



**INFORME DE EJECUCION PROYECTOS FIC
GOBIERNO REGIONAL DE ATACAMA**

**DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA GENOMICA PARA LA GENERACIÓN SUSTENTABLE
DE PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO GENETICO DE ABALONES Y SERIOLA LALANDI.**

- Ejecutor: Universidad de Chile.
- Fecha informe: 10-10-2013

Índice

I.- Resumen Ejecutivo	3
II.- Introducción	5
III.- Justificación	7
IV.- Desarrollo	12
V.- Resultados	14
VI.- Impacto V/s Impacto esperado	28
VII.-Conclusión	29

I. Resumen Ejecutivo

Este proyecto propone la incorporación de la genómica como herramienta tecnológica, para el desarrollo inicial de cultivos asociados al programa de diversificación acuícola, tal es el caso de *Seriola lalandi* y Abalones, considerando la participación coordinada de laboratorios chilenos y extranjeros que permitan el desarrollo colaborativo en este desafío. Se propone el uso de secuenciamiento a gran escala del transcriptoma de *Seriola lalandi*, utilizando la plataforma de última generación. Ello con el objetivo de caracterizar el transcriptoma de esta especie en distintas etapas larvales. La información generada como parte de este proyecto permitirá entender la biología de los cambios transcripcionales que explican el desarrollo larval en *Seriola lalandi*, de forma tal de detectar genes cuya expresión es diferencial, debida a factores genéticos que influyen la sobrevivencia larval y la presencia de deformidades. Esta información permitirá conocer los factores genéticos que influyen esta importante etapa de vida de este recurso y donde se producen la mayor cantidad de pérdidas a nivel productivo. Concomitantemente, la información de secuencias se utilizará para el descubrimiento de marcadores del tipo SNP (mutaciones simples de nucleótidos). La información generada en el proyecto en estas 2 especies focales permitió el desarrollo de marcadores focales en *Seriola lalandi* y *Haliotis rufescens*, utilizando información genómica proveniente de 2 fuentes:

- 1) Transcriptoma de larvas normales y deformes.
- 2) DNA de haliotis que presentan crecimientos diferenciales extremos.

Considerando el transcriptoma de *Seriola*, fue posible descubrir más de 32290 marcadores del tipo SNP, los cuales cumplen criterios para su determinación mediante HRM. La validación de un grupo de ellos permitió recuperar la variabilidad observada en larvas normales y deformes en una población independiente. Por otro lado, se pudo determinar un número sustancialmente más bajo de marcadores microsatélites. De esta manera, 12 marcadores con exigencias estrictas en cuanto a su conformación pudieron ser genotipados en una muestra independiente. Los marcadores y sus primarios serán enviados a NCBI y por lo tanto estarán a disposición de los interesados.

En abalones, se secuenció en forma parcial, regiones asociadas a sitios de restricción, con lo cual sólo una proporción del genoma es secuenciada, reduciendo de esta forma la complejidad del genoma a secuenciar.

Este análisis permitió la búsqueda de marcadores SNPs, dentro de la secuencia de cercana, que bordea sitios de restricción dentro del genoma de esta especie. La importancia de este análisis es que permite en forma relativamente sencilla conocer la variabilidad del genoma, cuando no se dispone de un genoma de referencia. Por otro lado, el análisis de esta información permite conocer la variabilidad y consanguinidad de la población, además de los marcadores que podrían estar asociados a crecimiento corporal. De esta forma se pudo comprobar que la consanguinidad población es cercana a un 25 %. La variabilidad de este parámetro presenta una distribución uniforme con un peak en 0, ello permite explicar que una proporción de la población se ha generado en base a cruzamientos entre parientes (Figura 3). Ello es una explicación plausible cuando se considera las condiciones productivas en Chile, considerando que es una especie introducida durante los años 90, y donde no ha existido ingreso de nuevos ejemplares como reproductores hacia Chile.

Por otra parte, el desarrollo de estos marcadores permite estudios poblacionales más acabados en esta especie, debido a la determinación del pedigree de la población. Ello con el objetivo de disminuir el incremento de la consanguinidad ya generada. Estos marcadores permiten la implementación de programas de mejoramiento genético, lo que incide directamente en un mayor crecimiento corporal de abalones en la Región de Atacama.

Esta información será relevante y para el desarrollo de nuevos marcadores polimórficos obtenidos directamente, en las poblaciones comerciales de *Seriola lalandi*, manejadas de estas especies en la región de Atacama. Mediante la genómica se podrá evaluar la estructura genética de las poblaciones utilizadas actualmente para el establecimiento de los sistemas productivos de Abalones y *Seriola lalandi*, en la región de Atacama. Con la información de marcadores moleculares es posible medir la variabilidad genética en las poblaciones de *Seriola lalandi* y Abalones manejar cruzamientos, con el objetivo de minimizar la consanguinidad poblacional, y determinar la paternidad utilizando marcadores moleculares desde estanques comunales, considerando la producción individuos sin marcaje. Esto permitirá en las siguientes generaciones seleccionar por características productivas y económicamente rentables en estas poblaciones, mediante el desarrollo de programas de mejoramiento genético.

Los productos asociados al proyecto son:

- 1) Determinación de parámetros genéticos poblacionales de la especie *Seriola lalandi* en poblaciones chilenas naturales entre la II y IV Región a través de microsatélites. LV REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CHILE.
- 2) Estructura genética de poblaciones chilenas de *Seriola lalandi* para la diversificación de la acuicultura nacional en el norte de Chile. IV Congreso Nacional de acuicultura.

- 3) Genetic structure of Chilean populations of *Seriola lalandi* used for the implementation of breeding programs using microsatellite data. Aquaculture conference: To the Next 40 Years of Sustainable Global Aquaculture.
- 4) Development of sustainable breeding programs in the abalone (*Haliotis rufescens*) for weight gain, using genotyping by sequencing. Aquaculture conference: To the Next 40 Years of Sustainable Global Aquaculture.
- 5) Developing molecular markers for population and quantitative genetic analysis of *Seriola lalandi* using transcriptome sequencing. PAG, XXXIII. San Diego.
- 6) Artículo sometido a referato en revista ISI. Estructura genética de poblaciones chilenas de *Seriola lalandi* para la diversificación de la acuicultura nacional en el norte de Chile. Gonzalo Fernández, Daniela Cichero, Ana Jedlicki & Víctor Martínez. Latinamerican journal of aquaculture research.
- 7) Tesis de pregrado; “Expresión de genes durante el desarrollo embrionario y larval en *Seriola lalandi*”. Veronica Barra.
- 8) "Using transcriptome sequencing for "*de novo*" marker discovery in captive populations of *Seriola lalandi*". “Diversification of Chilean Aquaculture: Development of nutrition research for *Seriola lalandi* and others native marine species”, Octubre, Temuco, Chile.

II. Introducción

Este proyecto propone la incorporación de la genómica como herramienta tecnológica, para el desarrollo inicial de cultivos asociados al programa de diversificación acuícola, tal es el caso de *Seriola lalandi* y Abalones, considerando la participación coordinada de laboratorios chilenos y extranjeros que permitan el desarrollo colaborativo en este desafío. Se propone el uso de secuenciamiento a gran escala del transcriptoma de *Seriola lalandi*, utilizando la plataforma de última generación. Ello con el objetivo de caracterizar el transcriptoma de esta especie en distintas etapas larvales. La información generada como parte de este proyecto permitirá entender la biología de los cambios transcripcionales que explican el desarrollo larval en *Seriola lalandi*, de forma tal de detectar genes cuya expresión es diferencial, debida a factores genéticos que influyen en la sobrevivencia larval y la presencia de deformidades. Esta información permitirá conocer los factores genéticos que influyen en esta importante etapa de vida de este recurso y donde se producen la mayor cantidad de pérdidas a nivel productivo. Concomitantemente, la información de secuencias se utilizará para el descubrimiento de marcadores del tipo SNP (mutaciones simples de nucleótidos). Esta información será relevante y para el desarrollo de nuevos marcadores polimórficos obtenidos directamente, en las poblaciones comerciales de *Seriola lalandi*, manejadas de estas especies en la región de Atacama. Mediante la genómica se podrá evaluar la estructura genética de las poblaciones utilizadas actualmente para el establecimiento de los sistemas productivos de Abalones y *Seriola lalandi*, en la región de Atacama. Con la información de marcadores moleculares será posible medir la variabilidad genética en las poblaciones de *Seriola lalandi* y Abalones manejar cruzamientos, con el objetivo de minimizar la consanguinidad poblacional, y determinar la paternidad utilizando marcadores moleculares desde estanques comunales, considerando la producción de individuos sin marcaje. Esto permitirá en las siguientes generaciones seleccionar por características productivas y económicamente rentables en estas poblaciones, mediante el desarrollo de programas de mejoramiento genético. En resumen este proyecto permitirá: 1) Generar las capacidades básicas en genómica de estas especies, y en especial considerando directamente el germoplasma de *Seriola lalandi*, actualmente utilizado en producción acuícola en la región de Atacama. 2) Manejar poblaciones de *Seriola lalandi* y Abalones de forma genéticamente sustentable, y permitir el desarrollo de Programas de Mejoramiento Genético, para características económicamente rentables. Esto incide directamente en la rentabilidad de la producción de estos recursos acuícolas en la Región de Atacama. 4 El uso de herramientas genómicas para la solución de problemas genéticos relacionados con estas nuevas especies acuícolas requiere de un alto grado de colaboración multidisciplinaria, por este motivo, se considera la participación de investigadores de renombre internacional, tanto de peces como moluscos, tanto de Noruega como de Chile en el área bioinformática y desarrollo genómico.

III. Justificación

Exposición general del problema

Durante los últimos años, el Estado de Chile ha promovido el desarrollo de instancias que permitan diversificar la producción de peces en Chile, en base al desarrollo de especies autóctonas.

Estas especies, tienen en la mayoría de los casos un demanda insatisfecha a nivel mundial y con altos precios de comercialización.

Debido a esfuerzos institucionales en la interface privada---pública, en la región de atacama se han desarrollado iniciativas tendientes al desarrollo de nuevos sistemas productivos acuícolas, tales como el cultivo de *Seriola lalandi* (Yellowtail kingfish) y de Abalones (*Haliotis* spp).

A continuación se presenta las características más importantes de la producción de ambas especies en cautiverio.

Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) es un pez de grado sashimi, el pescado proveniente de pesquerías, posee características organolépticas de grandes atributos, con carne de gran calidad y alto valor comercial, lo que se debe a su color blanco y textura firme.

Además al poseer altos niveles de aceites poliinsaturados, tiene excelentes propiedades nutricionales. El producto está siendo posicionado como; saludable, ecológico, de gran sabor, de textura firme y cremosa, rico en proteínas, vitamina B, omega 3, omega 6 y yodo, bajo en colesterol, de excelente presencia, conveniente y fácil de cocinar.

Estos peces son muy apreciados en los países asiáticos, en Europa y de manera creciente en USA, en donde se consumen crudo como “sashimi” y “sushi” o cocinado, frito y marinado, por lo que sus mercados de destino son ambos; el del pescado crudo y preparado. Esta especie tiene un mercado bastante atractivo a nivel mundial, siendo los principales consumidores Norteamérica, España, Portugal, Japón, Corea del Sur, Tailandia y Singapur.

De este modo *Seriola lalandi* es una interesante opción para diversificar la acuicultura nacional incluyendo una nueva especie de cultivo, contribuyendo a optimizar la producción en la costa de la zona norte de nuestro país. El cultivo del Abalón (*Haliotis* spp) ha reemplazado paulatinamente la producción de ostiones en la zona norte de nuestro país. El Abalón rojo (*Haliotis rufescens*) ha dominado la producción nacional de este recurso, debido a la tasa de crecimiento y la facilidad de cultivo cerrado completo.

Esto ha sido el caso principalmente debido a la gran demanda de Abalones desde el mercado asiático, especialmente luego de los eventos telúricos acontecidos en Japon, lo cual ha permitido exportaciones crecientes desde la región de Atacama.

A diferencia de *Seriola lalandi*, el Abalón es un molusco exótico, donde existe diversas empresas vendedoras de semillas, aunque no existe un mercado diferenciado en relación a la disponibilidad de líneas genéticas que posean atributos específicos de producción.

Más aún, no existe evidencia en la literatura relativa a la diversidad genética de las poblaciones de Abalón en la región de Atacama, actualmente en uso para la producción de este recurso en la región.

Desarrollos en genómica y disponibilidad de marcadores para el estudio genético de *Seriola lalandi* y Abalones .

Las mutaciones en el genoma animal permiten crear variabilidad genética (los cuales se denominan polimorfismos), la cual se manifiesta en la diversidad alélica de distintos marcadores disponibles hoy en día para estudios relacionados con la estructura taxonómica entre y dentro poblaciones, parentesco molecular o bien establecer el ligamiento con factores genéticos que explican la variación de caracteres productivos (Meuwissen and Goddard, 2001).

Diversos tipos de marcadores están disponibles específicamente en acuicultura (Liu and Cordes, 2004), siendo muy importantes los microsatélites y Snps). En años recientes el desarrollo de marcadores moleculares en conjunto con el desarrollo de la metodología estadística ha permitido descomponer los factores genéticos que influyen la expresión caracteres cuantitativos complejos, en especial aquellos de importancia económica, es lo que se denomina QTL (Patterson, et al., 1991; Andersson, 2001; Cheverud, et al., 1996). Esto se realiza principalmente utilizando la información de líneas o poblaciones divergentes para el carácter cuantitativo, a través de la (co)segregación de marcadores con los fenotipos de manera tal de estimar el número y posición de los QTL más importantes que influyen la arquitectura de los caracteres cuantitativos.

Como se mencionó anteriormente, para poder determinar el status genético de una población es necesario, utilizar herramientas moleculares que permitan a nivel del ADN (genoma de la especie) medir el nivel de variabilidad genética y por ende el grado de consanguinidad de las poblaciones actualmente en uso para producción acuícola.

En el caso del Abalón, debido a que es una especie actualmente utilizada en acuicultura a nivel mundial, existe suficiente información de marcadores moleculares que permiten la medición de variabilidad genética y la estimación de parentesco y contribución genética parental luego de desoves comunales.

En el caso del Abalón existe más de 15 marcadores microsatélites los cuales han sido utilizados para estudios de variabilidad genética de híbridos, entre Abalón rojo y japonés (Lafarga et al., 2011).

No obstante, lo anterior, en especies recientemente introducidas para propósitos de acuicultura (como es el caso de *Seriola lalandi*) la información genómica y de marcadores moleculares disponible para este tipo de estudios es marginal.

Una búsqueda en bases de datos genómicos, permitió determinar que existe escasa información de secuencias, las que solo permiten determinar diferencias a nivel poblacional (es decir sólo entre poblaciones).

Sin embargo, no es posible con esta información determinar diferencias genéticas entre individuos dentro de estas poblaciones las cuales son necesarias para estudios de consanguinidad e implementación de programas de mejoramiento genético.

Por ello, en este proyecto se plantea el uso de secuenciación de última generación, para la obtención de secuencias a gran escala provenientes del transcriptoma de *Seriola lalandi* (aquella parte del genoma que se ha expresado en diversos tejidos, es decir los genes que han producido diversos productos metabólicos), y lo que eventualmente podría explicar caracteres complejos, o aquellos que directamente incidan directamente en la rentabilidad del sistema productivo.

Tal es el caso, de la producción larval, donde un punto crítico es la gran mortalidad larval inicial y las deformidades observadas en esta especie.

Para lograr este objetivo, se utilizará plataformas comerciales de secuenciamiento, considerando grupos de individuos con patrones de desarrollo normales y deformes, con el objetivo, de determinar los genes que explican las diferencias observadas entre ambos grupos. Paralelamente, la información de estas secuencias permitirá el desarrollo de marcadores moleculares lo cual permitirá realizar estudios genéticos tendientes a diagnosticar el status genético de las poblaciones de *Seriola lalandi* actualmente en uso para producción en la región.

Estudios genéticos y consanguinidad en *Seriola lalandi* y *Haliotis spp.*

Se ha demostrado que la mantención de poblaciones en sistemas de manejo artificial erosiona el patrimonio genético de las poblaciones, y como consecuencia, ellas tienden a perder atributos productivos.

Esto suele manifestarse en un incremento de la frecuencia de deformaciones y de las tasas de mortalidad en distintas etapas del cultivo, así como menores tasas de crecimiento.

Cabe señalar, que los stocks actualmente en uso, se utilizarán en los próximos años para desarrollar el cultivo y producción de *Seriola lalandi* tanto en la región de Atacama, como a nivel nacional, muy posiblemente a través de larvas.

Por ello es imprescindible contar con líneas de peces lo suficientemente variables genéticamente, de forma tal de evitar cualquier fragilidad al inicio del Programa de Diversificación de la *Seriola lalandi* en el norte del país, iniciativa llevada a cabo por la empresa Acuínor. Líneas o poblaciones comerciales de *Seriola lalandi* altamente consanguíneas, pueden llevar a un colapso en la producción debido a problemas de consanguinidad y bajos rendimientos productivos.

Estos problemas han sido observados en otros sistemas productivos, tales como la carpa en Israel, donde lentamente la producción fue declinando debido a problemas de consanguinidad.

Se reconoce a nivel mundial (ver reporte en biotecnologías aplicadas a la producción acuícola en FAO (http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/abdc/documents/fish.pdf ; Subhasinge, et al 2010), que el establecimiento de nuevos sistemas productivos requiere de una planificación adecuada en el largo plazo, de forma tal de poder manejar el tamaño efectivo de las poblaciones, con el objetivo de prevenir problemas de depresión consanguinidad, lo cual puede llevar a pérdidas productivas importantes debido a deformidades larvales, susceptibilidad al stress, mayor susceptibilidad de enfermedades y bajo crecimiento.

Desafíos en el establecimiento de programas de mejoramiento genético de nuevas especies.

En producción animal y agrícola los programas de mejoramiento genético han permitido aumentar el retorno económico de las empresas pecuarias. En Noruega se ha estimado que cerca de un tercio del aumento de la producción de salmón de los últimos 20 años se explica por el desarrollo y práctica del mejoramiento genético de la población (Rye, M Akvaforsk, Comunicación personal). Debido a que el objetivo de mejoramiento se compone de todas aquellas características que influyen significativamente el retorno económico, se incluye en él caracteres relacionados con crecimiento corporal, color y textura de la carne, así como también, la resistencia genética a enfermedades de tipo viral y bacteriano (Gjoen y Bentsen, 1997).

Al ser *Seriola lalandi* una especie nativa, el germoplasma salvaje utilizado para producción ha sido obtenido desde pesca artesanal y por lo tanto las poblaciones actualmente provienen de stocks sin domesticación. Por lo tanto, el perfil genético---productivo de los ejemplares utilizados como reproductores es desconocido. Más aún no se conoce los perfiles genéticos que son necesarios para estimar el grado de variabilidad genética del stock, actualmente en uso para producción. Desconocer esta información es muy importante, porque a partir de este stock en proceso de domesticación se generará el programa de diversificación acuícola nacional, y dentro del cual el mejoramiento genético jugará un rol importante en mejorar la rentabilidad del sistema productivo en el largo plazo.

La implementación más sencilla de programas de mejoramiento genético requiere conocer el pedigree de la población, particularmente, las relaciones de parentesco directo entre padres e hijos. En especies con desoves comunales, tales como en *Seriola lalandi* y *Haliotis rufescens*, conocer estas relaciones de parentesco es imposible sin el uso de marcadores moleculares. Por este motivo es imprescindible contar con la información necesaria para estudios de parentesco en esta especie para poder implementar programas de mejoramiento genético de características económicamente rentables. Esto permitirá en el corto, mediano y largo plazo, una producción de *Seriola lalandi* eficiente y que paulatinamente pueda confluir en el desarrollo de líneas altamente domesticadas, y altamente eficientes desde un punto de vista económico.

“El estudio genético planteado en este proyecto, de esta especies permitirá generar grandes beneficios para mejorar el sistema productivo, determinando el efecto de distintos factores en la composición genética del animal, identificación de genes de interés y uso posible de marcadores para selección de una característica dada, en la mediano plazo.” A partir de la información generada se buscará en el futuro obtener la descripción genética de ciertos rasgos complejos de importancia, para que se pueden mapear zonas del genoma con el fin de identificar los QTL's (loci de rasgos cuantitativos) responsables de características económicamente rentables.

Esta información junto con otros parámetros poblacionales se utilizará para determinar el efecto que tiene la domesticación de esta especie en la composición genética de la población y el efecto en las características relacionadas con la adaptación a condiciones de manejo intensivo, entre otras.

El conocer a nivel molecular la composición genética de *Seriola lalandi* nos da la posibilidad de entender como el proceso de domesticación afecta las características relacionadas con el valor adaptativo y la expresión de ciertas características. Esta información se podrá utilizar para comprender de mejor manera los cambios que se generan en la especie producto de estar sometida a un sistema productivo intensivo.

IV. Desarrollo

En el desarrollo del proyecto se optó por utilizar información genómica proveniente de 2 fuentes, con el propósito de descubrir marcadores focales en *Seriola lalandi* y *Haliotis rufescens*, utilizando:

1) Transcriptoma de larvas normales y deformes.

Debido a que no existe información del genoma de *Seriola lalandi*, se secuenció el RNA mensajero de 10 larvas completas (con deformidad a nivel mandibular o normal), con el objetivo de poder desarrollar un transcriptoma de referencia, con el cual será posible la búsqueda de marcadores moleculares del tipo SNP y microsatelites. Además, esta información permitirá conocer aquellos genes que se expresan diferencialmente, entre deformes y normales.

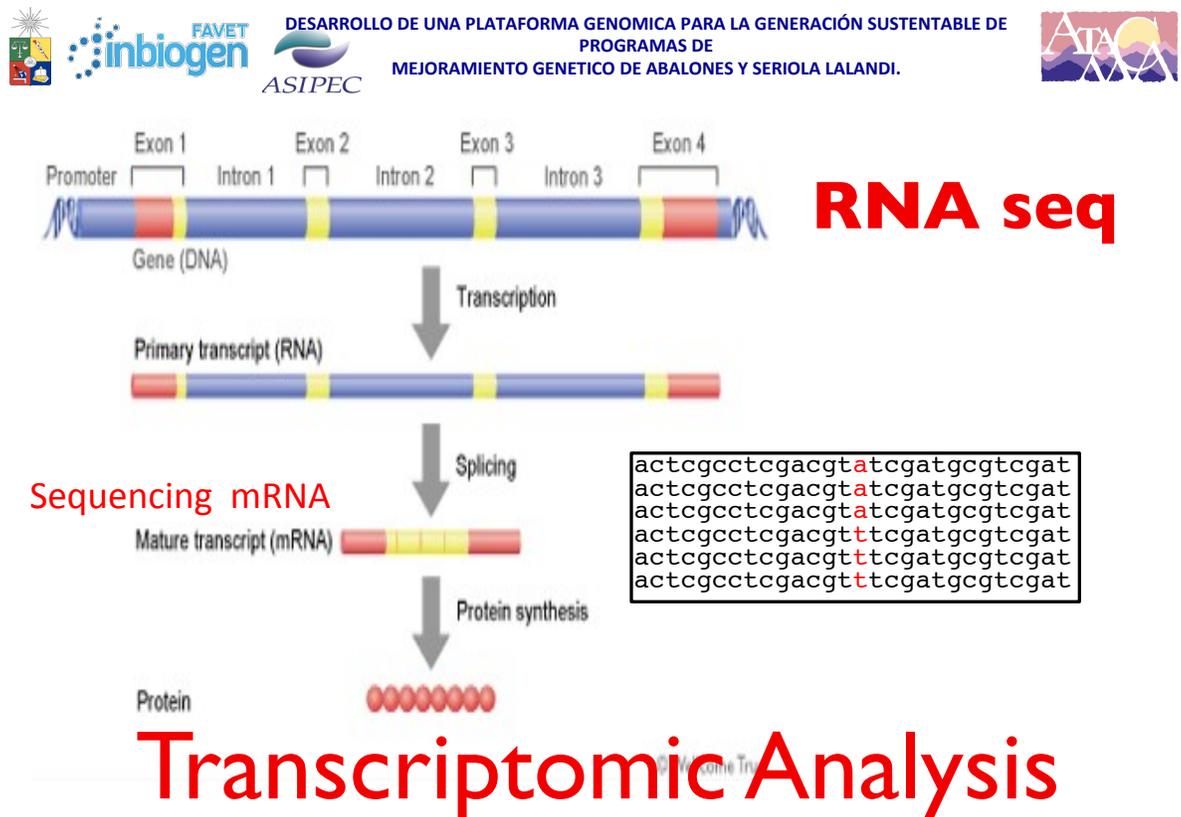


Figura 1.- Esquema del uso del transcriptoma de la especie focal.

2) Material genético de *Haliotis rufescens* que presentan crecimientos diferenciales extremos.

La estrategia utilizada para el estudio genómico de abalones, fue diferente en relación a lo planteado en *Seriola*. En este caso se secuenció 24 individuos en forma parcial, en regiones asociadas a sitios de restricción, con lo cual una proporción del genoma es secuenciada reduciendo de esta forma la complejidad del genoma (Figura 2). Dos animales se secuenciaron a gran escala (100X) con el objetivo de contar con un “genoma de referencia” para poder detectar los SNPs.

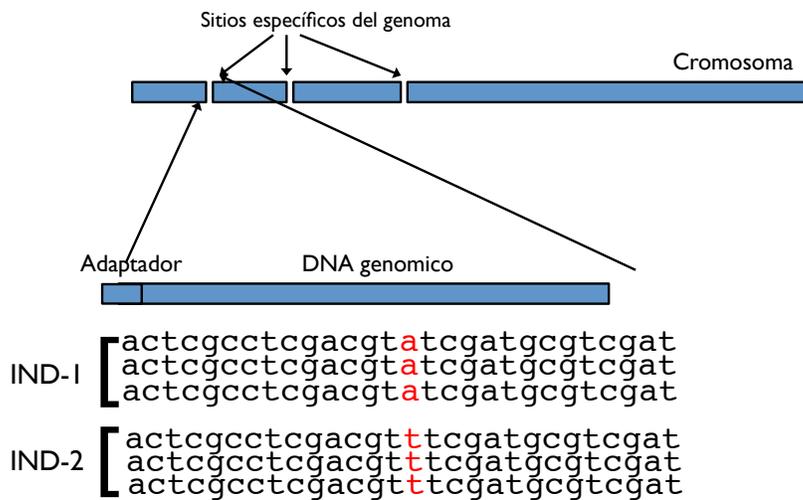


Figura 2 Representación grafica del genotipado utilizando secuenciamiento para abalones

Este análisis permite la búsqueda de marcadores SNPs, dentro de la secuencia cercana, que bordea sitios de restricción dentro del genoma de esta especie. Permitiendo conocer mediante análisis bioinformáticos y genéticos, la variabilidad del genoma, cuando no se dispone de un genoma de referencia.

V. Resultados

Seriola lalandi.

Primeramente se estudio la variabilidad del genoma de *Seriola lalandi*, mediante información obtenida de especies hermanas *Seriola quinqueradiata* y *dumerilli*. Para evaluar esto, 27 microsátélites previamente publicados para especies del mismo género fueron utilizados. Solamente, nueve marcadores fueron adecuados para evaluar la variabilidad genética en *Seriola lalandi*, demostrando la mayoría desviaciones al equilibrio de HW, con endogamia moderada ($F = 0,12$). El análisis utilizando el software STRUCTURE demostró la presencia de "admixture" con diferentes niveles de ascendencia en cada individuo considerando al menos 2 poblaciones. Esto puede explicarse por el comportamiento migratorio exhibido por la especie, el cual posibilita el apareamiento entre diferentes poblaciones en pequeños grupos de animales. Esta especie tiende a mostrar un comportamiento grupal, de modo que no es inesperado que exista apareamiento entre parientes dentro de pequeños grupos de peces. Considerando que el sistema de producción se basa en la captura de individuos provenientes de poblaciones naturales (pesquerías), conocer la variabilidad genética es importante para asegurar un sistema de producción sostenible.

Debido a las dificultades observadas en el análisis anterior cuando se consideró información de especies no focales, se utilizó información del transcriptoma de la especie focal. Se ensambló el transcriptoma utilizando para ello, secuencias provenientes de 10 animales los cuales fueron secuenciados individualmente mediante la tecnología illumina. Se obtuvo tres replicas técnicas para cada animal, dando un total 60 millones de lecturas por animal. Esta gran cantidad de lecturas permite obtener con una cobertura suficiente, lo cual permite el ensamblaje *de novo*. De esta forma es posible definir las vías metabólicas asociadas al crecimiento temprano de esta especie y minimizar la probabilidad de errores de secuenciamiento, los cuales generan posibles marcadores falsos positivos. De esta forma, fue posible determinar que existe un sinnúmero de secuencias asociados al metabolismo de las purinas, elongación de ácidos grasos y metabolismo de azúcares (Figura 2).

Estructura genómica de *Haliotis rufescens* y *Seriola lalandi* en Atacama. FIC Atacama N° 121017019102035.

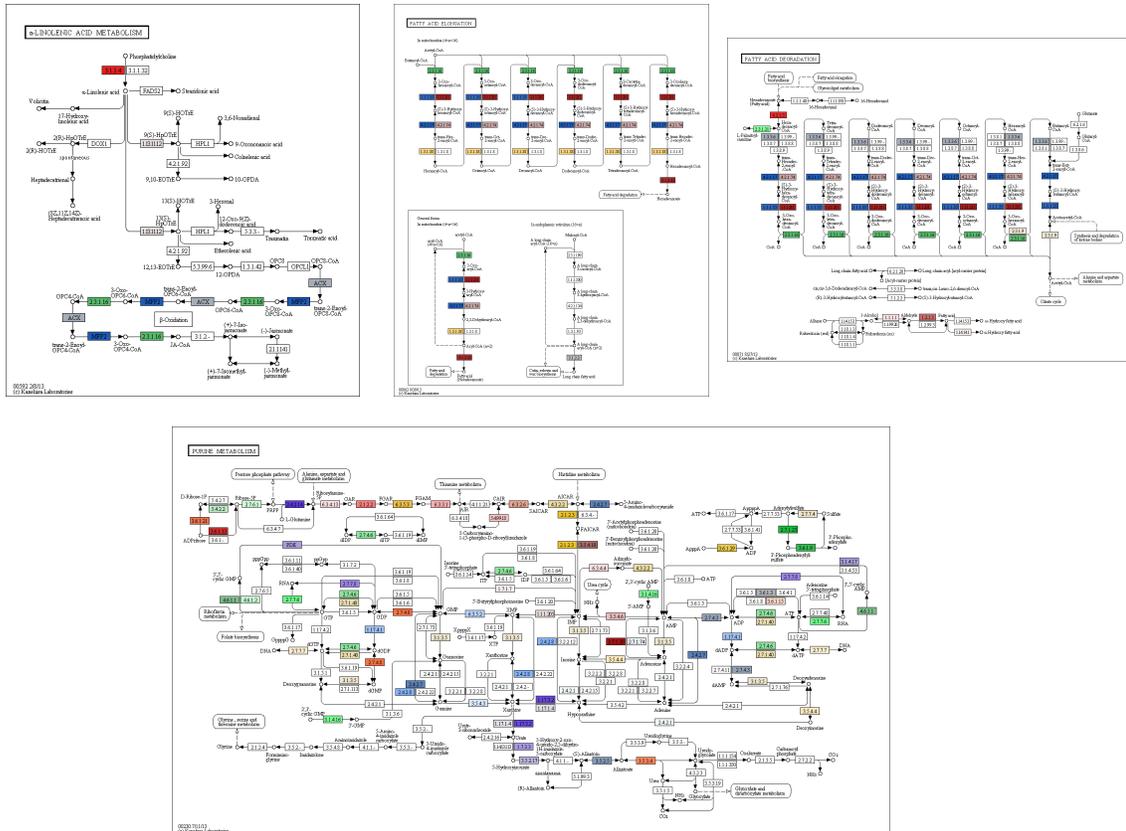


Figura 3.- Principales vías metabólicas (parciales o completas) asociadas a crecimiento larval). Genes en color indican procesos activados, dentro de cada vía presentada.

El análisis de BLAST, considerando todas las especies disponibles en NCBI, señaló que la especie con un mayor número de hits significativos fue tilapia.

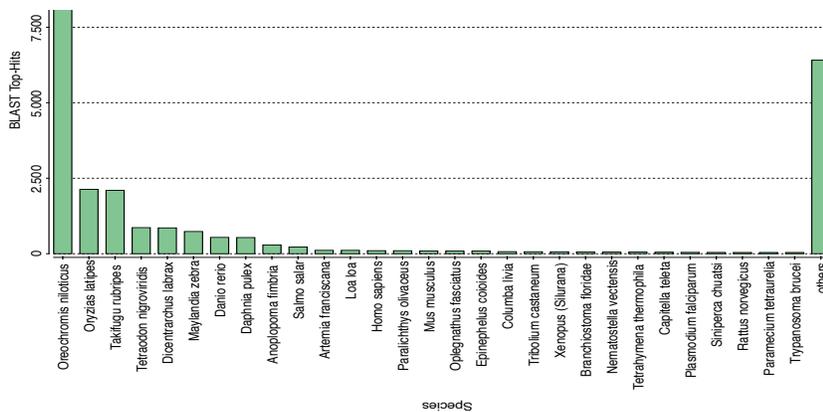


Figura 4.- BLAST significativos de otras especies, considerando el transcriptoma de *Seriola*.

Considerando el transcriptoma desarrollado *de novo* de *Seriola lalandi*, fue posible descubrir mas de 32290 marcadores del tipo SNP, los cuales cumplen criterios para su determinación mediante la técnica High Resolution Melting (HRM) (Ver Figura 3). La validación de un grupo de ellos permitió medir la variabilidad en una población independiente de reproductores, los cuales fueron genotipados con los marcadores microsatelites no focales.

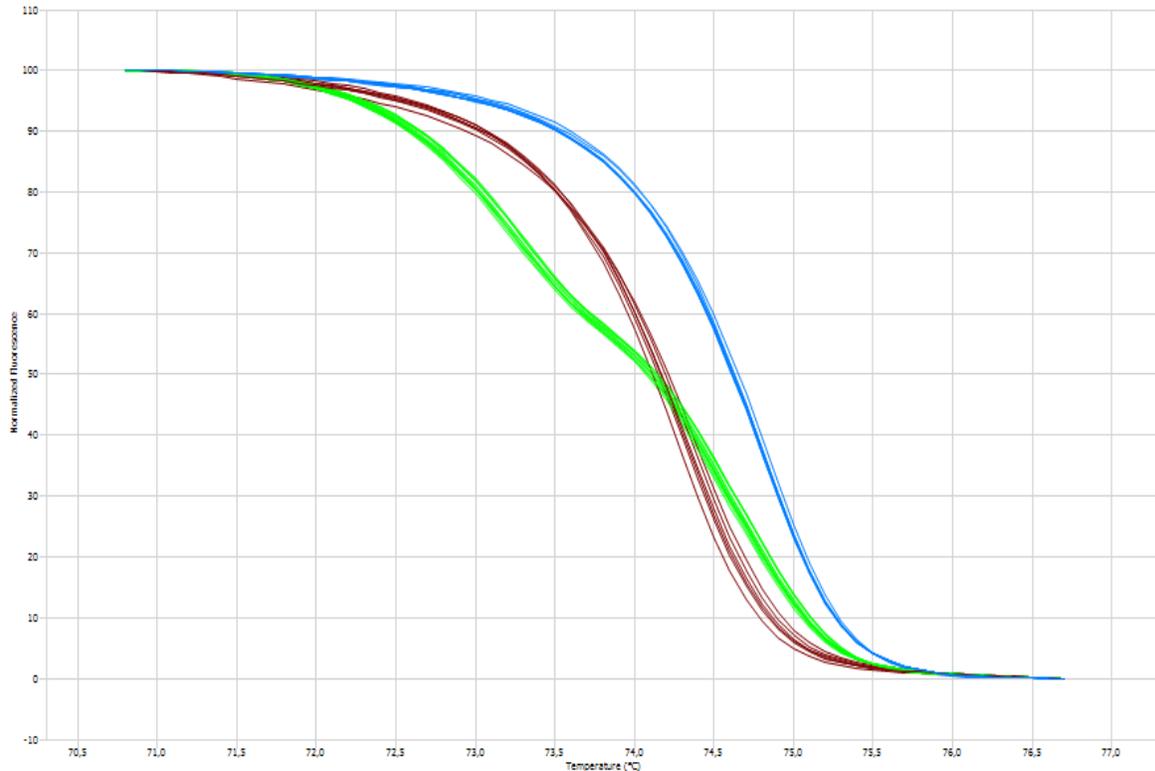


Figura 5.- Resultados del HRM para el SNP sela11239, verde corresponde al heterocigoto, y las curvas burdeo y azul a los homocigotos.

De los 24 marcadores utilizados en la validación (cada marcador fue genotipado en 24 individuos) 19 fueron exitosamente validados A su vez se pudo corroborar que algunos de estos loci presentaban indicios de consanguinidad (ver Figura 5).. Esto es esperable considerando la biología de esta especie, la cual se describe como gregarios y desoves múltiples grupales.

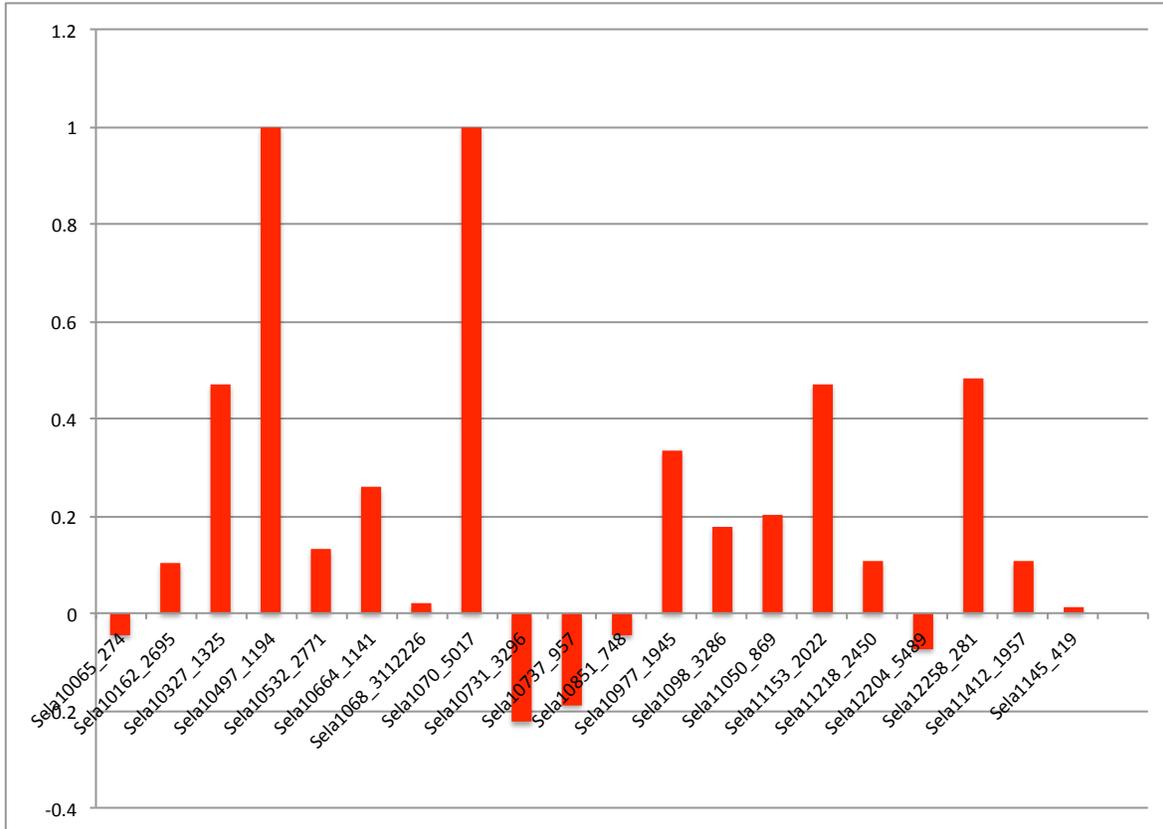


Figura 6.- Consanguinidad del marcador medida como Fis, en 20 marcadores que amplificaron satisfactoriamente en una población de *Seriola lalandi* independiente.

Por otro lado, se pudo determinar un número sustancialmente menor de marcadores microsatélites, considerando estas secuencias. Este resultado es esperable, principalmente debido a que son secuencias expresadas y por lo tanto inserciones o deleciones que cambien el marco de lectura, pueden generar problemas en las proteínas sintetizadas y por lo tanto generar problemas al momento de constituir vías metabólicas específicas. De esta manera, 12 marcadores con exigencias estrictas en cuanto a su conformación pudieron ser genotipados en una muestra independiente. Los marcadores y sus partidores serán enviados a NCBI.

Haliotis rufescens.

Este análisis permite la búsqueda de marcadores SNPs, dentro de la secuencia cercana, que bordea sitios de restricción dentro del genoma de esta especie. La importancia de este análisis es que permite en forma relativamente sencilla conocer la variabilidad del genoma, cuando no se dispone de un genoma de referencia. Por otro lado, el análisis de esta información permite conocer la variabilidad y consanguinidad de la población, además de los marcadores que podrían estar asociados a crecimiento corporal.

De esta forma se pudo comprobar que la consanguinidad población es cercana a un 25 %. La variabilidad de este parámetro presenta una distribución uniforme con una moda en 0, ello permite explicar que una proporción de la población se ha generado en base a cruzamientos entre parientes (Figura 3). Ello es una explicación plausible cuando se considera las condiciones productivas en Chile, considerando que es una especie introducida durante los años 90, y donde no ha existido ingreso de nuevos ejemplares como reproductores hacia Chile.

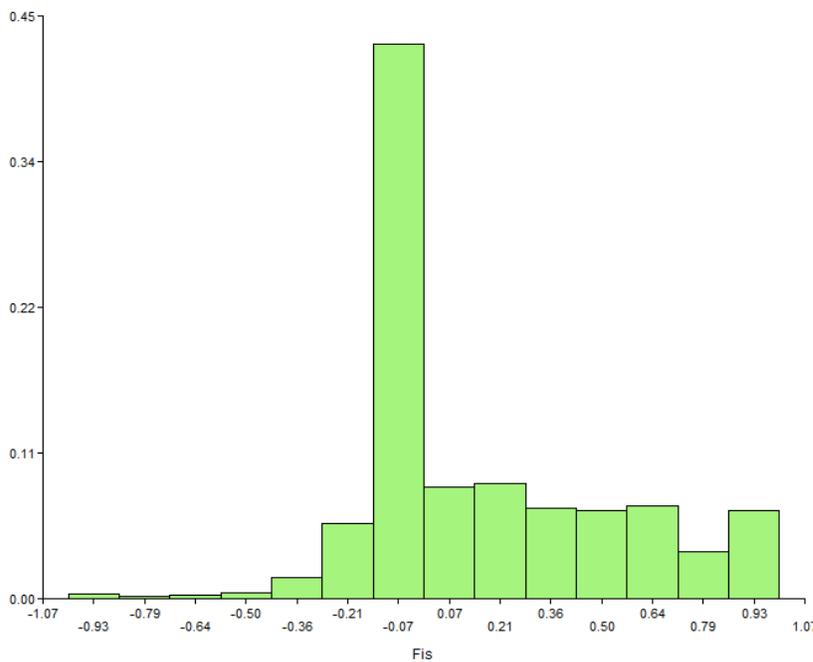


Figura 7.- Distribución de la consanguinidad para cada marcador evaluado.

Por otra parte, el desarrollo de estos marcadores permite estudios poblacionales más acabados en esta especie, debido a la determinación del pedigree de la población. Ello con el objetivo de disminuir el incremento de la consanguinidad ya generada. Estos marcadores permiten la implementación de programas de mejoramiento genético, lo que incide directa

Marcadores asociados a crecimiento.

Las diferencias alélicas entre poblaciones o grupos de individuos pueden servir para determinar su proximidad a loci de efecto cuantitativo para crecimiento corporal, cuando la distancia genética medida como F_{st} , es mayor a un umbral determinado. De esta forma se midió la distancia genética, para cada loci obtenido en el análisis (más de 23000 marcadores,. La corrección se realizó considerando a Antao, (2010). La figura 5 presenta la distribución de frecuencias de F_{st} , entre el grupo de tamaño corporal pequeño y grande. Como se puede apreciar, en el cuadro, existe una proporción significativa de marcadores asociados a crecimiento corporal con valores de F_{st} sobre 0.5. Este resultado indica que es factible utilizar marcadores para seleccionar animales en base a alelos que confieren el alto crecimiento. Este resultado inédito permite el desarrollo de programas de mejoramiento genético en la región, para crecimiento corporal.

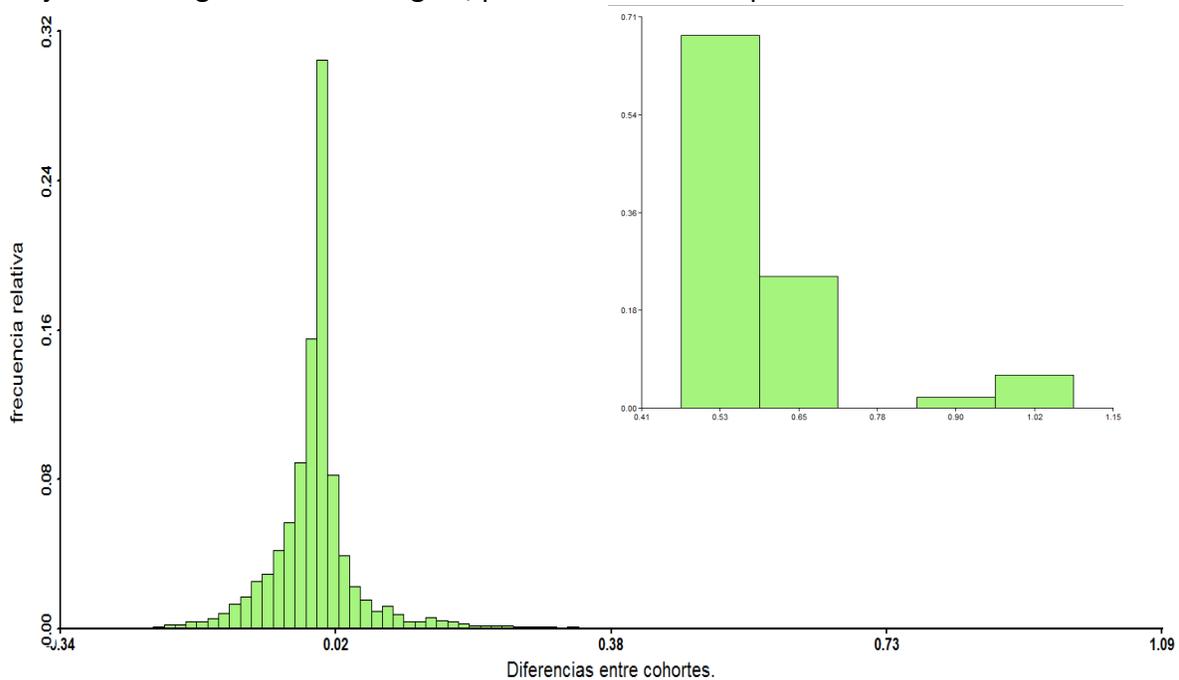


Figura 8.- Distribución de F_{st} para 23000 SNPs obtenidos mediante secuenciamiento en zonas cercanas a sitios de restricción.

Los productos asociados al proyecto son:

- 9) Determinación de parámetros genéticos poblacionales de la especie *Seriola lalandi* en poblaciones chilenas naturales entre la II y IV Región a través de microsatélites. LV REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CHILE.
- 10) Estructura genética de poblaciones chilenas de *Seriola lalandi* para la diversificación de la acuicultura nacional en el norte de Chile. IV Congreso Nacional de acuicultura.
- 11) Genetic structure of Chilean populations of *Seriola lalandi* used for the implementation of breeding programs using microsatellite data. Aquaculture conference: To the Next 40 Years of Sustainable Global Aquaculture.
- 12) Development of sustainable breeding programs in the abalone (*Haliotis rufescens*) for weight gain, using genotyping by sequencing. Aquaculture conference: To the Next 40 Years of Sustainable Global Aquaculture.
- 13) Developing molecular markers for population and quantitative genetic analysis of *Seriola lalandi* using transcriptome sequencing. PAG, XXXIII. San Diego.
- 14) Artículo sometido a referato en revista ISI. Estructura genética de poblaciones chilenas de *Seriola lalandi* para la diversificación de la acuicultura nacional en el norte de Chile. Gonzalo Fernández, Daniela Cichero, Ana Jedlicki & Víctor Martínez. Latinamerican journal of aquaculture research.
- 15) Tesis de pregrado; “Expresión de genes durante el desarrollo embrionario y larval en *Seriola lalandi*”. Veronica Barra.
- 16) "Using transcriptome sequencing for "*de novo*" marker discovery in captive populations of *Seriola lalandi*". “Diversification of Chilean Aquaculture: Development of nutrition research for *Seriola lalandi* and others native marine species”, Octubre, Temuco, Chile.

Presentaciones en congreso por orden cronológico

LV REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CHILE.

Resumen:

Determinación de parámetros genéticos poblacionales de la especie *Seriola lalandi* en poblaciones chilenas naturales entre la II y IV Región a través de microsatélites. Determination of genetic population parameters of the species *Seriola lalandi* in natural Chilean populations from the II to IV region through microsatellite amplification. Gonzalo Fernández, Daniela Cichero, Ana Jedlicki, Yasna Molina y Víctor Martínez. Financiado por proyecto FIC Atacama N° 121017019102035.

La diversificación de productos acuícolas ha cobrado importancia en Chile durante los últimos años. De esta manera es que en la II Región, la producción de la Palometa o Dorado (*Seriola lalandi*) se ha visto impulsada, sin embargo, el escaso conocimiento disponible limita el proceso de producción industrial de este recurso. A partir de esta situación, nuestro grupo se enfocó en definir la estructura poblacional de los peces actualmente usados como reproductores para la producción industrial de *Seriola lalandi* en la empresa Acuinor. Estos parámetros poblacionales se determinaron por medio de marcadores moleculares tipo microsatélites informados en trabajos previos. Se han genotipado sobre 80 individuos para más de 10 marcadores. En este sentido, se obtuvo un promedio de 13.8 alelos por locus y se estimó que 6 alelos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los valores para el coeficiente de endogamia (Fis) demostraron que esta es una población con exceso de heterocigotos. Los resultados de este trabajo serán usados para mantener el "pool" genético inicial en el proceso productivo de *Seriola lalandi*.

Se agradece a la empresa Acuinor por facilitar las muestras de *Seriola lalandi*.

IV Congreso Nacional de acuicultura

Estructura genética de poblaciones chilenas de *Seriola lalandi* para la diversificación de la acuicultura nacional en el norte de Chile.

Gonzalo Fernández¹, Daniela Cichero¹, Ana Jedlicki¹ & Víctor Martínez¹.

¹ FAVET-INBIOGEN. Dpto de Fomento de la Producción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

Avda Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile.

Corresponding author: vmartine@u.uchile.cl FIC Atacama N° 121017019102035.

Resumen. *Seriola lalandi* es una especie de gran potencial acuícola en Chile, sin embargo, poco se sabe sobre la estructura genética de las poblaciones chilenas. Para evaluar esto, 27 microsatélites previamente publicados para especies del mismo género fueron utilizados. Doce marcadores fueron adecuados para evaluar la variabilidad genética en *Seriola lalandi*, demostrando la mayoría desviaciones al equilibrio de HW, con endogamia moderada ($F = 0,12$). Análisis utilizando el software STRUCTURE demostraron la presencia de “admixture” con diferentes niveles de ascendencia en cada individuo considerando al menos 2 poblaciones. Esto puede explicarse por el comportamiento migratorio exhibido por la especie, el cual posibilita el apareamiento entre diferentes poblaciones en pequeños grupos de animales. Esta especie tiende a mostrar un comportamiento grupal, de modo que no es inesperado que exista apareamiento entre parientes dentro de pequeños grupos de peces. Considerando que el sistema de producción se basa en la captura de individuos provenientes de poblaciones naturales (pesquerías), conocer la variabilidad genética es importante para asegurar un sistema de producción sostenible. Nuestro estudio es el primero en proporcionar estimaciones de la diversidad genética de las poblaciones chilenas de palometa, siendo esto la base para la gestión de la diversidad genética de las poblaciones productivas y naturales.

Palabras clave: *Seriola lalandi*, estructura poblacional, diversificación acuícola.

Aquaculture conference: To the Next 40 Years of Sustainable Global
Aquaculture.

Genetic structure of Chilean populations of *Seriola lalandi* used for the implementation of breeding programs using microsatellite data.

Authors & affiliations:

**Fernandez, G., Cichero D, Patel, A. V. Martínez. FAVET-INBIOGEN.
UNIVERSIDAD DE CHILE.**

Abstract: (Your abstract must use **Normal style** and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

Seriola lalandi has been recognized as a potential aquaculture species in Chile, however, little is known about the genetic structure of local populations. This is important, as the current production system is based on an initial wild catching and ill management of these stocks can cause reduced genetic variability. To assess the genetic structure of local *S. lalandi* we evaluated 27 published microsatellite markers developed from genomic libraries of other species of the genera. However only 12 markers could be used to properly assess the populations, most of these markers showed deviations from HW equilibrium with moderate inbreeding ($F=0.12$). This species tends to show schooling behavior, so it is not unexpected a likelihood of mating between relatives within small groups of fish. The population structure was assessed using software STRUCTURE, showing the presence of admixture with varying levels of individual ancestry. This was seen in both populations, without significant genetic differentiation. This may be explained by the migratory behavior, with mating's between different populations likely to happen in small groups. Management of aquaculture resources is essential to secure a sustainable production system; this study is the first to provide estimates of genetic diversity of Chilean populations of Yellowtail Kingfish. Considering the paucity of information of species-specific markers, we are further developing a set of SNP markers that are being obtained from an RNAseq experiment. This will help our understanding of the structure of the population as well as the rates of inbreeding and progeny distribution in communal rearing.

The funding from the GORE-ATACAMA and the fund for competitive innovation (FIC) is greatly acknowledge.

Development of sustainable breeding programs in the abalone (*Haliotis rufescens*) for weight gain, using genotyping by sequencing.

Authors & affiliations:

Martinez, V. & G. Fernandez. FAVET-INBIOGEN. Universidad de Chile.

Abstract: (Your abstract must use **Normal style** and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

The aquaculture of the red abalone has been established as an important source of income in the north of Chile since the last decade. However, there is little information regarding the development of breeding programs, considering the paucity of information of markers and their association with important traits such as growth rate. In this work, we used a genotyping by sequencing strategy, in order to develop markers for constraint the rates of inbreeding, as well for selecting increased growth rate. We sequenced individuals showing (high or reduced) growth rate, obtained from a commercial population. The groups differed in more than 7 times their body weight. This resource population is unique for mapping regions of the genome that are either causative or in LD with the novo markers. We firstly, sequence individuals at a high coverage (100x) in order to develop a de novo consensus sequence in regions nearby restriction sites. This is due to the paucity of sequence data in this species. Thereafter we sequenced individuals with the necessary coverage (10x), which are expressing the differential growth rate. This coverage is sufficient in order to account for sequencing errors. Altogether, we discover more than 23 thousands polymorphic SNPs in the commercial population. The markers reveal a relatively large rate of inbreeding in the population that reached about 20 percent after the introduction of this species in Chile. A relatively large proportion of markers show a F_{is} over 50%. The distribution of markers that show significant difference in allelic frequencies between the groups was asymmetric, with a number of markers in LD, both between them as well as with putative QTL explaining growth rate. About 10% markers explain a significant difference in growth rate. The markers were validated using multiplex high resolution melting approach. These markers will be used for developing breeding programs at a commercial level, for sustained rates of genetic gain for growth rate as well as for accounting for inbreeding rates in the commercial setting. The funding from the GORE-ATACAMA and the fund for competitive innovation (FIC) is greatly acknowledge

Congreso PAG 2014 (enviado)

Developing molecular markers for population and quantitative genetic analysis of *Seriola lalandi* using transcriptome sequencing.

Martinez, V., Jelicki, A., Barra, V., & Patel, A.

FAVET-INBIOGEN. Avda SANTA ROSA 11735.

FAX +562 2978 56 11. vmartine@u.uchile.cl FUNDED by FIC ATACAMA.

Developing breeding programs in new aquacultural species, such as *Seriola lalandi* is hampered by the lack of sufficient genomic resources required for assessing broodstock relationship. This is very important in marine species where it is not possible to keep family records during the first stages of development, due to communal spawning. We observed that when using markers from related *Seriola* species lead to an excess of homozygotes, likely due to the presence of mutations at primer sites. We have used whole body transcriptome sequencing of larvae (in excess of 60 millions reads per individual) in order to; Develop a marker panel of microsatellites and SNPs and to assess differential expression between normal and deformed individuals. Using *de novo* transcriptome assembly, 60K SNPs segregating, 10K indels and 3k microsatellites were discovered. A marker panel of 12 microsatellites and 24 SNPs was validated *in vivo* using broodstock DNA data. A large number of genes appear to be differentially expressed, between normal and deformed individuals, being interesting those related to jaw formation. Glycolysis, purine and fatty acid metabolic pathways could be predicted using KEGG. These results show the importance of further assessing the transcriptome of *S. lalandi*, in order to characterize the biology and performing sound breeding programs.

Papers enviados en revisión.

Estructura genética de poblaciones chilenas de *Seriola lalandi* para la diversificación de la acuicultura nacional en el norte de Chile.

Gonzalo Fernández¹, Daniela Cichero¹, Ana Jedlicki¹ & Víctor Martínez¹.

¹ FAVET-INBIOGEN. Dpto de Fomento de la Producción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

Avda Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile.

Corresponding author: vmartine@u.uchile.cl

Resumen. *Seriola lalandi* es una especie de gran potencial acuícola en Chile, sin embargo, poco se sabe sobre la estructura genética de las poblaciones chilenas. Para evaluar esto, 27 microsatélites previamente publicados para especies del mismo género fueron utilizados. Doce marcadores fueron adecuados para evaluar la variabilidad genética en *Seriola lalandi*, demostrando la mayoría desviaciones al equilibrio de HW, con endogamia moderada ($F = 0,12$). Análisis utilizando el software STRUCTURE demostraron la presencia de “admixture” con diferentes niveles de ascendencia en cada individuo considerando al menos 2 poblaciones. Esto puede explicarse por el comportamiento migratorio exhibido por la especie, el cual posibilita el apareamiento entre diferentes poblaciones en pequeños grupos de animales. Esta especie tiende a mostrar un comportamiento grupal, de modo que no es inesperado que exista apareamiento entre parientes dentro de pequeños grupos de peces. Considerando que el sistema de producción se basa en la captura de individuos provenientes de poblaciones naturales (pesquerías), conocer la variabilidad genética es importante para asegurar un sistema de producción sostenible. Nuestro estudio es el primero en proporcionar estimaciones de la diversidad genética de las poblaciones chilenas de palometa, siendo esto la base para la gestión de la diversidad genética de las poblaciones productivas y naturales.

Palabras clave: *Seriola lalandi*, estructura poblacional, diversificación acuícola.



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EXPRESIÓN DE GENES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVAL
EN *Seriola Lalandi***

Verónica Barra Valdebenito

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: Dr. VÍCTOR MARTÍNEZ

Universidad de Chile

Financiado por FIC Atacama N° 121017019102035.

SANTIAGO, CHILE

2013

VI. Impacto V/s Impacto esperado

El impacto de los resultados esta asociado al uso de estas herramientas en la región. De esta forma, fue posible demostrar la factibilidad del uso de herramientas genómicas para el diagnostico poblacional y para el desarrollo de marcadores moleculares. La información obtenida sentó las bases de nuevos proyectos en la región en abalones y en *Seriola lalandi*.

VII. Conclusión

En este proyecto se desarrollaron las bases moleculares para poder manejar poblacional y productivamente las 2 especies más importantes en acuicultura en la región. Los resultados indican que las poblaciones pueden estar sometidas a consanguinidad por lo cual se hace necesario manejarlas apropiadamente considerando el uso de los marcadores moleculares desarrollados por el proyecto FIC. Ello con el objetivo de disminuir las amenazas asociadas a la expresión de genes deletéreos que podrían generar problemas productivos en largo plazo, al no existir una adecuada política de manejo de los recursos, en la región de Atacama.