUSIN, 1991 Diagnosis of *Perkinsus atlanticus* with monoclonal antibodies and DNA probe. Eur. Aqua. Soc. Spec. Pub. **14**: 123.
- GOGGIN, C. L., y S. C. BERKER, 1993 Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. Mol. Biochem. Parasit. **60**: 65-70.
- GRIZEL, H., M. COPS, J. R. BONAMI, F. COUSSERANS, J. L. DUTHOIT y M. A. LE PENNEC, 1974 Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linnè. Bull. Inst. Pêches Marit. **240**: 7-30.
- HASKIN, H. H., L. A. STAUBER y J. A. MACKIN, 1966 *Minchinia nelsoni* n. sp. (Haplosporidia, Haplosporidiidae): causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic. Science **15**:1414-1416.
- HILLIS, D. M., y M. T. DIXON, 1991 Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q. Rev. Biol. **66**: 411-453.
- HINE, P. M., N. COCHENNEC-LAUREAU y F. C. J. BERTHE, 2001 *Bonamia exitosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea chilensis* in New Zealand. Dis. Aquat. Org. **47**: 63-72.
- HUDSON, E. B., y B. J. HILL, 1991 Impact and spread of bonamiasis in the UK. Aquaculture **93**: 279-285.
- KATKANSKY, S. C., W. A. DAHLSTROM y R. W. WARNER, 1969 Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. Calif. Fish Game. **55**: 69-74.
- KATKANSKY, S. C., y R. W. WARNER, 1970 Sporulation of a haplosporidian in a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Humboldt Bay, California. J. Fish Res. Board Can. **27**: 1320-1321.
- KAMAISHI, T., y T. YOSHINAGA, 2002 Detection of *Haplosporidium nelsoni* in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Japan. Fish Pathol. **37**: 193-195.
- LESTER, R. J. G., y G. H. G. DAVIS, 1981 A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. J. Invertebr. Pathol. **37**: 181-187.
- LEVINE, N. D., 1978 *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. J. Parasitol. **64**: 549.
- LE ROUX, F., G. LORENZO, P. PEYRET, C. AUDEMARD, A. FIGUERAS, C. VIVARÈS, M. GOUY y F. BERTHE, 2001 Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. J. Eukaryot. Microbiol. **48**: 449-454.
- LÓPEZ-FLORES, I., R. DE LA HERRÁN, M. A. GARRIDO-RAMOS, J. I. NAVAS, C. RUIZ-REJÓN y M. RUIZ-REJÓN, 2004 The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. Parasitology **129**: 411-419.



- LÓPEZ-FLORES, I., F. ROBLES, J. M. VALENCIA, A. GRAU, A. VILLALBA, R. DE LA HERRÁN, M. A. GARRIDO-RAMOS, C. RUIZ-REJÓN, M. RUIZ-REJÓN y J. I. NAVAS, 2006a Diagnosis of *Marteilia refringens* in a paraffin-embedded sample of the clam *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain) using nested-PCR and *in situ* hybridisation. Dis. Aquat. Org. (enviado para publicación).
- LÓPEZ-FLORES, I., M. A. GARRIDO-RAMOS, R. DE LA HERRÁN, C. RUIZ-REJÓN, M. RUIZ-REJÓN y J. I. NAVAS, 2006b Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor cl *Solen marginatus* by PCR and *in situ* hybridisation. Mol. Cell. Probes (enviado para publicación).
- LÓPEZ-FLORES, I., D. LONGET, D. SAULNIER, B. CHOLLET e I. ARZUL, 2007 Characterization of actin gene in *Bonamia ostreae* and its application of phylogeny of the Haplosporidia. Parasitology (en prensa, doi: 10.1017/S0031182007003307).
- LÓPEZ C., y S. DARRIBA, 2006 Presence of *Martellia* sp. (Paramyxea) in the razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777) in Galicia (NW Spain). J. Invertebr. Pathol. **92**: 97-99.
- MACKIN, J. G., 1951 Histopatology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. Bull. Mar. Sci. Gulf Carib. **1**: 72-87.
- MACKIN, J. G., 1962 Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. Publ. Int. Mar. Sci. Univ. Texas **7**: 132-229.
- MACKIN, J. G., H. M. OWEN y A. COLLIER, 1950 Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). Science **111**: 328-329.
- MACKIN, J. G., y J. L. BOSWELL, 1956 The life cycle and relationships of *Dermocystidium marinum*. Proc. Natl. Shellfish Assoc. **46**: 112-115.
- MACKIN, J. G., y S. M. RAY, 1966 The taxonomic relationships of *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. J. Invertebr. Pathol. **8**: 544-545.
- MATTHIESSEN, G. C., S. Y. FENG y L. LEIBOVITZ, 1990 Patterns of MSX (*Haplosporidium nelsoni*) infection and subsequent mortality in resistant and susceptible strains of the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) in New England. J. Shellfish Res. **9**: 359-366.
- MCA RDLE, J. F., F. MCKIERNAN, H. FOLEY y D. H. JONES, 1991 The current status of *Bonamia* disease in Ireland. Aquaculture **93**: 273-278.
- MURRELL, A., S. N. KLEEMAN, S. C. BARKER y R. J. G. LESTER, 2002. Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester y Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. **22**: 258-265.



- NAVAS, J. I., M. C. CASTILLO, P. VERA y M. RUIZ-RICO, 1992 Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S. W. Spain). *Aquaculture* **107**: 193-199.
- NAVAS, J. I., R. DE LA HERRÁN, M. GARRIDO-RAMOS, I. LÓPEZ-FLORES, M. C. QUINTERO, I. M. GARCÍA-PARDO, C. RUIZ-REJÓN y M. RUIZ-REJÓN, 2003 Aplicación del diagnóstico molecular de *Perkinsus atlanticus* para la detección del parásito en diferentes especies de almejas del litoral suratlántico y el estudio de la variabilidad intraespecífica. IX Congreso Nacional de Acuicultura, Cádiz 12-16 Mayo.
- NOVOA, B., D. POSADA y A. FIGUERAS, 2005 Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *J. Fish Dis.* **28**: 331-338.
- PAILLARD, C., 2004 A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* **17**: 467-475.
- PAILLARD, C., F. LE ROUX y J. J. BORREGO, 2004 Bacterial disease in marine bivalve, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* **17**: 477-498.
- PERKINS, F. O., 1976 Zoospores of the oyster pathogen *Dermocystidium marinum*. I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. *J. Parasitol.* **62**: 959-974.
- PICHOT, Y., M. COMPS, G. TIGÉ, H. GRIZEL y M. A. RABOUIN, 1980 Recherche sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêch Marit.* **43**: 131-140.
- POLANCO, E., J. MONTES, M. J. OUTON y M. I. MELÉNDEZ, 1984 Situation pathologique du stock d'huîtres plates en Galice (Espagne) en relation avec *Bonamia ostreae*. *Haliotis* **14**: 91-95.
- REECE, K. S., M. SIDDALL, E. BURRESON y J. E. GRAVES, 1997 Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *J. Parasitol.* **83**: 417-423.
- REECE, K., M. E. SIDDALL, N. A. STOKES y E. M. BURRESON, 2004 Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. *J. Parasitol.* **90**: 1111-1122.
- RENAULT, T. y B. NOVOA, 2004 Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat. Living Resour.* **17**: 397-409.
- ROBERT, R., M. BOREL, Y. PICHOT y G. TRUT, 1991 Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquat. Living Resour.* **4**: 265-274.



- ROBLEDO, J. A. F., V. BOULO, E. MIAHLE, B. DESPRES y A. FIGUERAS, 1994 Monoclonal antibodies against sporangia and spores of *Marteilia* sp. (Protozoa: Asctospora) Dis. Aquat. Org. **10**: 51-58.
- RODRÍGUEZ F., T. GODOY y J. I. NAVAS, 1994 Cross-infection with *Perkinsus atlanticus* in *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes phillipinarum* and *Venerupis pullastra*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. **14**: 24-27.
- ROGIER, H., D. HERVIO, V. BOULO, C. CLAVIES, E. HERVAUD, E. BACHÈRE, E. MIALHE, H. GRIZEL, B. PAU y F. PAOLUCCI, 1991 Monoclonal antibodies against *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora) Dis. Aquat. Org. **11**: 135-142.
- SALDARRIAGA, J. F., M. L. MCEWAN, N. M. FAST, F. J. TAYLOR y P. J. KEELING, 2003 Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. Internat. J. System. Evol. Microbiol. **53**: 355-365.
- SHARIFF, M., SOON, S., LEE, K. L. y L. T. TAN, 1999 Practical problems with PCR detection in Asia: The importance of standardization, p. 46 in *DNA-based molecular diagnostic techniques*, editado por P. Walker y R. Subasinghe. FAO fisheries technical papers 395.
- SIDALL, M. E., K. S. REECE, J. E. GRAVES y E. M. BURRESON, 1997 «Total evidence» refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. Parasitol. **115**: 165-176.
- SOUTHGATE, P., 1993 Disease in Aquaculture, p. 91-129 in *Aquaculture for Veterinarians: Fish Husbandry and Medicine*, editado por L. Brown. Oxford, UK: Pergamon Press Ltd.
- SPRAGUE, V., 1954 Protozoa. Fish. Bull. Fish Wildl. Serv. U.S. **89**: 243-256.
- STEPHENSON, M. F., S. E. MCGLADDERY, M. MAILLET, A. VENIOT y G. MEYER, 2003 First reported occurrence of MSX in Canada. J. Shellfish Res. **22**: 355.
- SUNILA, I., J. KAROLUS y J. VOLK, 1999 A new epizootic of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), a haplosporidian oyster parasite in Long Island Sound, Connecticut. J. Shellfish Res. **18**: 169-174.
- VILLALBA, A., S. G. MOURELLE, M. J. CARBALLAL y M. C. LÓPEZ, 1993a Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). Dis. Aquat. Organ. **17**: 205-213.
- VILLALBA, A., S. G. MOURELLE, M. C. LOPEZ, M. J. CARBALLAL y C. AZEVEDO, 1993b Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I. Etiology, phases of the infection and temporal and spatial variability in prevalence. Dis. Aquat. Organ. **16**: 61-72.
- VILLALBA, A., K. S. REECE, M. C. ORDÁS, S. M. CASAS y A. FIGUERAS, 2004 Perkinsosis in molluscs: A review. Aquat. Living Resour. **17**: 411-432.



- VIRVILIS, C., P. ANGELIDIS y G. PHOTIS, 2003 Presence of the parasite *Marteilia* sp. in the shellfish of the Thermaikos gulf in northern Greece. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. **23**: 157-161.
- VIMIER, E., 1982 Réflexions et suggestions à propos de la systématique des sporozoaires: creation d'une classes des Hematozoa. Protistology **18**: 449-457.
- WILSON, I. G., 1997 Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microb. **63**: 3741-3751.

19

HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL ANÁLISIS GENÓMICO

HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL ANÁLISIS GENÓMICO

J. A. Álvarez Dios

Universidad de Santiago de Compostela

A. Gómez Tato

Universidad de Santiago de Compostela

Resumen

La Bioinformática se ha convertido en una disciplina científica esencial en el campo genómico como consecuencia directa del aumento exponencial en la cantidad de datos disponibles. Existen muchas y buenas herramientas bioinformáticas que facilitan el trabajo diario en el laboratorio y permiten aumentar la productividad y la calidad de los datos. En este capítulo pasamos revista a algunas de ellas. Comenzamos con la descripción de las herramientas más usadas en un proyecto de secuenciación. Continuamos haciendo una pequeña revisión de bases de datos genómicos y de BLAST, la utilidad de búsqueda por autonomasia. Terminamos la primera parte con una visión rápida de los lenguajes de programación más usados en Bioinformática. La segunda parte la dedicamos al análisis de datos describiendo dos de las técnicas más fértiles: construcción de árboles filogenéticos y análisis estadístico de microarrays. En general los programas informáticos citados son de dominio público y muchos de código abierto.



Abstract

Bioinformatics has become an essential scientific discipline in the field of genomics as a direct consequence of the exponential increase of the available data quantity. There exist many fine bioinformatics tools facilitating daily work in the lab, and allowing us to increase productivity and data quality. In this chapter we survey some of them. We begin by describing the most used tools in a sequencing project. We then go on to make a brief survey of genomic databases and BLAST, the search tool par excellence. We close down the first part with a quick look at some of the programming languages most used in Bioinformatics. The second part deals with data analysis, describing two of the most fertile techniques in the field: phylogenetic tree construction and statistical analysis of microarrays. In general, the cited computed programs are in the public domain and many of them open source.

1. INTRODUCCIÓN

La emergencia de la Bioinformática y su importancia en la Genómica es una consecuencia directa del aumento exponencial en la cantidad de datos obtenidos, fundamentalmente gracias al uso de los secuenciadores automáticos.

La Bioinformática se solapa en muchos de sus objetivos y métodos con la Biología computacional y frecuentemente se confunden, pero conviene diferenciarlas. La primera se ocupa fundamentalmente de la investigación, desarrollo y uso de herramientas computacionales e informáticas en la adquisición, almacenamiento, organización y visualización de datos provenientes del campo biológico, principalmente de tipo genómico. La segunda desarrolla y aplica métodos de análisis de datos, modelización matemática y simulación en el estudio e interpretación de los datos citados anteriormente. Para ello ambas disciplinas utilizan técnicas matemáticas, estadísticas, informáticas y computacionales. A partir de ahora, en este capítulo, usaremos el término «Bioinformática» para referirnos indistintamente a ambas y dejamos al lector la tarea de discernir de cual estamos hablando en cada momento.



Comenzamos con la descripción de las herramientas más usadas en un proyecto de secuenciación ya que creemos que en los próximos años el esfuerzo investigador se dirigirá hacia la obtención de datos sobre especies de interés en Acuicultura debido a la escasez de los mismos en bases de datos de acceso público. Continuamos haciendo una pequeña revisión de las más importantes así como de BLAST, el algoritmo de búsqueda más utilizado. Terminamos la primera parte con una visión rápida de alguno de los lenguajes de programación más usados en Bioinformática ya que a pesar de la aparición continua de nuevas herramientas bioinformáticas, a menudo no es posible adaptarlas a nuestro problema particular y se hace necesaria la realización por parte de los laboratorios de herramientas a medida. Haremos mención de dos de ellas desarrolladas para el grupo de genética de peces del campus de Lugo de la Universidad de Santiago de Compostela, a las que también ha contribuido Manuel Calaza Cabanas (actualmente investigador contratado en el Complejo Hospitalario de la Universidad de Santiago de Compostela).

La segunda parte la dedicamos al análisis de datos. Describimos dos de las técnicas más utilizadas en el campo: construcción de árboles filogenéticos y análisis estadístico de microarrays.

En general los programas informáticos citados son de dominio público y muchos de código abierto. Aunque alguno de ellos, por ejemplo Bioconductor, requieren de un cierto tiempo de entrenamiento previo a su uso, creemos que las ventajas que proporcionan este tipo de programas, la rápida actualización de los mismos, y la posibilidad de acceso al código fuente, compensa el esfuerzo y el tiempo invertido en su aprendizaje.

2. HERRAMIENTAS PARA UN PROYECTO DE SECUENCIACIÓN DE TAMAÑO MEDIO-GRANDE

En primer lugar, queremos destacar que cualquier proyecto de secuenciación, sea de una librería o de una región genómica, necesita no sólo el uso de herramientas bioinformáticas sino también que las tareas que éstas realicen sean automatizadas en conformidad a un protocolo establecido, entre otras, por las siguientes razones:



- 1) La automatización permite que los datos de diferentes laboratorios que participan en el proyecto sean tratados de igual forma.
- 2) La automatización es conveniente para evitar la aparición de errores aleatorios en el procesamiento de los datos que imposibiliten o dificulten los análisis posteriores.

Para ello es necesario planificar previamente el proceso desde el punto de vista bioinformático para escoger las herramientas existentes adecuadas, realizar los guiones (scripts) de automatización y desarrollar, si hace falta, las herramientas complementarias no existentes. También es interesante que los resultados obtenidos estén a disposición de todos los miembros de los equipos participantes para su posterior análisis. Por ello la realización de una base de datos anotados es el paso final lógico en un proyecto de cierta envergadura.

El esquema de la Figura 1 muestra las sucesivas etapas que se suelen seguir en un proyecto de secuenciación. Describiremos alguna de las herramientas bioinformáticas que se usan en cada una de ellas.

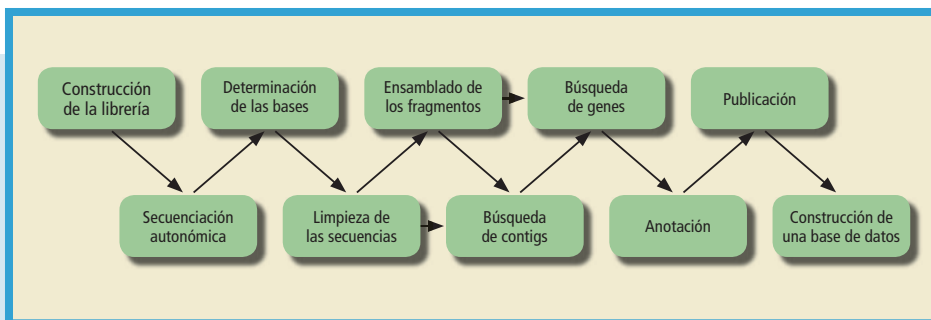


FIGURA 1.
Esquema de un proyecto de secuenciación.

3. DETERMINACIÓN DE LAS BASES. USO DE PHRED

La mayor parte de las secuenciaciones se hacen actualmente siguiendo el método de Sanger de terminación de cadena mediante el uso de didesoxinucleótidos marcados. Después de un análisis de la imagen



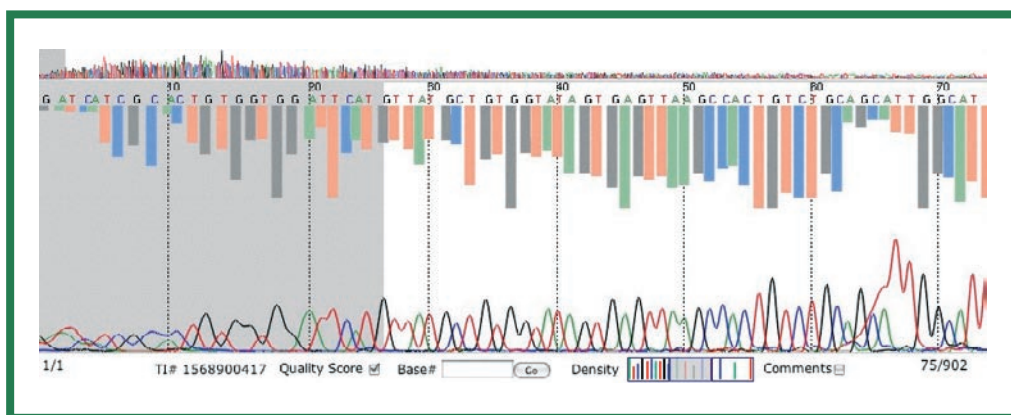
obtenida en el proceso de electroforesis, y mediante el uso sofisticados algoritmos matemáticos, el secuenciador determina las trazas y proporciona un archivo «Trace file» en alguno de los formatos existentes, tales como ABI –Applied Biosystems Format–, ALF –Pharmacia Format–, CTF –Compact Trace Format–, SCF –Std Chromatogram Format–, ZTR –Compressed Trace Format– aunque los más usados son el ABI y SCF. Estos archivos de traza se visualizan habitualmente en la forma de un cromatograma, que consiste en cuatro curvas de diferentes colores que representan la señal emitida por los diferentes terminadores marcados en su proceso de migración en el gel, tanto más a la derecha cuanto más largo sea el fragmento correspondiente.

Tanto el NCBI como Ensembl tienen bases de datos de trazas, generalmente asociadas a los grandes proyectos de secuenciación, y ofrecen un visualizador web de las mismas (Figura 2). Para el trabajo diario, podemos recurrir a alguno de los numerosos programas de visualización de cromatogramas, valgan como ejemplo **Trev** en Unix y Windows o **4peaks** en MacOS X (Figura 3).

El proceso para determinar la secuencia obtenida a partir de las trazas procesadas se denomina «Base calling». Generalmente el software del secuenciador tiene incorporado un programa de este tipo. Sin embargo el programa PHRED (Edwing et al. 1998) se ha constituido en el estándar de facto. Su algoritmo consta de cuatro etapas:

FIGURA 2.

Muestra de la visualización de una traza en la página web del NCBI.





- 1) Determina la localización ideal de los picos usando análisis de Fourier.
- 2) Determina los picos observados en función de la convexidad de la traza y el área baja ella.
- 3) Empareja los picos predichos con los observados.
- 4) Refina el paso anterior, intentando determinar los picos predichos pero no observados.

Además, PHRED proporciona un índice de calidad de cada una de las bases lo que es esencial en los procesos posteriores de ensamblado y determinación de los llamados contigs.

3.1. Índices de calidad PHRED

Para cada una de las bases determinadas se calcula una probabilidad de error p . El índice de calidad q de una base será:

$$q = -10 \times \log_{10} (p)$$

Por ejemplo, una base con probabilidad 0,001 de ser incorrecta tiene asignado un índice de calidad de 30. Es decir, a mayor índice de calidad menor probabilidad de ser incorrecta. Dicha probabilidad viene determinada por varios parámetros que PHRED calcula examinando la traza en el entorno de cada base. Los parámetros están relacionados con la distancia entre los picos, la resolución, y la relación entre los picos determinados y no determinados.

4. LIMPIEZA DE SECUENCIAS

Antes de proceder al ensamblado y/o a la determinación de contigs, se necesita limpiar las secuencias para eliminar los restos de vector y la posible contaminación de las mismas. Una secuencia contaminada es aquella que no representa fielmente la información genética de la fuente biológica ya que contiene uno o más segmentos de origen foráneo. Las fuentes de contaminación pueden ser inherentes al protocolo (vectores, adaptadores, cebadores, etc.) o inesperadas al haberse añadido transposones o trozos de secuencia del huésped de clonado (generalmente *Escherichia coli* o levadura) o que la muestra contenga impurezas.

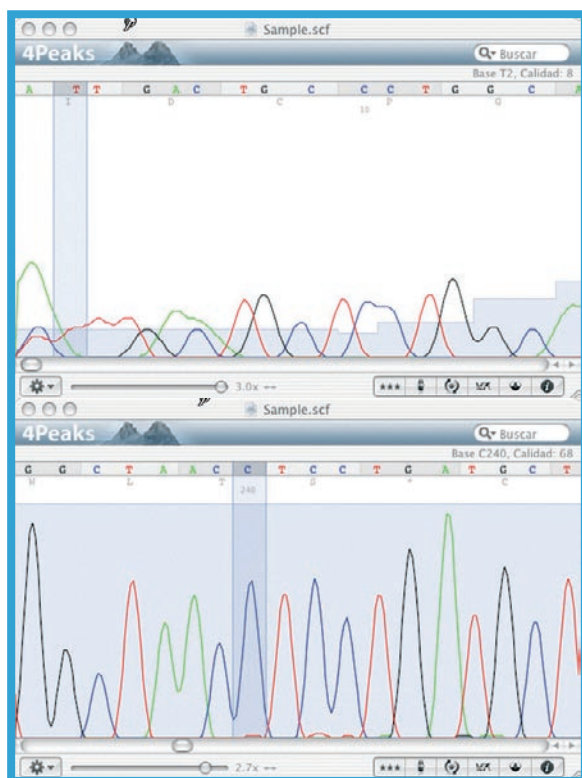


FIGURA 3.

En las imágenes se puede ver el cromatograma de dos regiones de la misma secuencia visualizados con 4peaks. La primera muestra una región de muy baja calidad y la segunda la región central de una calidad muy alta, en torno a 68, es decir una probabilidad inferior a 0,000001 de ser incorrecta.

VecScreen (Figura 4) es un sistema accesible en la [www](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/) para la búsqueda y eliminación de contaminantes en secuencias disponible en el NCBI. La estrategia que sigue es hacer una búsqueda BLAST (ver explicación más adelante) de la secuencia sobre bases de datos especializadas (UniVec) que contienen información sobre los vectores, adaptadores, linkers y cebadores más usados. Para el resto de los posibles contaminantes, se sigue la misma estrategia, pero usando las bases de datos con la información específica, por ejemplo secuencias mitocondriales, de levaduras y *Escherichia coli*.

Si se quiere automatizar el proceso de manera local, se puede recurrir a programas como Lucy (Chou *et al.* 2001) o cross_match [<http://www.phrap.org>], pero en proyectos de tamaño mediano o grande es conveniente plantearse la posibilidad de desarrollar una herramienta

bioinformática a medida. Ver por ejemplo la descrita en Pardo B. G. *et al.* (2007).

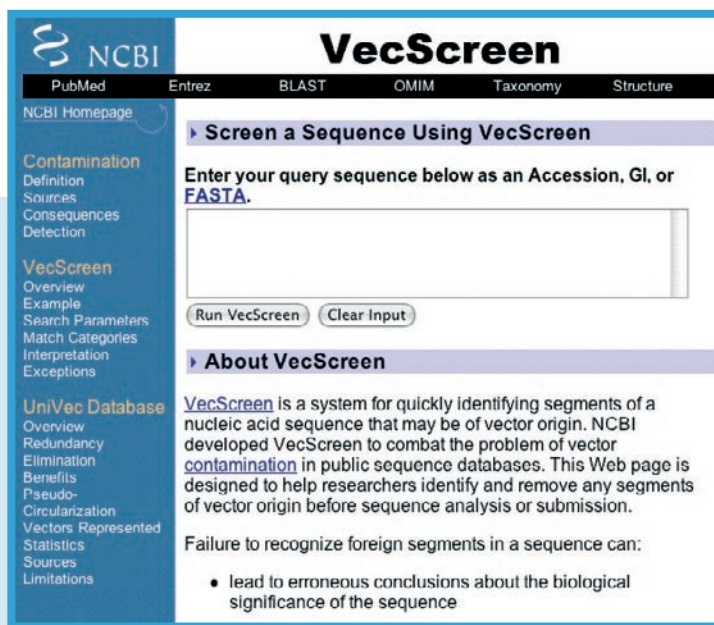


Figura 4.

Visión de la página web de entrada de VecScreen
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)

5. ENSAMBLADO Y BÚSQUEDA DE CONTIGS

Después del paso esencial de limpieza llega el momento de, según sea el objetivo del proyecto, ensamblar o determinar los contigs y las secuencias consenso de cada uno de ellos. El ensamblado es un procedimiento computacionalmente costoso, sobre todo en términos de memoria RAM requerida, y con poca fiabilidad si aparecen regiones repetidas. Generalmente es la parte de la secuenciación que más tiempo requiere ya que necesita de posteriores comprobaciones y tareas muy especializadas hasta obtener la secuencia final. Existen varios ensambladores a disposición de los investigadores, entre otros



citaremos PHRAP, AMOS, CAP3, TIGR Assembler y el Whole-genome Assembler usado por Celera. Para los lectores interesados les recomendamos el trabajo de revisión de Venter (Venter 2003) como punto de partida. La determinación de los contigs no conlleva tanta dificultad técnica y se puede realizar a partir de los resultados obtenidos con PHRED usando el programa PHRAP (ver un ejemplo en la Figura 5).

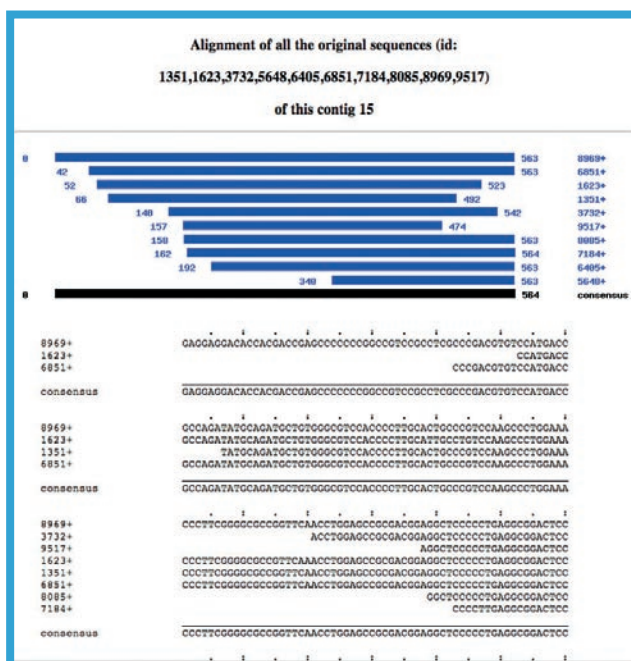


FIGURA 5.

En la imagen se muestra una presentación HTML de un contig obtenido con CAP3 en el proyecto de construcción de una genoteca de rodaballo en el que colaboramos con el grupo de Genética de Peces de Lugo.

Finalizado el proceso de adquisición de datos, entramos en la fase de anotación. En ella se compara lo obtenido en el laboratorio con lo ya conocido para observar homologías y deducir su posible función o funciones. Hay dos tipos de herramientas fundamentales, las de alineamiento y las de búsqueda rápida en bases de datos.

6. ALINEAMIENTOS

En Bioinformática, un alineamiento de secuencias es una manera de ordenar dos secuencias biológicas de ADN, ARN o proteína para identi-

ficar regiones de similitud que puedan ser consecuencia de una relación funcional, estructural o evolutiva entre ambas. Si dos secuencias tienen un ancestro común, los fallos en el alineamiento pueden interpretarse como mutaciones puntuales, y los huecos como inserciones/deleciones, introducidos en el momento en que las especies empezaron a diferir. Si alineamos proteínas, el grado de similitud entre los aminoácidos que ocupan una posición particular puede interpretarse como una medida de lo bien conservada que está una región. La ausencia de sustituciones sugiere que la región tiene importancia estructural o funcional.

Un alineamiento se representa en forma gráfica (Figura 6) o en forma de texto (Figuras 7 y 8). La forma gráfica utiliza un código de colores para indicar la similitud de los nucleótidos o proteínas alineados, y la forma de texto a menudo está inspirada en alguno de los programas de alineamiento. Esta última forma es más susceptible de tratamiento automatizado mediante un lenguaje de programación bioinformático. Formatos clásicos de entrada son FASTA y GenBank; formatos clásicos de salida son Clustal y Phylip.

6.1. Algoritmos de alineamiento

Las secuencias muy cortas o muy similares son fáciles de alinear a mano; sin embargo, muchos problemas prácticos requieren el alineamiento de secuencias largas y con mucha variación, o bien el alineamiento simultáneo de muchas secuencias. Entonces se hace precisa la construcción de algoritmos que produzcan dichos alineamientos. Se dividen en dos grandes grupos: algoritmos globales, que intentan optimizar un alineamiento que recorra todas las secuencias, y algoritmos locales, que identifican regiones de similitud contenidas en secuencias largas que en conjunto son más divergentes. Es entonces crucial elegir un método adecuado basado en la complejidad de las secuencias, su longitud y el tipo de alineamiento esperado, teniendo en cuenta que si las secuencias son cortas y muy similares no habrá una gran diferencia en el resultado. El proceso puede fácilmente complicarse por su dificultad computacional y grandes tiempos de cálculo.

Los algoritmos clásicos de alineamiento son el de Needleman-Wunsch (global) y el de Smith-Waterman (local). Ambos son de programación dinámica, y buscan minimizar una cierta función de puntuación.



En la práctica pueden usarse individualmente, conjuntamente en un algoritmo híbrido, o combinados con algún tipo de heurística para agilizar el proceso en el ordenador.

La característica común de los algoritmos de programación dinámica en proteínas es el uso de una matriz de sustituciones (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/matrices/>) que asigna puntuaciones positivas a aciertos (aminoácidos semejantes) y negativas a fallos (aminoácidos no compatibles), y una penalización por emparejar un aminoácido y un hueco. Las matrices de puntuaciones se clasifican en dos grandes grupos: matrices PAM (Point Accepted Mutation, calculables en <http://www.bioinformatics.nl/tools/pam.html>), que funcionan bien para secuencias muy próximas o evolucionadas durante poco tiempo, y matrices BLOSSUM (Block Substitution Matrix) que funcionan bien para secuencias muy distantes en el tiempo. Típicos ejemplos de uso son:

- a) Alinear dos secuencias muy relacionadas: BLOSUM62 (la más usual), BLOSUM80 (cuanto más alto el número más relación) o bien PAM70, PAM30 (aún más relacionadas, cuanto más bajo el número más relación).
- b) Alinear dos secuencias poco relacionadas: BLOSUM45, PAM250.

En el caso de ADN y ARN se suele asignar simplemente una puntuación positiva al acierto, una negativa al fallo, y otra negativa al hueco. El número de implementaciones prácticas de algoritmos de alineamiento es alto (ver http://en.wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software para una panorámica). A continuación presentamos algunos de los programas más utilizados:

- a) ClustalW es el programa más prominente de alineamiento, cuyo algoritmo tiene dos pasos: primero se construye un árbol basado en la similitud de secuencias, y a continuación se alinean dos a dos las secuencias según aparecen en el árbol. Tiene una versión paralela que puede acelerar el alineamiento en ordenadores con múltiples procesadores.
- b) Dialign es un algoritmo local que alinea segmentos enteros inicialmente hasta encontrar un conjunto consistente de segmentos alineados. También dispone de una versión paralela.

c) T-coffee combina alineamientos locales y globales de segmentos enteros para intentar encontrar un alineamiento óptimo entre los posibles.

A continuación ponemos ejemplos de las salidas de cada uno de estos tres programas.

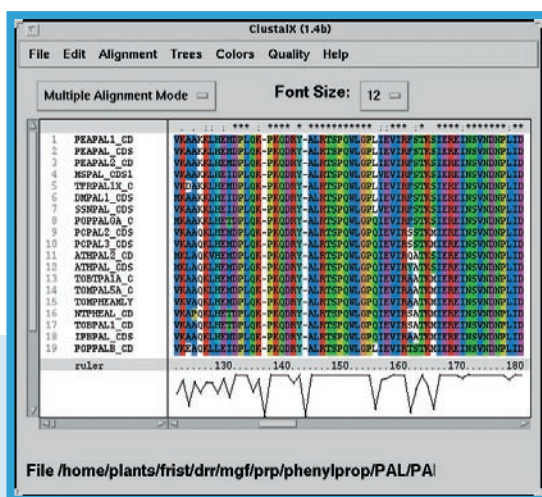


FIGURA 6.

Pantalla que muestra un alineamiento hecho con Clustal X, un interfaz gráfico para Clustal W.

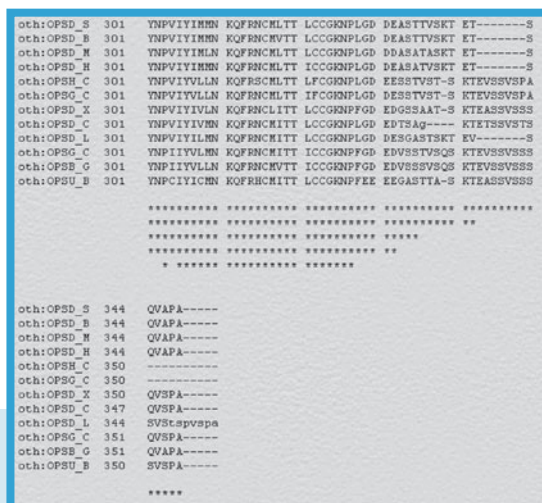


FIGURA 7.

Salida de Dialign.



```

T-COFFEE, Version 1.37(Wed Jul 11 14:38:06 PDT 2001)
Notredame, Higgins, Heringa, JMB (302) pp205-217, 2000
CPU TIME:103 sec.
SCORE=73
*
  BAD AVG GOOD
*
oth OPSD SHEEP      : 74
oth OPSD BOVIN      : 74
oth OPSD MOUSE      : 74
oth OPSD HUMAN      : 74
oth OPSM CARAU      : 71
oth OPSG CARAU      : 72
oth OPSD XENLA      : 74
oth OPSD CHICK      : 74
oth OPSD LAMJA      : 74
oth OPSG CHICK      : 72
oth OPSB GECGE      : 72
oth OPSU BRARE      : 73

oth OPSD SHEEP      VAFYIFTHQGSDFGPIFMTIPAFFAKSSSYNPIYIMNHKQFRNCHITTLCCG
oth OPSD BOVIN      VAFYIFTHQGSDFGPIFMTIPAFFAKTSAVYNPIYIMNHKQFRNCHVITLCCG
oth OPSD MOUSE      VAFYIFTHQGSNFGPIFMTIPAFFAKSSSYNPIYIMLNKQFRNCHITLCCG
oth OPSD HUMAN      VAFYIFTHQGSNFGPIFMTIPAFFAKSAIYNPIYIMNHKQFRNCHITLCCG
oth OPSM CARAU      VAAWIFFNKGAAPSAQFMAIPAFFSKTSALYNPIYIVLLNKQFRSCHITLFCG
oth OPSG CARAU      VAAWIFFNKGAAPSAQFMAIPAFFSKTSALYNPIYIVLLNKQFRSCHITLFCG
oth OPSD XENLA      VAFYIFTHQGSNFGPIFMTIPAFFAKSSAIYNPIYIVLNKQFRNCHITLCCG
oth OPSD CHICK      VAFYIFTHQGSDFGPIFMTIPAFFAKSSAIYNPIYIVLNKQFRNCHITLCCG
oth OPSD LAMJA      VAFYIFTHQGSDFGATFMTIPAFFAKSSAIYNPIYIVLNKQFRNCHITLCCG
oth OPSG CHICK      VAFWIFNKGADEFTATLHMAVPAFFSKSSLYNPIYIVLNKQFRNCHITLCCG
oth OPSB GECGE      TAIWIFINRGAAPSVTMTIPAFFSKSSSYNPIYIVLLNKQFRNCHVITLCCG
oth OPSU BRARE      VAWYIFTHQGSDFGPIFMTIPAFFAKTSAVYNPCYICMNHKQFRNCHITLCCG

Cons                * 1** 1:1* 1* 1*1:1***1*:1:12*** **1:1***** *:1**1 **

oth OPSD SHEEP      KNPLGDDEAST-----TVSKTETSQVAPA
oth OPSD BOVIN      KNPLGDDEAST-----TVSKTETSQVAPA
oth OPSD MOUSE      KNPLGDDDASA-----TASKTETSQVAPA
oth OPSD HUMAN      KNPLGDDEASA-----TVSKTETSQVAPA
oth OPSM CARAU      KNPLGDEE--SSTVSTSKTEVSSVS-----PA
oth OPSG CARAU      KNPLGDEE--SSTVSTSKTEVSSVS-----PA
oth OPSD XENLA      KNPFGEDEGSS--AATSKTEASSVSSSQVSPA
oth OPSD CHICK      KNPLGDEDTSA-----GKTETSSVSTSQVSPA
oth OPSD LAMJA      KNPLGDDESG--ASTSKTEVSSVSTSPVSPA
oth OPSG CHICK      KNPFGEDEVSSSTVSKTEVSSVSSSQVSPA
oth OPSB GECGE      KNPFGEDEVSSVSSQSKTEVSSVSSSQVSPA
oth OPSU BRARE      KNPFEEEEGAS--TASKTETASSVSSSQVSPA

Cons                ***: ::: . . . . . * . . . . **

```

FIGURA 8.
Salida de T-coffee.

Antes de presentar los algoritmos para la búsqueda rápida en bases de datos, pasaremos revista a alguna de las más conocidas y utilizadas.

7. BASES DE DATOS BIOINFORMÁTICAS

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), con base en la Biblioteca Nacional de Medicina del Instituto Nacional para la Salud de EE.UU., da soporte a muchas bases de datos empleadas por profesionales de la investigación biomédica. Los servicios incluyen, entre otros, PubMed, la base de datos bibliográfica; GenBank, la base de datos de nucleótidos;



UniGene, la base de datos de genes, y el algoritmo BLAST para comparar secuencias (que será objeto de un apartado posterior). La página web del NCBI es visitada diariamente por cientos de miles de personas.

GenBank y sus entidades colaboradoras (el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) y el banco de datos de ADN de Japón (DDBJ)) recibe secuencias de investigadores a lo largo de todo el mundo de más de 100.000 organismos distintos. GenBank continúa creciendo a un ritmo exponencial doblandose el número de registros cada 10 meses. Ante esta situación, son más que necesarias establecer buenas estrategias de búsqueda para encontrar la aguja en un pajar que se hace más y más grande.

7.1. ¿Qué es Entrez?

La web del NCBI contiene un sistema de búsqueda integrado y cruzado de sus bases de datos, y las bases de datos similares de Europa y Japón con las que tiene un acuerdo para intercambiar información, conocido como Entrez. Es accesible desde el URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>. Es al mismo tiempo un sistema de indexado y recuperación de la información, una recolección de datos de muchos orígenes y un principio de organización de la información biomédica. Constituye más que un simple portal de búsquedas porque permite tanto búsquedas simultáneas en todas las bases de datos como búsquedas selectivas en una de las bases de datos.

7.2. Búsquedas de secuencias de nucleótidos con Entrez

Empezamos seleccionando esta base de datos e introduciendo el patrón de búsqueda en la casilla superior. En dicho patrón pueden incluirse operadores booleanos como AND, OR, NOT; e identificadores como [GENE] [ORG] [PROT] [TITL] que sirven para buscar en un campo de nombre determinado. Combinando operadores e identificadores se pueden plantear preguntas a una base de datos como HFE[GENE] AND human[ORG]. Si hemos seleccionado «Nucleotide» en el menú search, estamos buscando en la base de datos de nucleótidos (GenBank) el texto HFE en el campo de genes y solamente en humanos. Las búsquedas que realiza Entrez son siempre buscando exactamente



el texto introducido como parte del texto almacenado en el campo especificado en el correspondiente registro de la base de datos.

Podemos refinar aún más la búsqueda utilizando el enlace «Limits» ubicado bajo el campo de búsquedas. Fundamentalmente, podemos limitar la búsqueda sobre un tipo determinado de molécula (ADN genómico, mensajero o de ribosoma), y sobre la bases de datos (desde solamente secuencias de referencia hasta todo el GenBank o Protein Data Bank).

Sobre si es mejor o peor hacer búsquedas muy refinadas, cumple la siguiente reflexión: si hacemos la anterior búsqueda HFE[GENE] AND human[ORG] limitada a mRNA y RefSeq, obtenemos en el momento actual once registros (estos resultados son variables con el tiempo). Pero si hacemos la misma búsqueda sin limitarla, obtendremos más de 100 resultados.

7.3. Descripción de un registro de GenBank

Una vez hemos efectuado la búsqueda y obtenido algún registro de nuestro interés, veamos cómo interpretar dicha información. Haciendo clic en el ID (identificador) del registro, obtendremos una nueva página donde veremos el registro completo como archivo de texto. Está estructurado de la forma siguiente:

Un encabezamiento que incluye:

- 1) El campo Locus, que contiene los siguientes subcampos: nombre del locus, longitud de la secuencia en bases o pares de bases, tipo de molécula (ADN, RNA, etc.), división de GenBank (primate, roedor, planta, etc.), última fecha de modificación.
- 2) El campo Definición, que contiene una breve descripción de la secuencia, y que suele incluir el nombre del organismo, el gen, la proteína, etc.
- 3) Un único identificador (accession) formado por una combinación de una letra y cinco números normalmente, o dos letras y seis números (p. ej. AC123456). Aunque el registro sea modificado, este identificador permanece invariable.
- 4) Versión, si ha habido cambios en la secuencia desde que fue introducida por primera vez, se añade un identificador de versión, del estilo AC123456.1 en el ejemplo anterior.



- 5) El campo denominado GI contiene otro identificador para el registro que cambia cada vez que se hace alguna modificación en la secuencia almacenada en la base de datos.
- 6) Después de toda esta serie de identificadores del registro de la secuencia, se incluyen en el campo keywords palabras clave o frases cortas que puedan ser útiles para su localización a través de algún sistema de búsquedas como Entrez.
- 7) A continuación viene una abreviatura o el nombre común (en inglés) del nombre del organismo que se ha secuenciado.
- 8) En el campo organismo encontraremos el nombre científico formal y su linaje filogenético.
- 9) En el campo referencia, encontraremos citas a publicaciones científicas relativas a la secuencia y sus anotaciones, incluidos los enlaces a las referencias MEDLINE.

A continuación viene el cuerpo central del registro, que consta de una serie de anotaciones que describen una parte de la secuencia y finalmente la secuencia. Cada anotación consta de una localización (un intervalo en la secuencia) y uno o varios descriptores (organismo, gen, tipo de molécula,...). Al hacer clic en el nombre de la anotación se abre una ventana con el trozo de la secuencia al que se refiere la anotación. Las anotaciones más importantes son:

- 1) Source es una anotación obligatoria en todas las secuencias. Incluye la información de longitud de la secuencia, el nombre específico del organismo y el número de identificación taxonómica. Puede incluir otras informaciones como número de cromosoma,...
- 2) Exon delimita el trozo de secuencia que contiene un exón así como sus posibles partes no codificantes (5' UTR y 3' UTR). Incluye la información del gen al que pertenece y un número de exón.
- 3) Gene describe una parte de la secuencia que codifica un determinado producto funcional.
- 4) CDS describe la secuencia que codifica los aminoácidos de una proteína. El CDS comienza con el primer nucleótido del codón de START y termina con el último nucleótido del codón de STOP.



Incluye la secuencia de aminoácidos ya traducida y puede incluir también el nombre del gen, la función del producto del gen, un enlace al registro de la proteína codificada,...

- 5) Intron determina un segmento de secuencia no codificante que es eliminada en la transcripción.

Finalmente, el número de bases y el campo origen que contiene la secuencia propiamente dicha.

7.4. Opciones de visualización de un registro de GenBank

Acabamos de describir la presentación por defecto del resultado de una búsqueda. Otros formatos alternativos son posibles, entre ellos los orientados a servir como entrada para otros programas de ordenador. Cabe destacar los siguientes: XML, GBSeg XML, TinySeq XML, ASN.1 y FASTA. También podemos describir los datos con un formato gráfico que nos permite visualizar la secuencia y toda la anotación génica que contiene el registro.

7.5. Búsquedas en PubMed

PubMed es un sistema de búsqueda de referencias bibliográficas diseñado por el NCBI. Hay tres tipos de registros: Premedline, Medline, y citas electrónicas proporcionadas por los editores (que acabarán convirtiéndose en registros Medline). Se cubren los temas de medicina, enfermería, veterinaria, ciencias preclínicas y odontología, aproximadamente 4.000 publicaciones en este momento, actualizadas semanalmente. En la búsqueda podemos utilizar operadores booleanos, comodines (*), comillas para delimitar frases, y restricciones de fecha u organismo a semejanza de las búsquedas en GenBank con Entrez que acabamos de ver. Una vez realizada la búsqueda, los resultados pueden ser copiados al portapapeles para su posterior pegado en alguna aplicación informática. Para ello, se señalan las casillas correspondientes a los registros deseados, se elige «clipboard» en el menú desplegable a la derecha del botón «send to», y se hace clic en dicho botón. Para ver el portapapeles, se hace clic en el enlace de la barra denominado «Clipboard».



7.6. Gene: búsqueda de secuencias para un gen

Entrez Gene proporciona una visión de los datos desde el punto de vista de los genes de un amplio rango de genomas. Proporciona información de los datos sobre mapas, secuencias, expresión, estructura, función, y homología. La información mínima contenida en un registro de un gen contiene un identificador (GeneID) asignado por el NCBI, un símbolo que representa al gen, e información sobre alguna secuencia o mapa relativo al gen. Además puede incluirse información sobre la expresión, estructura, función y homología si están disponibles. Entrez Gene incluye datos de todos los organismos que disponen de secuencias RefSeq, y puede también incluir datos de otras bases de datos (de solvencia reconocida) que proporcionen información sobre genes o fenotipos. Entrez Gene puede considerarse el sucesor de LocusLink.

La mecánica de búsqueda es similar a la que ya hemos visto para Entrez, donde podemos delimitar una serie de campos con unos operadores lógicos, además de poder establecer unos límites a la búsqueda restrictivos a través del enlace «Limits». Podemos plantear preguntas tan complejas como `arabidopsis thaliana[orgn] AND 3[chr] AND gene-homologene[filter]` que se corresponde a encuentra genes de *Arabidopsis thaliana* localizados en el cromosoma 3 que tienen un ortólogo en HomoloGene.

7.7. Búsquedas en OMIM

OMIM (acrónimo de Online Mendelian Inheritance in Man) es un compendio de material bibliográfico y observaciones de enfermedades hereditarias y genes humanos. Es una continuación de MIM (acrónimo de Mendelian Inheritance in Man). OMIM proporciona gratuita y consentidamente textos sobre enfermedades genéticas y localización de genes que pueden ser de utilidad para médicos clínicos, investigadores, estudiantes y educadores.

Cada registro de OMIM resume la investigación científica relacionada con un gen, enfermedad o rasgo particular. Los registros de OMIM enlazan con las citas y resúmenes de las fuentes de esta investigación. Si están disponibles, OMIM proporciona enlaces a otros registros relacionados de las bases de datos del NCBI.



Gene Map (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/getmap.cgi>) es una de las tres alternativas disponibles para acceder a los registros de OMIM. Con Gene Map, los usuarios pueden navegar por una tabla de genes organizada como un mapa de localizaciones citogenéticas empezando por el telómero p del cromosoma 1, continuando hacia el telómero q del cromosoma 22, y finalizando con los genes desde el telómero p de X hasta el telómero q de Y. Gene Map debe utilizarse si tenemos interés en apreciar el orden de los genes en cada cromosoma. Es un formato sencillo para apreciar que genes preceden y siguen a otro dado. Cada entrada de Gene Map nos enlaza al registro de OMIM para un gen particular.

Morbid Map (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/getmorbid.cgi>) es una tabla de todas las enfermedades genéticas caracterizadas en OMIM. Con Morbid Map podemos navegar por una lista alfabética de las enfermedades humanas. Encontraremos símbolos de los genes asociados con esa enfermedad, la localización citogenética de cada uno de ellos y enlaces a los registros de OMIM.

Además de estas búsquedas «indirectas» en OMIM, también podemos hacer una búsqueda directa utilizando el motor de Entrez empleando los operadores lógicos, como ya hemos visto anteriormente, y campos y delimitadores específicos para crear consultas elaboradas que nos proporcionen resultados manejables. Por ejemplo, con `hemochromatosis[TI] AND 6[CHR]` estamos pidiendo todos los registros de OMIM que contengan la palabra hemochromatosis en el campo título y el número 6 en el campo cromosoma. A través del enlace Limits podemos establecer límites en la búsqueda y acceso a la lista completa de delimitadores de los campos de los registros. Una vez realizada una búsqueda, haciendo clic sobre el enlace correspondiente accedemos al registro OMIM completo.

7.8. Búsquedas en dbSNP

La base de datos dbSNP de polimorfismos de nucleótido simple (Single Nucleotide Polymorphisms, o SNPs) es un archivo de dominio público que contiene una extensa colección de SNPs. Esta colección de polimorfismos incluye sustituciones de nucleótidos de una sola base (SNPs), deleciones e inserciones multibase (Deletion Insertion Polymor-



phisms, o DIPs), e inserciones de elementos y variaciones repetidas de microsatélites (también llamadas short tandem repeats o STRs). Cada registro de dbSNP incluye el contexto de la secuencia del polimorfismo, es decir, la secuencia que lo rodea, la frecuencia con la que ocurre el polimorfismo (por población o individuo), y los métodos experimentales, protocolos y condiciones que se han usado para experimentar con la variación. La base de datos acepta aportaciones a las variaciones de cualquier especie y de cualquier parte del genoma.

La base de datos dbSNP puede ser consultada desde la URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> utilizando la caja de búsqueda para acceder a Entrez SNP o recurriendo a los 8 tipos de opciones de búsqueda de los que disponemos en una barra de enlaces situada un poco más abajo de la caja general de consulta.

7.9. El proyecto Gene Ontology (GO)

El proyecto GO (<http://www.geneontology.org/>) puede dividirse en dos partes:

- a) la primera es la ontología, es decir, un vocabulario controlado y estandarizado para describir la función molecular de los genes, su papel en procesos biológicos multipaso, y su localización en componentes celulares. Cada término tiene un identificador alfanumérico, nombre común, sinónimos si los hubiera, y una definición.
- b) la segunda es la anotación, es decir, la caracterización de productos de genes usando términos de la ontología.

7.10. La base de datos de rutas KEGG

El proyecto Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) busca representar en el ordenador redes de interacciones moleculares en las células, y variantes de ellas específicas a organismos particulares.

ExPASy

ExPASy (Expert Protein Analysis System) (<http://www.expasy.ch/>) es una base de datos del Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) dedicada al análisis de secuencias de proteínas, su estructura, y 2-D electroforesis.



7.11. Búsqueda de homologías: BLAST

La comparación de secuencias para tratar de adivinar la función de una proteína mediante comparación de una base de datos de proteínas anotadas es la primera gran herramienta de uso masivo de la Biología computacional. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) es un algoritmo para comparar la información primaria de secuencias biológicas, tal como las secuencias de aminoácidos de diferentes proteínas o los nucleótidos de secuencias de ADN. Una búsqueda BLAST habilita al investigador para comparar una secuencia patrón con una librería o base de datos de secuencias, e identificar las secuencias de la librería que se parecen a la secuencia patrón por encima de un cierto umbral de exactitud. Por ejemplo, después del descubrimiento de un gen en el ratón, un científico podría hacer una búsqueda con BLAST en el genoma humano para saber si los humanos tienen un gen similar. BLAST logra encontrar los resultados con gran velocidad, lo que es crucial en bases de datos cuyo tamaño crece exponencialmente.

El algoritmo original de BLAST fue desarrollado por Stephen Altschul, Warren Gish, y David Lipman en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) de EE.UU., Webb Miller de la Pennsylvania State University, y Gene Myers de la Universidad de Arizona.

Para hacerlo más veloz que el algoritmo clásico de alineamiento de Smith-Waterman, BLAST usa un enfoque heurístico que es ligeramente más inexacto que aquél, pero más de 50 veces más rápido. Conceptualmente, el algoritmo se divide en tres etapas:

- a) En la primera, el algoritmo busca de manera exacta trozos de longitud fija (parámetro W , longitud de palabra) entre la secuencia patrón y las de la base de datos.
- b) En la segunda, BLAST intenta extender el alineamiento en ambas direcciones de acuerdo a un esquema de puntuación que hace puntuar positivamente aciertos o cuasiaciertos, y puntuar negativamente fallos.
- c) En la tercera, BLAST utiliza una variante del algoritmo de Smith-Waterman para alinear la secuencia patrón con la secuencia de la base de datos.



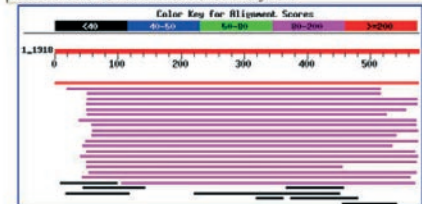
Además de W, debemos fijar también un parámetro llamado E que permite limitar el número de respuestas que da el algoritmo. Otros parámetros permiten fijar organismo, filtrar resultados de baja complejidad, etc.

FIGURA 9.

Página web del Blast de proteínas en el NCBI.

Distribution of 28 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores. Click to show alignments



Sequences producing significant alignments:

	Score	E Value
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein CC0100 [C...	10.00
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein BrwAb1_17...	1.51
g1143143881ref1NP_418919.1	conserved hypothetical protein [...]	1.02
g1143143881ref1NP_418919.1	conserved hypothetical protein [...]	1.51
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein h1c0580 [...]	1.50
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein PF40029 [...]	1.50
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein IGR_C_511...	1.49
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein MIMC030...	1.48
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein MIMC030...	1.48
g1143143881ref1NP_418919.1	conserved hypothetical protein [...]	1.47
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein MIMC030...	1.46
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein MIMC030...	1.45
g1143143881ref1NP_418919.1	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN [...]	1.44
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein BQ12880 [...]	1.43
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein BQ12880 [...]	1.42
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein BQ12880 [...]	1.41
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein BQ12880 [...]	1.40
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein BQ12880 [...]	1.39
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein BQ12880 [...]	1.38
g1143143881ref1NP_418919.1	hypothetical protein BQ12880 [...]	1.37
g1143143881ref1NP_418919.1	putative transposase [Coryneb...	0.34
g1143143881ref1NP_418919.1	C000452: Phosphatase/kinase...	1.7

α -proteobacteria

FIGURA 10.

Resultado de una búsqueda de BLAST.



La estructura básica del resultado de una búsqueda BLAST (ver Figura 10) tiene cinco partes fundamentales:

- a) Cabecera: En ella aparece el nombre del programa, versión, cita del origen del programa.
- b) Gráfica: Vista gráfica de todos los alineamientos que exceden el E-valor (igual a 10 por defecto) fijado, con enlaces a las cadenas encontradas.
- c) Resúmenes de una línea: Nombre de la secuencia, alineamiento de mayor puntuación y el E-valor más bajo. Cuanto mayor la puntuación y menor el E-valor, tanto mejor es el alinamiento. Si queremos más resultados debemos bajar el E-valor por defecto.
- d) Alineamientos: La mayoría del texto. Hay diferencias según el tipo de búsqueda: si se buscan nucleótidos dice el sentido de las hebras de búsqueda y encontradas (plus/plus, plus/minus, etc.). Si encontramos un texto del estilo «Expect(n)» donde n es un número, tenemos un alineamiento agrupado.
- e) Pie: Resumen estadístico de la búsqueda.

Es posible instalar BLAST en un ordenador local para hacer búsquedas. El interés puede residir en que si estamos solamente interesados en un trozo de la base de datos, o si tenemos espacio suficiente para almacenarla localmente, las búsquedas serán mucho más rápidas y tenemos también la posibilidad de automatizarlas usando Perl. Además, si nuestro ordenador dispone de varios procesadores, podemos sacar provecho de ellos.

Además de BLAST de NCBI, existe otra variación del algoritmo original llamada WU-BLAST, desarrollada en la Universidad de Washington. También es de interés mencionar BLAT (extremadamente rápida pero mucho menos sensitiva) y BLASTZ (para comparar varios genomas grandes o cromosomas) como programas alternativos a BLAST, así como la utilidad comercial PatternHunter.

8. CONSTRUCCIÓN DE BASES DE DATOS

Una base de datos biológica es un gran conjunto organizado de datos persistentes junto con una serie de programas que permiten actualizar, buscar y encontrar componentes de los datos incluidos en



el sistema. Las bases de datos se dividen en planas (que constan solamente de una tabla), relacionales (constan de varias tablas de datos relacionados entre sí) y orientadas a objeto (hacen aparecer los datos como objetos manejables en lenguajes de programación como C++ y Java). Es importante el fácil acceso a la información y el aportar métodos para extraer la información necesaria para responder una cuestión biológica específica.

La construcción de una base de datos a partir de datos de una secuenciación, junto con la inclusión de otros datos selectivamente recogidos de bases de datos públicas, es una de las tareas fundamentales en un campo como la Acuicultura con gran escasez de datos genómicos públicos. En la práctica, uno normalmente usa un sistema de base de datos que opere con el lenguaje SQL (Structured Query Language), en donde tenemos desde alternativas de código abierto como MySQL y PostGresQL hasta potentes soluciones comerciales como Oracle. El usuario accede a los datos mediante un sistema de estándares abiertos como la Web, que permite el acceso desde cualquier punto de trabajo independientemente del sistema operativo y navegador correspondientes (Windows, UNIX, MacOS...), con la ventaja adicional de que no es preciso un entrenamiento específico para la utilización ya que HTML es un interfaz sobradamente conocido por cualquier usuario de ordenador. A continuación mostramos como ejemplo de diseño el interfaz de acceso a una base de datos de ESTs de rodaballo que hemos desarrollado en colaboración con el grupo de Genética de Peces de Lugo.

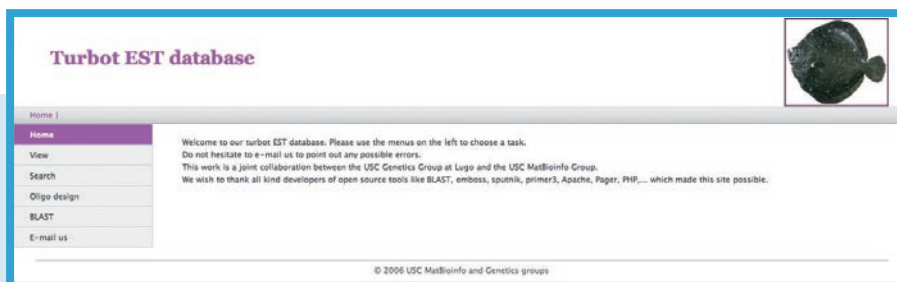


FIGURA 11.
Interfaz de acceso a la base de datos de EST's de rodaballo. USC.



Todos los procesos descritos anteriormente, se pueden realizar de forma automática, para ello es necesario el uso de algún lenguaje de programación que permita ir ensamblando las distintas herramientas utilizadas. A continuación describiremos brevemente algunos.

9. LENGUAJES DE PROGRAMACIÓN EN BIOINFORMÁTICA

9.1. Perl

El lenguaje Perl fue creado por Larry Wall y su primera versión data de 1987. Su sintaxis está inspirada en una variedad de otros lenguajes, notablemente C, bash, awk, sed y Lisp. Históricamente, su extensión viene motivada por sus facilidades para manipular texto, y la ausencia en él de muchas de las limitaciones arbitrarias de los lenguajes para escribir guiones de la época.

La funcionalidad de Perl ha sido extendida mediante muchos módulos estándar y de terceras partes. Desde los inicios de la web se ha utilizado Perl para escribir guiones CGI, conociéndose en la actualidad por una de las «tres ps» (Perl, Python y PHP, los lenguajes más populares para generar aplicaciones web). A menudo se utiliza Perl como un lenguaje para relacionar aplicaciones e interfaces que en principio no se han diseñado para operar juntos, y para procesar cadenas de texto. Es también uno de los lenguajes favoritos de los administradores de sistemas UNIX. Su uso en Bioinformática viene motivado por la gran facilidad para crear informes, el rápido prototipado de aplicaciones, y la capacidad para manejar un gran conjunto de datos (el genoma humano es una cadena de A, G, C, T que ocupa unos 3 GB en el disco duro). A pesar de que diversos grupos de trabajo han adaptado lenguajes de alto nivel a la Bioinformática, Perl sigue siendo el más popular.

9.2. BioPerl

Es una colección de módulos de Perl que facilitan el desarrollo de guiones para aplicaciones bioinformáticas. Es un proyecto de código abierto en este momento bajo desarrollo activo. La primera versión



estable data de 2002. Para utilizar BioPerl se requiere un conocimiento básico del lenguaje Perl, incluido el uso de referencias, módulos, objetos y métodos. Los módulos más populares permiten tareas como

- a) Acceso a secuencias de bases de datos locales y remotas.
- b) Transformar formatos de registros de bases de datos.
- c) Manipular secuencias individuales.
- d) Buscar secuencias similares a una dada.
- e) Crear y manipular alineamientos de secuencias.
- f) Buscar genes y otras estructuras en ADN genómico.
- g) Anotar secuencias automáticamente.

9.3. BioPython

El Python es un lenguaje de programación creado por Guido van Rossum en 1990. El lenguaje posee tipos totalmente dinámicos y usa gestión automática de memoria, con un énfasis en la programación orientada a objeto, dando prioridad a la legibilidad del código sobre la velocidad de escritura. Es un lenguaje de tipo minimalista, aunque la librería estándar le proporciona un gran número de librerías y extensiones adicionales.

El proyecto BioPython es una asociación de desarrolladores cuya misión es poner a disposición de la comunidad de usuarios herramientas para la Biología computacional. Ejemplos de uso incluyen los siguientes:

- a) Lectura e interpretación de ficheros bioinformáticos como datos y estructuras comprensibles para Python, incluyendo soporte para los formatos BLAST, Clustal W, FASTA, GenBank, PubMed, Medline, Prosite, UniGene, SwissProt...
- b) Iteración sobre los formatos soportados registro a registro, o mediante un interfaz tipo diccionario
- c) Interacción con programas como BLAST remoto, Clustal W,...
- d) Herramientas para la manipulación común de secuencias (traducción, transcripción,...)
- e) Herramientas de clasificación (método ingenuo de Bayes, k vecinos más próximos,...)
- f) Creación de matrices de sustitución en alineamientos.
- g) Interfaz gráfico para otros programas.



9.4. BioJava

El Java es un lenguaje de programación orientado a objeto desarrollado por Sun Microsystems a principios de la década de 1990. Las aplicaciones Java se compilan en «código de bytes», el cual se transforma en código nativo de máquina en el momento de ejecución del programa. La sintaxis del lenguaje está inspirada en C y C++, simplificando el modelo de objeto y dando pocas facilidades de actuar a bajo nivel. La independencia de plataforma implica que los programas escritos en Java deben ejecutarse de manera similar en ordenadores con distintos procesadores y/o sistema operativo. Más aún, mediante librerías estándar puede accederse a características gráficas del sistema operativo.

El proyecto BioJava pretende el desarrollo de una librería de clases Java para procesar datos biológicos. Dicha librería permite utilizar objetos para manipular secuencias, lectura selectiva de archivos, acceso a datos de bases, uso de rutinas estadísticas, y creación de interfaces gráficos.

BioPHP

El PHP (preprocesador de hipertexto) es un lenguaje de programación diseñado originalmente para producir páginas web dinámicas. El actual estándar es la versión 5, que incluye nueva funcionalidad del tipo:

- a) Soporte robusto para programación orientada a objeto.
- b) Interfaz consistente de acceso a bases de datos.
- c) Mayor velocidad de proceso.
- d) Excepciones en errores.

El proyecto BioPHP planea extender PHP para que pueda ser utilizado en Biología, y en particular en Bioinformática. En particular, tenemos módulos para calcular la temperatura de melting de oligos, microsatélites, secuencias palindrómicas, alineamiento, traducción de ADN a proteína y viceversa, secuencias aleatorias, etc.

9.5. BioRuby

El Ruby es un lenguaje orientado a objeto que combina una sintaxis inspirada en Perl con la funcionalidad de los objetos inspirada en SmallTalk. Fue creado por Yukihiro Matsumoto, y su primera versión data



de 1995. El proyecto BioRuby persigue implementar un entorno de trabajo integrado para Bioinformática en el lenguaje Ruby. Algunas de las posibilidades son trabajar con secuencias, acceder a datos de GenBank, búsqueda de homologías con FASTA o BLAST, acceso a PubMed, etc.

La creación de la Open Bioinformatics Foundation, con el fin de soportar la programación de código abierto en Bioinformática, y la organización de conferencias de aplicaciones de código abierto en Bioinformática y ciencias de la vida, asegura un futuro a los proyectos anteriores.

10. ANÁLISIS DE LOS DATOS GENÓMICOS

Una vez que se haya obtenido, anotado y almacenado suficiente número de datos llega el momento de comenzar a extraer información relevante de los mismos. Hay muchas preguntas que plantearse pero nos vamos a detener sólo en dos grandes cuestiones:

- 1) ¿Cuál ha sido el proceso de evolución de las especies que nos interesan?
- 2) ¿Qué genes se expresan de manera diferencial en un cierto proceso biológico, cómo interaccionan los genes que hemos determinado anteriormente, y la presencia o ausencia de expresión me permite diagnosticar o clasificar?

Para responder a la primera hay que recurrir a la teoría de la evolución de Darwin y utilizar las herramientas necesarias para construir árboles filogenéticos. De ello se ocupa la filogenia molecular, de la que daremos una somera descripción.

La segunda corresponde a lo que denomina «genómica funcional» y para su respuesta los microarrays son una de las herramienta fundamentales. Dedicaremos la última parte del artículo a la describir las etapas de un análisis estándar de microarrays.

11. FILOGENIA

En 1856, Darwin en su famoso tratado «*el origen de las especies*» expuso la idea de que el sistema natural debería ser representado mediante un árbol genealógico. A partir de entonces, uno de los



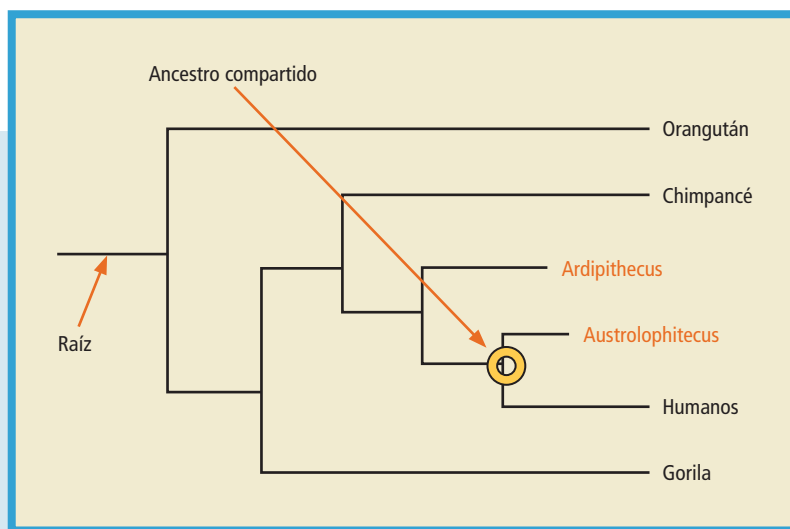
grandes retos de la Biología ha sido responder a la pregunta de cómo se pueden utilizar las características de un grupo de especies actuales, para estimar, en su evolución a partir de un ancestro común, la historia de sus relaciones mutuas.

Hasta la aparición en los años 60 de datos a nivel molecular, esta estimación se hacía por medio de datos morfológicos. El acceso a datos moleculares ha modificado en gran medida los métodos usados hasta ese momento y ha puesto en cuestión muchos de los resultados obtenidos anteriormente. Veamos algunos de los métodos usados para estimar árboles filogenéticos a partir de datos moleculares. Como texto de referencia, recomendamos a lector el libro de Felsenstein, (Felsenstein 2003)

Un árbol de filogenia (ver Figura 12). de un conjunto de especies coetáneas es un árbol (generalmente) binario tal que en sus hojas aparecen las especies, y en los vértices interiores los ancestros compartidos por ellas, hasta llegar a la raíz, donde estaría el ancestro común a todas. La longitud de las ramas sería proporcional al número de generaciones o el tiempo transcurrido desde la aparición de una especie hasta su desdoblamiento en dos.

La mayor parte de las veces, lo que interesa es únicamente la «forma» del árbol, independientemente de la longitud de sus ramas. A esta «forma» se le suele llamar topología. El número de topologías posibles crece de manera exponencial en función del número de especies utilizadas. Por ejemplo con 4 especies tenemos 15 topologías, con 9 ya hay 2.027.025 y con 20 especies hay más de 2×10^{20} .

Se puede hacer filogenia con diferentes tipos de datos, secuencias de ADN, ARN o proteicas, sitios de restricción, lista ordenada de genes, genomas completos, etc. Los métodos filogenéticos se agrupan en tres grandes grupos, métodos de distancia, de máxima verosimilitud y máxima parsimonia. El programa de código abierto más utilizado en el campo es el Phylip, que funciona en cualquier sistema operativo y del que existen portales web que facilitan su uso. En este programa o mejor dicho colección de programas (unos 20) están implementados los algoritmos para aplicar cualquiera de los métodos anteriormente citados, con un nivel de sofisticación suficiente para la mayoría de las situaciones.

**FIGURA 12.**

Ejemplo de árbol filogenético con raíz. El tiempo transcurre de izquierda a derecha desde la aparición de los homínidos a la época actual. Obsérvese que las dos ramas que representan las especies extinguidas terminan antes de tiempo.

11.1. Métodos de distancias

La idea general de estos métodos es dividir el proceso de estimación en dos etapas. En la primera se calcula la matriz de las distancias entre cada par de especies y en la segunda se reconstruye el árbol. La intervención de la Biología en estos métodos está en la estimación de las distancias entre las especies a partir de los datos de los que se dispone. Los algoritmos de reconstrucción provienen en su mayoría de la teoría clásica de análisis de datos estadísticos y pueden ser aplicados a cualquier matriz de distancias.

Se puede construir una matriz de distancias entre las hojas a partir de un árbol con longitudes en sus ramas. Para ello basta definir la distancia entre dos hojas como la suma de las distancias respectivas a su inmediato ancestro común. A una distancia obtenida de esa manera se le denomina distancia derivada de un árbol. No toda distancia es derivada de un árbol. Si la estimada a partir de datos biológicos fuese



derivada de un árbol, podríamos reconstruir ese árbol de manera única. mediante el algoritmo UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages).

La idea es muy sencilla. Se toma el par de taxones (hojas) más próximos, digamos C y F, y se les asocia un nuevo nodo interno, U. Se modifica la matriz de distancias original, de tamaño $n \times n$ para obtener una matriz $(n - 1) \times (n - 1)$ donde ya no aparecen las distancias de los otros taxones a C y D sino al nuevo nodo U. La distancia de una especie A a U es la media de las distancias anteriores a C y D, es decir:

$$\delta(A,U) = \frac{d(A,C) + d(A,D)}{2}.$$

Este proceso se repite hasta llegar al un único nodo que será la raíz del árbol.

Si la matriz no es derivada de un árbol (como suele pasar con datos reales), el árbol resultante puede no ser el correcto: en particular puede alterar la relación de vecindad entre algunos taxones. El algoritmo de **Neighbor-Joining** intenta corregir esta situación modificando la definición de la distancia en cada etapa, añadiendo un factor de corrección que básicamente significa que dos taxones serán vecinos si están cerca entre ellos y alejados de los demás.

Otro algoritmo muy utilizado, pero conceptualmente distinto es el de **Fitch y Margoliash** que consiste en la generalización del conocido método de ajuste por mínimos cuadrados al caso de árboles filogenéticos.

11.1.1. Estimación de la matriz de distancias

No existe un procedimiento general, y depende del tipo de datos con el que estemos trabajando. Veamos el caso de las secuencias de ADN.

11.1.2. Distancia entre secuencias ADN

Podemos estimar la distancia entre dos secuencias alineadas de ADN de muy diversas formas, desde la más burda, que consiste en ver el porcentaje de coincidencias, hasta la más sofisticada, en la que se establecen modelos de evolución.



11.1.3. Cálculo de la distancia usando modelos de evolución

Las secuencias evolucionan mediante mutaciones, inserciones, deleciones, etc. Nosotros nos vamos a restringir al caso de mutaciones. Asumiremos, para simplificar el modelo, que en una secuencia cada «sitio» evoluciona de forma independiente. Por ello obtenemos que dadas dos secuencias R y S, la probabilidad de que S haya evolucionado a partir de R en un tiempo t viene dada por el producto de las probabilidades de evolución en cada sitio. Por lo tanto, sólo necesitamos establecer el modelo de evolución de un sitio. Como cada sitio puede tomar 4 estados, A, G, C, T basta conocer las probabilidades de transición entre ellos en el tiempo. Para establecer el modelo, se parte de dos hipótesis:

Hipótesis 1. El proceso de mutación no tiene memoria, es decir las probabilidades de que un nucleótido en un sitio mute no depende de lo que haya sucedido anteriormente en ese sitio.

Hipótesis 2. Las probabilidades de mutación son las mismas en todo momento, no se modifican por el paso del tiempo.

Con estas dos hipótesis en mente, se adopta como modelo de evolución en un sitio un proceso de Markov continuo, homogéneo de 4 estados y, en la mayor parte de los casos, reversible (grosso modo, en un tiempo t , la probabilidad de evolución de R a S es la misma que la de S a R).

Hay varios modelos que se pueden aplicar, que van desde el más sencillo con un único parámetro propuesto por Jukes-Cantor en 1969 hasta el modelo general reversible propuesto por Lanave y otros en 1984. Una vez escogido el modelo, se estiman los parámetros del mismo por el método de máxima verosimilitud. Este procedimiento se generaliza al caso de los árboles de filogenia, como veremos a continuación.

11.2. Métodos de máxima verosimilitud

Para cada árbol se calcula la probabilidad de obtener las secuencias de las especies actuales a partir de una secuencia ancestral. A dicha probabilidad se le denomina verosimilitud. De entre todos los árboles, se escoge aquél que tiene máxima verosimilitud. Para determinar la



verosimilitud de cada árbol, se necesitan establecer modelos de evolución de manera análoga a lo hecho para el caso de dos secuencias. Hay que remarcar que el proceso tiene dos partes diferenciadas.

Una primera consiste en encontrar las longitudes de las ramas que maximizan la verosimilitud de un árbol con una topología dada. Posteriormente se repite el primer paso para cada posible topología, lo que generalmente es inviable debido a la inmensa cantidad existente. Por ello, se utilizan algoritmos de optimización del tipo «divide y vencerás» o «ramificación y acotación» que nos proporcionan soluciones aproximadas.

11.3. Máxima parsimonia

En el caso de máxima parsimonia, no tenemos modelos evolutivos. Partimos de la idea de que la naturaleza es «parsimoniosa» es decir: hace o produce el menor número de cambios posible. El objetivo en este caso es encontrar la «topología» que necesite el menor número de cambios evolutivos para explicar la aparición de las secuencias actuales a partir de un hipotético ancestro común. En este caso, no hay una longitud de ramas, sólo la forma del árbol. El algoritmo más simple es el de Fitch. En un primer paso, se recorre el árbol hacia la raíz para determinar el número mínimo de cambios que se necesitan. En un segundo paso se intenta, ya partiendo de la raíz, reconstruir las secuencias de los ancestros para obtener ese número mínimo. Como los cambios en un sitio no afectan a los otros sitios, se puede hacer sitio a sitio.

A medida que el número de especies crece, la exploración de todas las topologías se complica y se necesita recurrir a métodos heurísticos para sólo hacer el cálculo en aquellos árboles que sean «prometedores».

11.4. Aplicaciones de la filogenia

La reconstrucción de árboles filogenéticos tiene numerosas aplicaciones que van desde su utilización en tareas de clasificación a su uso en epidemiología. Presentamos un árbol (Figura 13) reconstruido a partir de los datos de varias secuencias del gen de la hemaglutinina del virus de la gripe en muestras obtenidas entre los años 1961-1977.

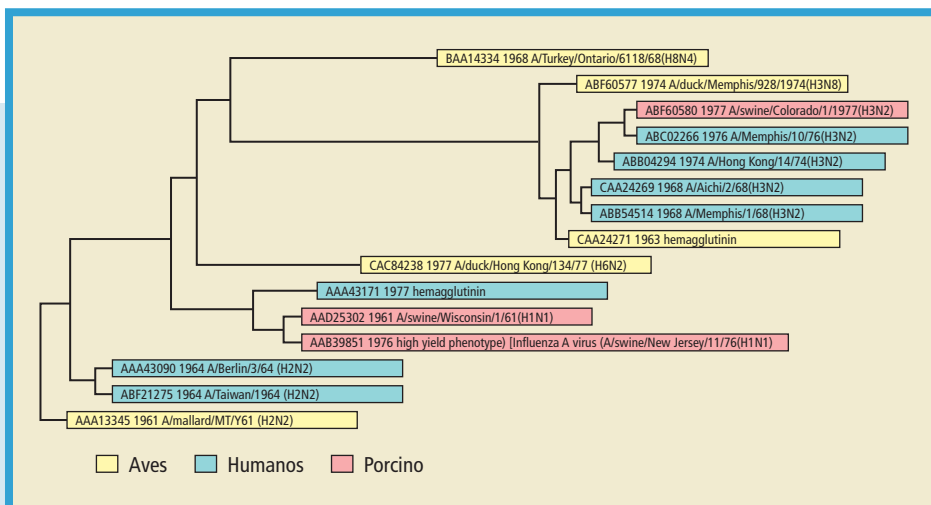


FIGURA 13.

Árbol de filogenia construido usando algunas secuencias de la hemaglutinina del virus de la gripe entre los años 1961 al 1977.

Se observa la aparición del subtipo H3 en humanos lo que da lugar a pandemia de 1968. El árbol es coherente con la hipótesis de que la variante H3 procedía de las aves y se incorporó al virus humano través del virus porcino, ya que se observa un cluster bien definido con 4 virus humanos, un porcino y un ave.

12. ANÁLISIS DE MICROARRAYS

Los microarrays permiten medir el nivel de expresión de miles de genes simultáneamente y constituyen uno de los métodos de experimentación más novedosos y potentes en el campo genómico. Su análisis conlleva numerosas dificultades técnicas desde el punto de vista estadístico. La principal es que se pasa de una situación tradicional donde se observaban unas pocas variables sobre una amplia colección de muestras a la contraria, donde se observan miles de variables simultáneamente sobre una cantidad pequeña de muestras. De hecho, el estudio teórico de los problemas estadísticos de los microarrays ha pasado a ser uno de los temas de mayor interés en estadística. Un



reflejo de ello es la continua aparición de nuevos métodos de análisis de los datos. Por ello, es muy recomendable el uso de software de código abierto para poder utilizar la última técnica disponible y además saber exactamente lo que se está haciendo. En estos momentos, la vanguardia del tema está constituida por el equipo que trabaja en el proyecto Bioconductor, por lo que recomendamos su uso.

Pero para llegar a la fase de análisis de los datos, los microarrays tienen que pasar por una serie de etapas de preprocesado. Para ello ya existe un software estable y unos procedimientos establecidos que pasamos a describir brevemente. Las técnicas de microarrays predominantes son las de Affymetrix, las de ADNc y las de oligos. Éstas dos últimas son las más usadas en los laboratorios de investigación fuera del campo médico, por lo que nos centraremos exclusivamente en su caso. En uno de estos microarrays, se hibridan simultáneamente dos muestras biológicas marcadas con dos fluorescencias diferentes, roja y verde, que a partir de ahora llamaremos canales. El tipo de muestra que se aplica en cada canal depende del diseño del experimento, fase fundamental en el estudio, que ha de ser hecha con rigor.

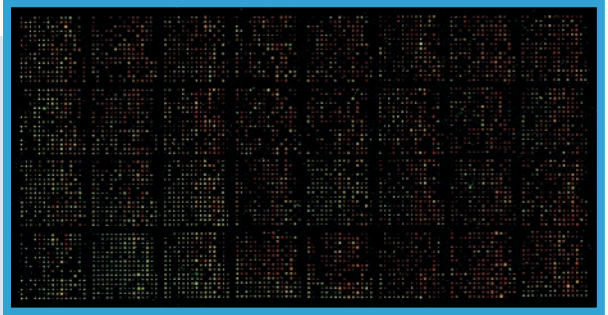
Después del trabajo de hibridación en el laboratorio, el microarray se pasa a un escáner y se obtiene como resultado dos imágenes, una por cada canal, que resumen toda la información que se puede obtener del experimento. En cada una de ellas, cada píxel tiene un valor de 0 a 65535 que se supone nos indica la cantidad de producto hibridado que existe en esa pequeña región. Como la placa donde se hibrida posee una fluorescencia natural, la mayoría de los píxeles de las imágenes tendrán valores superiores a cero, esto constituye lo que se denomina el background. También hay que tener en cuenta que los análisis estadísticos que se han de realizar suponen que la mayor parte de los genes impresos en el microarray actúan de forma indiferenciada en todos los casos, por lo que la imagen falsa (Figura 14) formada por la superposición de los canales rojo y verde de las imágenes debería mostrar una predominancia de puntos amarillos.

La información de la respuesta de un gen no se encuentra en un único píxel sino en una región, generalmente circular, de radio variable según el microarray, pero que suele estar entre 50 y 100 píxeles. Como la impresión del microarray no es perfecta, se necesita, antes de nada, segmentar las



FIGURA 14.

Imagen (girada 90°) de un microarray con 4 × 8 subarrays con una tonalidad roja quizás debido a un problema de calibración del escáner. Esa desviación se debe corregir en la etapa de preprocesado.



imágenes para determinar que región de la misma corresponde a cada gen para luego asociarle un índice a la expresión del mismo.

12.1. Fase de segmentación y determinación del background y la señal

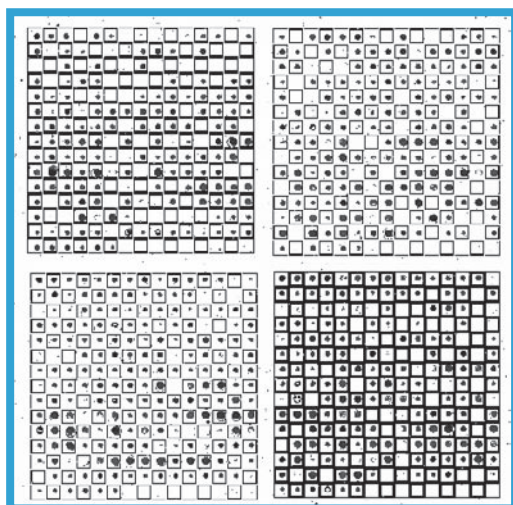
El programa más utilizado es el paquete comercial GenePix. Existen paquetes gratuitos como Spotfinder que pueden dar resultados aceptables después de una pequeña fase de entrenamiento. El procedimiento para segmentar es sencillo de describir, básicamente consiste en colocar una rejilla sobre la imagen haciendo coincidir lo más posible los centros de las rejillas con los centros de los spots (genes) (Figura 15). La diferencia entre unos paquetes u otros consiste en el interfaz de usuario o en la posibilidad de automatizar o semiautomatizar esta fase.

Una vez ajustada la rejilla, hay que determinar la frontera entre lo que es señal de reacción del gen y lo que es background, hay varios algoritmos y la diferencia entre unos u otros programas consiste en los implementados.

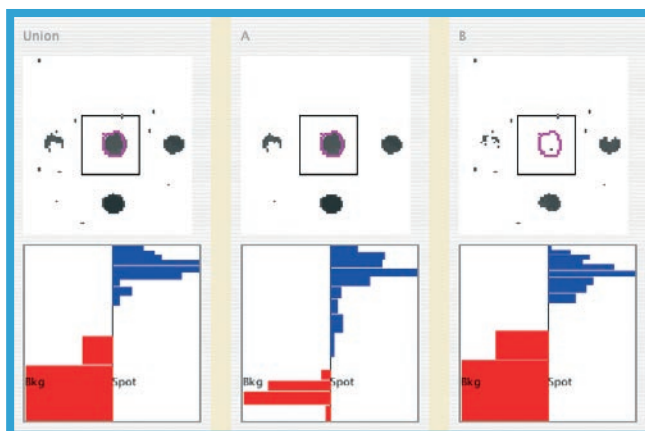
Una vez determinada dicha frontera, a cada spot se le asocian unos valores de intensidad, que serán los valores usados en las posteriores etapas del análisis.

12.2. Preprocesado

Segmentada la imagen y obtenidos los diferentes índices, se necesita proceder a una fase de filtrado de aquellos datos no válidos por

**FIGURA 15.**

Ajuste de una rejilla a una parte del microarray mostrada en la figura 14, usando Spotfinder.

**FIGURA 16.**

Presentación gráfica de determinación de la región de un spot mediante el algoritmo del histograma implementado en Spotfinder.

diversas razones, por ejemplo está saturados, el tamaño del spot es muy pequeño o la forma es demasiado irregular, etc. Generalmente los programas de segmentación colocan «banderas» en los diferentes spots para que nos ayuden en esta fase.

12.3. Normalización

Los niveles de respuesta de cada gen no se pueden medir de manera absoluta, existen numerosas fuentes de error y variabilidad que no

pueden ser excluidas. Por ello antes de pasar al estudio estadístico se necesita normalizar los datos (es casi equivalente a un procedimiento de calibrado). Para ello se utiliza la hipótesis de que la mayoría de los spots reaccionan de forma indiferenciada, por lo que la nube de puntos obtenida a partir de las dos medidas (una por canal) debería concentrarse en torno a la diagonal. Por diversas razones, entre otras por que el ojo humano distingue mejor si una línea es horizontal que si forma 45° con respecto a otra línea, se usa el MA-plot.

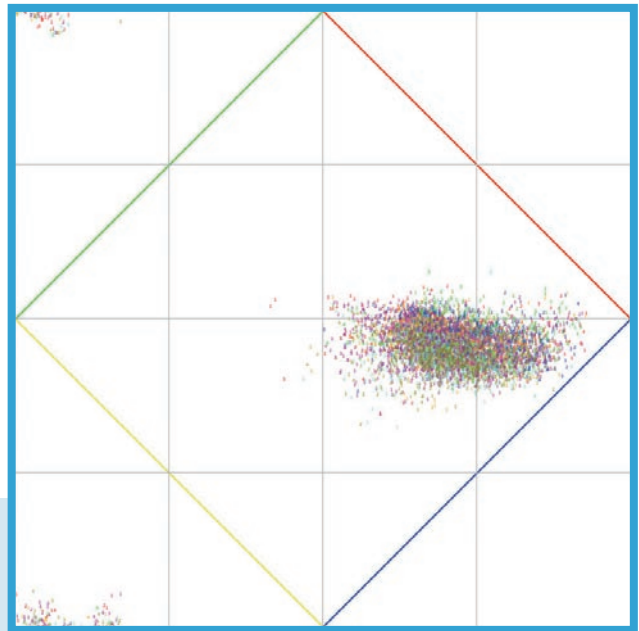


FIGURA 17.
MA-Plot obtenido con
Spotfinder.

La normalización básicamente consiste en hacer un regresión no paramétrica de los datos y quedarnos con los residuos. Una vez normalizada cada micro, se realiza una normalización entre las diferentes microarrays del experimento para estar en condiciones de poder comparar los resultados. Existen varios paquetes que pueden realizar esta etapa de normalización, por ejemplo en Bioconductor podemos usar **marray** o **limma**. La normalización está implementada en Matlab en



su toolbox de Bioinformática o en el programa Midas de TIGR que es el que se encarga del preprocesado de los resultados obtenidos por Spotfinder.

Con los resultados de los experimentos ya normalizados, podemos empezar a hacer un estudio estadístico de los mismos. Generalmente se plantean dos tipos de cuestiones diferentes (evidentemente el diseño del experimento está condicionado por la pregunta que nos queremos hacer en esta fase):

- 1) Si se trata de una serie temporal de muestras, se suele preguntar si hay genes que siguen el mismo patrón de expresión. Si esto es así, se puede plantear el hecho de que interaccionan como hipótesis para posteriores investigaciones.
- 2) Si hemos observado muestras de diferentes tipos, habitualmente se busca conocer los genes que se expresan de forma diferencial y que nos permitirían poder diferenciar entre los diferentes tipos de muestra. Esto ha funcionado muy bien en el caso de ciertos tumores cancerígenos que tenían una gran dificultad de diagnóstico por los métodos tradicionales (Golub 1999). Para responder a la primera cuestión, se usan técnicas de análisis cluster que están implementadas, por ejemplo, en Bioconductor. La segunda requiere el uso de test de hipótesis con las correspondientes correcciones de los p-valores debido al hecho de hacer numerosos test múltiples. Para ello, el paquete **limma** es el más adecuado en estos momentos.

13. CONCLUSIONES

La bioinformática se ha convertido en una disciplina científica esencial en el campo genómico. Existen muchas y buenas herramientas que facilitan el trabajo diario en el laboratorio y permiten aumentar la productividad y la calidad del mismo. Para proyectos de cierta envergadura, es necesario planificar de antemano todo el tratamiento bioinformático de los datos, desarrollando, si es necesario, las herramientas bioinformáticas pertinentes y automatizando el proceso. Las herramientas de análisis de datos hacen uso de matemáticas y estadística que requieren un cierto nivel de conocimiento por parte del usuario.



Quizás los equipos en el campo deberían plantearse la necesidad de incorporar personal que pueda acometer las tareas bioinformáticas y el asesoramiento matemático y estadístico necesario.

BIBLIOGRAFÍA

- ALTSCHUL, S.F., T.L. MADDEN, A.A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER y D.J. LIPMAN, 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- CHOU, H.-H., y M.H. HOLMES, 2001 DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics* **17**: 1093-1104.
- EWING, B., L. HILLIER, M. WENDL y P. GREEN, 1998 Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **8**: 175-185.
- EWING, B., y P. GREEN, 1998 Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**: 186-194.
- GOLUB, T.R., D.K. SLONIM, P. TAMAYO, C. HUARD, M. GAASENBEEK, J.P. MESIROV, H. COLLIER, M.L. LOH, J.R. DOWNING, M.A. CALIGIURI, C.D. BLOOMFIELD y E.S. LANDER, 1999 Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531-537.
- PARDO, B.G., C. FERNÁNDEZ, M. HERMIDA, A. VÁZQUEZ, M. PÉREZ, P. PRESA, M. CALAZA, J.A. ALVAREZ-DIOS, A.S. COMESAÑA, J. RAPOSO-GUILLÁN, C. BOUZA y P. MARTÍNEZ, 2007 Development and characterization of 248 novel microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genome* (en prensa)
- VENTER, J.C., S. LEVY, T. STOCKWELL, K. REMINGTON y A. HALPERN, 2003 Massive parallelism, randomness and genomic advances. *Nat. Genet.* **33**: 219-227.

LIBROS DE TEXTO RECOMENDADOS

Algoritmos y computación

- DEONIER, R.C., S. TAVARÉ y M.S. WATERMAN, 2005 *Computational Genome Analysis: An Introduction*. Springer. New York, EE.UU.
- MOORHOUSE, M. y P. BARRY, 2004 *Bioinformatics Biocomputing and Perl: An Introduction to Bioinformatics Computing Skills and Practice* John Wiley & Sons. EE.UU.
- JONES, N.C., y P.A. PEVNER, 2004 *An Introduction to Bioinformatics Algorithms (Computational Molecular Biology)*. The MIT Press., EE.UU.



Estadística

EWENS, W. J., y G.R.GRANT, 2001 *Statistical Methods in Bioinformatics: An Introduction* Springer, EE.UU.

Filogenia

DURBIN, R., S.R. EDDY, A. KROGH y G. MITCHISON, 1998 *Biological sequence analysis. Probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

FELSESTEIN, J., 2003. *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Massachussets, EE.UU.

Microarrays

GENTLEMAN, R., V. CAREY, W. HUBER, R. IRIZARRY y S. DUDOIT, (eds) 2005 *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor (Statistics for Biology and Health)* Springer, New York, EE.UU.

STEKEL, D., 2003 *Microarray Bioinformatics* Cambridge University Press UK.

PÁGINAS WEB INTERESANTES

<http://www.tigr.org/software/>

<http://bioinf.wehi.edu.au/limma/>

<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

<http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>

