



Universidad  
Católica del Norte



PONTIFICIA  
UNIVERSIDAD  
CATÓLICA DE  
VALPARAÍSO

## **PROGRAMA COOPERATIVO DOCTORADO EN ACUICULTURA**

### **PROYECTO DE TESIS DOCTORAL**

**“Caracterización genómica de la edad de maduración en machos de la cepa Lochy de salmón del Atlántico (*Salmo salar*)”**

ALUMNO: Rivera Patricia Margarita

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Cristian Araneda

CO-DIRECTOR DE TESIS: Dr. José Gallardo

Marzo 2021

## **TABLA DE CONTENIDOS:**

RESUMEN	3
MARCO TEÓRICO	4
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	12
HIPÓTESIS DE TRABAJO	14
OBJETIVOS	14
GENERAL	14
METODOLOGÍA	15
RESULTADOS ESPERADOS	19
LITERATURA CITADA	20
TRABAJO ADELANTADO	24
PLAN DE TRABAJO	25
PRODUCTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN: PLAN DE PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS	26
RECURSOS DISPONIBLES	27

## RESUMEN

Lochy es una cepa domesticada de Salmón del Atlántico que tiene origen en poblaciones silvestres de Escocia. Esta cepa se caracteriza por presentar un ciclo biológico corto de tres años, con un rápido crecimiento en el mar, pero también con una mayor incidencia de peces maduros precoces. Esta característica de maduración temprana se observa tanto en los reproductores que completan su ciclo exclusivamente en agua dulce, como en aquellos que se engordan en agua de mar, lo que limita su uso en condiciones productivas en comparación con otras cepas que tienen bajos niveles de maduración en la cosecha. Por ejemplo, se ha observado que en Lochy un 30 % de la población de machos y 5% de la población de hembras aproximadamente maduran al año 2 en peces que completan su ciclo en agua dulce mientras que, en agua de mar, los altos niveles de maduración llevaron a muchas compañías a eliminar esta cepa de sus planteles de engorda. A pesar de que la maduración sexual temprana en cultivos de salmón del Atlántico puede ser controlada en gran parte mediante la manipulación del fotoperíodo, el fenómeno persiste y afecta la economía de las piscifactorías, obligando a las empresas a buscar alternativas de control de la maduración. Del estudio de los determinantes genéticos de la maduración en salmón del Atlántico se conocen algunos genes y polimorfismos que determinan diferencias en maduración temprana y tardía, y entre poblaciones silvestres y domesticadas, brindando un nuevo enfoque para controlar este fenómeno. La presente investigación tiene por objetivo general: Caracterizar genómicamente la edad de maduración en machos de la cepa Lochy de salmón del Atlántico para identificar individuos con genotipos de maduración temprana y tardía que permitan prevenir los efectos perjudiciales de maduración en el campo. Para alcanzar este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos: 1. Comparar la expresión global de genes en peces machos de maduración temprana y no maduros de la cepa Lochy cultivados en agua dulce; 2. Identificar polimorfismos asociados a la edad de maduración en la cepa Lochy en peces cultivados en agua de mar. Para el objetivo específico 1, se propone analizar los cambios de expresión global de genes en cerebro, gónada e hígado, por las implicancias que estos órganos tienen en el proceso de maduración y, efectuar comparaciones entre animales de maduración temprana y no maduros para cada tejido; para el objetivo 2 se propone realizar un estudio de asociación genómico (GWAS) con peces machos maduros y no maduros provenientes de un centro de cultivo de agua de mar. Los resultados esperados de este trabajo de tesis para cada objetivo respectivamente son, la identificación de genes y polimorfismos asociados con la edad de maduración sexual en la cepa Lochy en peces de maduración temprana y no maduros.

## MARCO TEÓRICO

### 1. Producción de salmón del Atlántico en Chile

Hoy en día, Chile es el segundo productor mundial de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) después de Noruega. La magnitud de la importancia productiva de la especie se refleja en la cifras de la FAO (2020), donde se constata que en el 2018 en Chile se produjeron 661.138 toneladas de esta especie, convirtiéndose en el segundo producto más exportado en el país después del cobre, con cosechas que en el 2019 alcanzaron las 701.984 (SERNAPESCA, 2020); además, de acuerdo con las estadísticas del BCENTRAL (2020), el retorno por concepto de exportación conjunta de salmón del Atlántico y salmón coho a mayo del 2020 representó \$288 millones, lo que posiciona a esta industria como factor clave dentro la economía chilena.

### 2. Ciclo de vida del Salmón del atlántico

El salmón del Atlántico es una especie anádroma cuyo ciclo de vida (Fig. 1), en estado silvestre, puede comprender una fase de reproducción y crianza en agua dulce y una de crecimiento e inicio de la maduración sexual en el océano (Webb et al., 2007, Mohamed et al., 2019). Sobre este patrón general existe algunas estrategias alternativas, desarrolladas principalmente por machos, que son muy exitosas en el ambiente natural tales como: 1) La maduración sexual en agua dulce por machos precoces parr, 2) La maduración sexual de peces smolt conocidos como “jacks” que maduran precozmente en agua dulce previo al período de transferencias o a los que alcanzan un tamaño corporal de alrededor de 0,5 kg en el mar (Guerrero-Tortolero & Bromage, 2008); 3) la maduración de peces conocidos como “grilses”, que alcanzan la maduración después de 1,5 años en el mar con un tamaño típicamente de 2 a 5 kg (Whalen & Parrish, 1999) citados por (Geir Lasse Taranger et al., 2010). En todos los casos antes descritos, la reproducción y desove ocurre en el otoño de tal forma que, los huevos se incuban en el sustrato de grava durante el invierno y eclosionan después de dos o tres meses dependiendo de la temperatura del agua (Jonsson & Jonsson, 2009). Al transcurrir un año desde la eclosión, los juveniles de una población típica de esta especie se trasladan como smolts al océano en una larga migración y, después de 1 a 5 años regresan con un alto grado de fidelidad a los ríos de origen para desovar e iniciar un nuevo ciclo (Thorstad et al., 2011).

La presencia de las diferentes estrategias reproductivas y de maduración en los peces en una población silvestre de salmón del Atlántico, es un predictor confiable de la diversidad genética (Vähä et al., 2007)). Es decir, para mantener la sostenibilidad natural de la especie la maduración sexual en los salmones se produce de forma temprana o tardía en distintas proporciones de individuos tanto en agua dulce como en el mar (Fjellidal et al., 2018). Esta variabilidad es común y forma parte de las estrategias de vida del salmón del Atlántico para perpetuar la especie y mantener la diversidad genética.

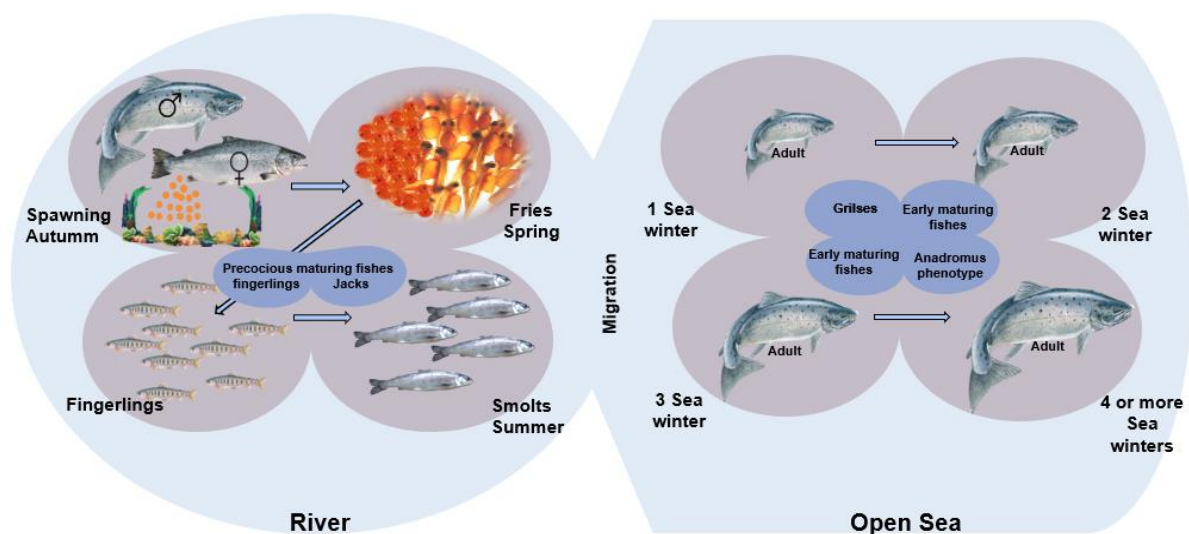


Fig 1. Ciclo de vida de salmón de Atlántico.

### 3. Maduración en poblaciones domesticadas de *Salmo salar* y sus implicaciones productivas

La variación de los fenotipos de maduración descritos en poblaciones silvestres de salmón del Atlántico, terminan siendo perjudiciales en algunos casos en poblaciones domesticadas. Por ejemplo, la maduración temprana principalmente en etapas de engorda previas a la cosecha, afectan la rentabilidad de las producciones comerciales, pues viene asociada a la expresión de características sexuales secundarias productivamente indeseables c. También se ha observado perjuicio debido al uso de reservas corporales para la formación de gametos (Taranger et al., 2010), a la disminución del crecimiento y la degradación de la carne de los peces (Peterson & Harmon, 2005). Estas circunstancias, en conjunto, dificultan no solo la rentabilidad de las pisciculturas, sino también el manejo, cuidado y supervivencia de los animales (Ayllon et al., 2019).

Los fuertes impactos negativos ocasionados por la presencia de elevados porcentajes de animales con maduración temprana son más evidentes en los entornos comerciales a gran escala. Good & Davidson (2016) describen un grave desastre productivo en un sistema de cultivo en tierra donde se registró un 80% de salmones machos que maduraron tempranamente en el tiempo de cosecha, cuando pesaban entre 4 a 5 kg, obligando a los piscicultores a cerrar sus instalaciones. En cuanto a economía se refiere, McClure et al. (2007) estimaron pérdidas significativas por concepto de hasta \$24 millones de dólares en el 2002 en la industria salmonera de New Brunswick – Canadá por dicho fenómeno. Como se nota en ambos casos, la maduración temprana puede dejar muchas veces puede dejar secuelas económicas irremediables.

La incidencia de individuos con maduración temprana en poblaciones domesticadas se ve influenciada por los propios objetivos productivos, ya que la industria busca obtener animales con mayor peso corporal en menor tiempo. McClure et al. (2007) describen los principales factores de riesgo que provoca una madurez adelantada en los salmones, entre los que figuran la intensidad de la alimentación con dietas con elevado contenido de grasas, la manipulación exagerada de los regímenes de fotoperíodo para obtener puestas desfasadas, las diferencias de temperatura en el agua, entre otros. Como se nota, son las mismas gestiones de manejo de los cultivos con ambiente controlado las que contribuyen al riesgo de la maduración temprana, por lo que las pisciculturas se ven en la necesidad de acudir a otras alternativas de control.

#### 4. Fisiología y factores que influyen en la maduración en salmón del Atlántico.

La maduración es un proceso gobernado intrínsecamente por los genes, la composición corporal, el estado metabólico y, por factores ambientales (Iversen et al., 2016). Los animales exhiben ritmos biológicos que suelen estar en fase con dichos factores ambientales, que pueden ser conocidos también como causas o factores próximos y últimos (Thomsom, 1950) citado por (Carillo et al., 2009). Los factores próximos afectan procesos anatómicos y fisiológicos, y los factores últimos subyacen a la adaptación y diversificación (Crampton et al., 2013).

De los factores ambientales que podrían categorizarse como próximos, el fotoperíodo es el más importante y se considera, el determinante principal de la maduración de la mayoría de teleósteos cultivados (Carillo et al., 2009), e interviene en procesos como el retraso del inicio de la madurez sexual en salmónidos (Iversen et al., 2016), el incremento de esteroides maduracionales y el desarrollo gonadal (Qiu et al., 2015). Por otro lado, el factor último de temperatura, influye en la variación de la edad y el tamaño de madurez de los salmónidos (Fleming & Reynolds, 2004) y puede alterar el momento de la ovulación (Taranger & Hansen, 1993), mientras que la competencia inter e intra específica maximiza el éxito reproductivo dentro de las limitaciones impuestas por el sexo opuesto, el entorno y la filogenia (Fleming, 1998). En conjunto, estos factores modulan los patrones de maduración y reproductivos de los salmones.

La integración de todas estas señales, especialmente el fotoperíodo con sus cambios estacionales, al ser detectadas por el cerebro de los peces (Taranger & Hansen, 1993), dan paso al inicio de la maduración y modulan los patrones estacionales de la actividad endocrinológica que regula los procesos que tienen por finalidad llegar a una óptima reproducción. Cabe recalcar que los eventos reproductivos se dan en épocas en las que los salmones determinan la supervivencia de su progenie asegurando la eclosión de sus larvas en temporadas de abundante alimento (Barson et al., 2015).

En salmónidos, así como en otros vertebrados, la glándula pineal y el cerebro desempeñan un papel relevante en la actividad del eje reproductivo, ya que desarrollan funciones receptoras, integradoras y efectoras (Muñoz-Cueto, 2009). Los fotorreceptores establecen contactos sinápticos con neuronas de segundo orden, las neuronas que abandonan el órgano pineal transmite un mensaje eléctrico en la noche que resulta de la liberación de melatonina (Falcón et al., 2011), que da paso a la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas – GnRH, a cargo de las neuronas hipotalámicas y, posteriormente, la secreción de gonadotrofinas, la hormona luteinizante - LH y la hormona folículo estimulante - FHS, las que regulan la gametogénesis y la esteroidogénesis gonadal (Carillo et al., 2009). Notamos entonces la importancia de los órganos fotorreceptores de salmónidos para la percepción de estímulos ambientales.

Refiriéndonos ahora a la acción génica del proceso. Lepais et al. (2017) y (Kjærner-Semb et al., 2018) analizaron la expresión del gen *vgll3* y otras regiones genómicas asociadas a la vía hipotalámica, sugiriendo que los aspectos conducentes al proceso de maduración sexual podrían relacionarse con la expresión de genes como el *ywhab*, así como el complejo de genes *yap/taz*, el gen *tead3*, y el gen *vgll3*. Además, gracias a los estudios de Barson et al., (2015) y Kjærner-Semb et al. (2018) se conoce que la maduración temprana promovida por gran efecto del gen *vgll3* se da por la expresión del alelo de maduración temprana de dicho gen en células de Sertolli en machos, y en células de la granulosa en hembras. Sin embargo, aún hace falta realizar más

investigaciones para conocer las funciones biológicas atribuidas a las regiones genómicas asociadas a la maduración y en que tejidos se expresan genes que participan de este proceso.

En resumen, la maduración sexual puede entenderse como el proceso en el que un animal desarrolla sus competencias reproductivas y que, comprende procesos fisiológicos influenciados por factores ambientales. El proceso de maduración sexual viene acompañado por una cascada de secreciones hormonales que modulan la función gonadal en etapas específicas y previas a la reproducción, donde la acción de la FSH se da en etapas tempranas de la gametogénesis, promoviendo la síntesis de esteroides sexuales para la proliferación espermatogonial en los machos y la progresión de la vitelogénesis en las hembras y, posteriormente, la LH actúa para la formación de esteroides para la maduración (Carillo et al., 2009).

## **5. Control de la maduración en salmón del Atlántico de cultivo**

Durante la engorda en el mar es clave mantener al salmón en una etapa inmadura para conservar la calidad del producto y asegurar un buen precio de comercialización. Por ello actualmente se han implementado diversas estrategias que ayudan a mitigar la maduración sexual. Por ejemplo, una práctica común, pero solo eficaz a corto plazo, es la eliminación o descarte de machos maduros precoces previo al ingreso al mar. Otras alternativas son las descritas por Iversen et al. (2016), quienes mencionan al manejo de factores ambientales, la inducción de poliploidía, modificaciones genéticas y, la manipulación del fotoperíodo (Qiu et al., 2015). Finalmente, recientes hallazgos sobre regiones genómicas que gobiernan el proceso de maduración en salmón del Atlántico (Ayllon et al., 2019), dan luces sobre los determinantes genéticos de este rasgo. A continuación, se discutirá con mayor detalle el uso del fotoperíodo y de marcadores genéticos para el control de la maduración sexual temprana.

### **5.1. Control de la maduración temprana por fotoperíodo en jaulas marinas y sistemas de cultivo en tierra**

Los centros de cultivo en jaulas marinas de salmón del Atlántico trabajan con protocolos de fotoperíodo con los que se busca reducir la percepción de los peces a los cambios de estacionalidad, principalmente la disminución de horas luz de verano a invierno, inhibiendo así la maduración. Ejemplos de la reducción de la maduración temprana en cultivos con distintos regímenes de fotoperíodo se pueden observar en los estudios de Taranger & Hansen (1993), quienes muestran una reducción del porcentaje de madurez de 91 a 9% en hembras y de 74 a 16% en machos tratados con luz artificial por 6 meses. También en las investigaciones de Peterson & Harmon (2005), se describe un resultado similar, con una maduración de 50% en salmones criados con luz natural y de solo un 0,8% en peces tratados con luz artificial durante 9 meses.

Más recientemente se ha investigado la efectividad de diferentes fuentes alternativas de luz artificial. Hansen et al. (2017), investigaron la persistencia de la maduración sexual temprana en un cultivo de *Salmo salar*, sometiendo a 5 grupos de peces a 5 distintas intensidades de luz LED de forma continua, luz de una fuente de haluro metálico y un control con luz natural; los resultados indican que la maduración sexual en los machos con luz natural (6,1%) se detuvo uniformemente en todas las intensidades. Con esto se comprueba la utilidad de esta fuente alternativa de luz sobre el control de la maduración que incluso actualmente es muy empleada en engorda en el mar.

Por otra parte, y dado el avance de las tecnologías de cultivo en tierra que ha permitido completar el ciclo de vida bajo estos sistemas, se ha reportado que la maduración temprana también es un problema (Qiu et al., 2015); por lo que ya han surgido algunos estudios que reportan la eficacia del fotoperíodo para controlar la maduración sexual temprana en estos sistemas. Por ejemplo, Good et al. (2016), demostraron que el salmón del Atlántico expuesto a un fotoperíodo reducido de 18 horas de luz desde la primera alimentación hasta 1 año después de la eclosión en agua dulce RAS, mostró una proporción significativamente mayor de machos maduros que aquellos expuestos a luz continua de 24 horas durante su primer año y Qiu et al. (2015), demuestran que la combinación de composición espectral, fotoperíodo e intensidad de luz se puede utilizar de manera eficaz para suprimir o retrasar el desarrollo gonadal del salmón del Atlántico mantenido en RAS. De esta forma, existen evidencias de que el fotoperíodo puede ser usado de forma eficaz para el control de la maduración temprana tanto en jaulas marinas como sistemas de cultivo en tierra.

## **5.2. Control de la maduración temprana por marcadores genéticos.**

Con la identificación de primeros marcadores genéticos asociados al rasgo de la edad de la maduración en salmón del Atlántico (Ayllon et al., 2015, Barson et al., 2015), ha surgido no solo una explicación genética a la variación previamente descrita en la maduración sexual temprana y tardía, sino que, también se sentaron las bases para iniciar un control más eficaz de la maduración temprana a través de la selección de peces que presentan genotipos de maduración tardía. En las investigaciones seminales de Ayllon et al. (2015) y Barson et al. (2015), se presume que un mecanismo de equilibrio entre los sexos mantiene los alelos de maduración temprana y tardía dentro de las poblaciones silvestres, donde el alelo para la maduración tardía (L) es dominante en hembras y el alelo temprano en machos (M). Este fenómeno sería en parte la explicación para la gran diversidad de estrategias reproductivas observada en esta especie, particularmente en los machos precoces parr, jacks y grilses. Además, este fenómeno podría explicar también porque la eliminación fenotípica de machos precoces no tiene un impacto en el control total de la maduración temprana, debido a que las hembras heterocigotas podrían mantener el alelo de maduración temprana y heredarlo a su descendencia. También permitieron identificar al locus de efecto mayor, el gen *vgll3* (vestigial-like family member 3 gene) en el cromosoma 25. Este gen explicaría entre 33 y un 39% de la variación de la edad de maduración, una inesperadamente gran proporción para un rasgo considerado como poligénico (Ayllon et al., 2015, Barson et al., 2015).

Diversos estudios de asociación genómica (GWAS) y de secuenciación de genoma completo (WGS), han permitido descubrir más variantes genéticas asociadas a la maduración sexual en diferentes poblaciones silvestres y domesticadas. Por ejemplo, Boulding *et al* (2019), identificaron otro QTL asociado a la edad de maduración en poblaciones silvestres norteamericanas. Este marcador se localiza en el cromosoma 6 y explicó el 6% de la variación del fenotipo de maduración temprana. Boulding et al. (2019), también describen que la frecuencia del genotipo early del gen *vgll3* es menor en esta población, al contrario de lo observado en poblaciones europeas donde el genotipo early es bastante común. Por otra parte, Ayllon et al. (2019) contrasta todo lo anterior al revelar que el gen *vgll3* no se asoció con la maduración en hembras en una población domesticada denominada Mowi, sugiriendo que otras regiones genómicas no identificadas relacionadas con la edad de la maduración. Recientemente, Sinclair-Waters et al. (2020) encontraron señales de asociación significativas en 28 de 29 cromosomas, incluidas dos señales muy fuertes que abarcan las regiones de genes *six6* y *vgll3* en los



cromosomas 9 y 25, respectivamente. Bajo este contexto, es necesario realizar más estudios en este campo.

Respecto de la acción genética de estas variantes sobre la fisiología de la maduración existen varias hipótesis relacionadas principalmente al gen *vgll3*. Primero, es necesario indicar que *vgll3* es un regulador de la adiposidad en vertebrados (Halperin et al., 2013). Debido a que los niveles de reservas de grasa se consideran un elemento clave en el control de la iniciación de la maduración (Thorpe et al., 1998), su asociación con la edad de la maduración en salmón del Atlántico parece clara y directa. Ayllon et al. (2015), encuentran dos mutaciones puntuales en el gen *vgll3* en el aminoácido (aa) 54 y 323. Se conoce que el haplotipo asociado con la maduración tardía o late (ej. 3 inviernos marinos) codifica para los aminoácidos Thr (Triptófano) y Lys (Lisina), mientras que los asociados a maduración temprana o early (1 invierno marino) codifican para Met (Metionina) y Asp (Ácido aspártico). A la fecha se desconoce cómo los otros marcadores asociados a la edad de maduración, tales como SNPs encontrados en los genes *ndufs4*, *rora*, *cntn4* (Sinclair-Waters et al., 2020) y otros, puedan estar implicados en el proceso de maduración sexual, por lo tanto, es indispensable seguir desarrollando investigaciones que contribuyan a este entendimiento.

Como se mencionó anteriormente, con la identificación de los marcadores asociados a la maduración descritos anteriormente, algunos Programas de Mejora Genética de salmón del Atlántico han buscado implementar el control de la maduración temprana a través de la selección de peces que presentan genotipos de maduración tardía. Este es el caso de Aquagen, cepa en la que se ha validado los QTL descritos por Ayllon et al. (2015), que controlan parcialmente el tiempo de maduración en salmones hembras y machos, 54Met<sub>vgll3</sub>-323Asp<sub>vgll3</sub> para maduración temprana y 54Thr<sub>vgll3</sub>-323Lys<sub>vgll3</sub> para maduración tardía (Aquagen, 2020), encontrando que en machos, cuantas más copias de la variante genética beneficiosa de madurez tardía (Q) tenía el pez, menor era la proporción de peces con signos externos de maduración. Otro ejemplo es lo realizado por la empresa de Salmones Camanchaca (Soto, 2019), quienes después de la selección fenotípica de animales con maduración temprana, en su plan de manejo incluyen siembras fuera de temporada, coincidentes con tiempos en los que la empresa se asegura que las señales ambientales no favorecerán una maduración adelantada en sus cepas. Este tipo de validaciones de marcadores de maduración temprana o el manejo de épocas de siembra, con aplicaciones industriales, sirven como punto de partida para continuar con estudios sobre nuevas regiones y variantes genómicas asociadas a la maduración temprana y que puedan contribuir a futuro a la comprensión de los mecanismos subyacentes a los fenotipos de maduración producidos por dichos marcadores.

A continuación, en la tabla 1, se resumen los principales genes que se han identificado con alguna influencia sobre la edad de maduración en poblaciones silvestres y domesticadas de *Salmo salar*.

**Tabla 1: Genes asociados a edad de la maduración en poblaciones silvestres y domesticadas de *Salmo salar*.**

Población/ Cepa	Origen	Gen	Cromosoma	Estadística aplicada	Metodología empleada
Silvestre	Noruega	<i>vgll3</i>	Ssa25	Modelo logit	GWAS <sup>1</sup>
		<i>akap11</i> <i>six 6</i>	Ssa09		
	Noruega	<i>vgll3</i> <i>chmp2B</i> <i>akap11</i>	Ssa25	Prueba de Cochran-Mantel- Haenszel (CMH)	GWAS <sup>2</sup>
	Francia	<i>vgll3</i> <i>akap11</i>	Ssa25	Modelo de umbral ambiental latente (LETM)	Genotipificación por secuenciación y mapa de ligamiento <sup>3</sup>
Mowi	Canadá	E2F4	Ssa10	Modelo mixto y pruebas de puntuación	GWAS <sup>4</sup>
		MDH	Ssa02		
		PQLC2	Ssa13		
		PGRC1	Ssa16		
		SYAP1	Ssa16		
		FRA10A	Ssa28		
Mowi	Noruega	C1	Ssa01	-	qPCR <sup>2</sup>
		PAPL	Ssa01		
Aquagen	Noruega	14-3-3 beta/ alpha	Ssa01	-	Análisis de expresión global de genes con RNAseq <sup>5</sup>
		<i>vgll3</i> <i>vgll3</i> , <i>mst1</i> , <i>nf2</i> , <i>tead3</i> , <i>ywhab</i> , <i>taz</i>	-		
Saint John - SJR	Canadá	<i>ropn1</i>	Ssa21	Modelo mixto y análisis de componentes principales	GWAS <sup>6</sup>
SALTAS	Tasmania	<i>lefty2</i> , <i>adpgk</i> , <i>scrib</i> , <i>ppp1r9a</i> , <i>pou6f2</i> , <i>cfap299</i> , <i>slitrk6</i> , <i>smarcd3</i>	Ssa9, Ssa29, Ssa14, Ssa24, Ssa17	Método lineal mixto	GWAS <sup>7</sup>
		<i>maggi2</i>	Ssa10,		
		<i>picalm</i>	Ssa11,		
		<i>ctnna2</i> , <i>rapgef2</i> , <i>cldn4</i> , <i>caln1</i>	Ssa09, Ssa04, Ssa05, Ssa01		
		<i>tsku</i> , <i>ser1</i> ,			

Neva River	Finlandia	<i>nlrp12</i> <i>arhgap6e</i> , <i>akap11a</i> , <i>yap1 rd3l</i>	-	-	perfiles de transcripción de nanocadenas <sup>8</sup>
Aquagen	Noruega	<i>ndufs4</i> , <i>rora</i> , <i>cntn4</i>	Ssa15, Ssa16, Ssa22	Modelo lineal mixto	GWAS <sup>9</sup>

1.(Barson et al., 2015), 2. (Ayllon et al., 2015), 3. (Lepais et al., 2017), 4. (Gutierrez et al., 2015), 5. (Kjærner-Semb et al., 2016), 6. (Boulding et al., 2019), 7.(Mohamed et al., 2019), 8. (Kurko et al., 2019), 9. (Sinclair-Waters et al., 2020)

## 6. Relación genética entre crecimiento y maduración

En los programas de cría selectiva de *Salmo salar* también se prima la selección de animales que presentan fenotipos de crecimiento rápido, lo que se torna importante al considerar que así como la maduración sexual, el crecimiento es un proceso complejo controlado por varios factores genéticos y ambientales (Gutierrez et al., 2015) y que, podría estar relacionado con la actividad génica de los procesos maduracionales. De hecho, (Gutierrez et al., 2015), detectaron niveles significativos de asociación de ambos caracteres en el Ssa13 y en otras regiones genómicas. Por otro lado, Lepais et al. (2017), estudiaron la relación entre crecimiento y maduración temprana, y observaron que en uno de los grupos de ligamiento en estudio, el QTL para el estado de maduración se colocó con el QTL para el peso de primavera, lo que indica que en esta región genómica el efecto genético que aumenta el crecimiento temprano desencadena la maduración sexual en los machos. Esta información nos da la pauta de que al estudiar el rasgo de la edad de maduración en *Salmo salar* es conveniente considerar el estudio del carácter crecimiento, pues se podría considerar la existencia de genes con efecto pleiotrópico que gobiernen en ciertas proporciones ambos caracteres.

## PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En condiciones de cultivos artificiales, tanto en agua dulce como en el mar, la característica de maduración temprana de la cepa Lochy persiste y genera implicaciones perjudiciales en los entornos comerciales, lo que condujo a muchas empresas a eliminar esta cepa de sus plantales de reproductores. Salmones Camanchaca conserva esta cepa gracias a la implementación de estrategias de control de maduración temprana. En el caso de cultivos destinados a engorda, donde el problema productivo toma mayor importancia, se aplica la siembra controlada en épocas del año que limiten la posibilidad de maduración temprana evitando la ocurrencia de 2 inviernos marinos, lo que fue posible dado la elevada tasa de crecimiento de esta cepa. A pesar de esta y otras estrategias de control, aún hay peces con maduración temprana, por ejemplo, en los salmones de 2 años que se destinan a reproducción la incidencia de esta característica es alta (Figura 2) como lo demuestra un análisis exploratorio de esta cepa en el segundo año del ciclo de agua dulce donde se revelan diferencias significativas en la proporción de peces maduros y no maduros entre familias y entre sexos (Fig. 3 y Fig. 4). Con esto se evidencia que el rasgo aún presente en esta cepa probablemente deba su expresión a un componente genético que requiere ser dilucidado, lo que lleva a plantearnos la interrogante de ¿Qué genes o polimorfismos influyen las diferencias observadas en la edad de maduración en machos de la cepa Lochy de *Salmo salar*?

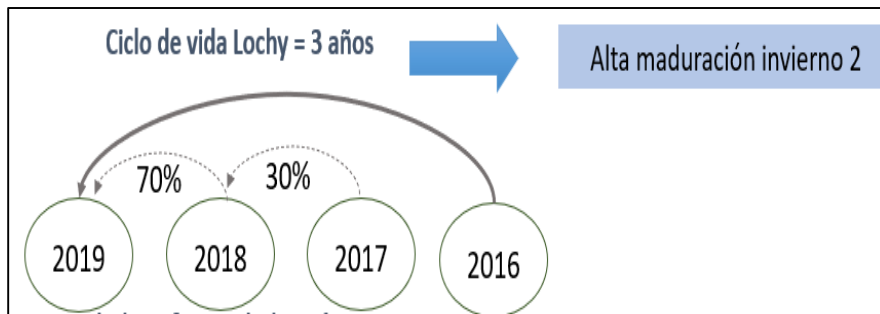


Fig 2. Esquema de la proporción de animales con maduración temprana en la cepa Lochy de Salmón del atlántico en agua dulce.

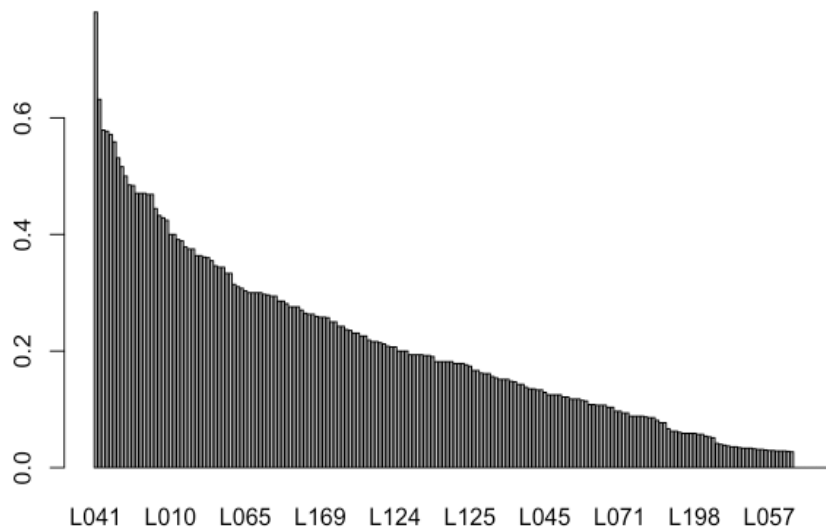


Fig 3. Variación del porcentaje de maduración temprana por familias en una población de la cepa Lochy en agua dulce.

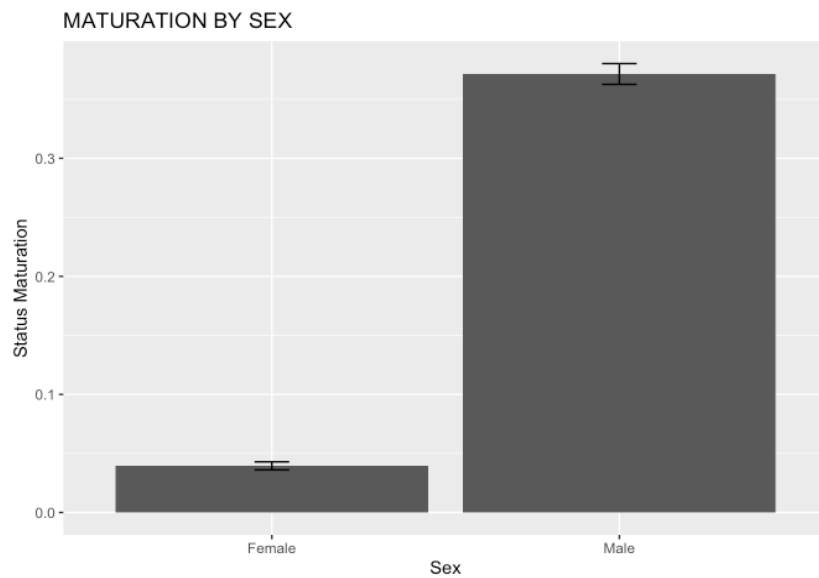


Fig 4. Porcentaje de maduración temprana por sexo en una población la cepa Lochy cultivada en agua dulce.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

- 1.- Las diferencias observadas en la edad de maduración en machos de la cepa Lochy de *Salmo salar* se asocian a la expresión diferencial de genes con función de madurez sexual en cerebro, hígado y gónada.
- 2.- Las diferencias observadas en la edad de maduración en machos de la cepa Lochy de *Salmo salar* se asocian con al menos uno de los polimorfismos detectados en este estudio.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Caracterizar genómicamente la edad de maduración en machos de la cepa Lochy de salmón del Atlántico para identificar individuos con genotipos de maduración temprana y tardía que permitan prevenir los efectos perjudiciales de maduración en el campo.

### **ESPECÍFICOS**

1. Comparar la expresión global de genes en peces machos de maduración temprana y no maduros de la cepa Lochy cultivados en agua dulce.
2. Identificar polimorfismos de nucleótido simple (SNP) asociados a la edad de maduración en la cepa Lochy en peces cultivados en agua de mar.

## METODOLOGÍA

### 1. Cepa de estudio y origen de los animales

La cepa de salmón del Atlántico que se empleará en este estudio será *Lochy*, caracterizada por tener altos niveles de maduración temprana. Los peces serán obtenidos de las estaciones de cultivo y plantas de procesamiento de la empresa "Salmones Camanchaca". Particularmente, los peces provendrán del Programa de Mejora Genética de la empresa, los que a la fecha no han incluido selección genética de maduración, pero sí eliminación de peces maduros precoces en agua dulce, lo que no ha eliminado la ocurrencia de maduración a la cosecha en agua de mar.

### 2. Toma de muestras

Para la extracción y análisis del ARN se tomarán muestras de tejidos de cerebro, gónada e hígado de los animales seleccionados, mientras que para la extracción de ADN se trabajará con muestras de tejido de la aleta dorsal.

### 3. Análisis bioinformáticos

Este estudio se empleará RNAseq y GWAS para alcanzar los diferentes objetivos, usando análisis genéticos estadísticos *ad hoc* dependiendo de la plataforma utilizada. Además, tomando en consideración las características de los archivos resultantes de los procesos de secuenciación y genotipificación, los análisis serán realizados en el supercomputador OCÉANO de la PUCV.

### 4. Descripción de métodos por objetivo

#### 4.1. Métodos para el objetivo específico 1:

##### 4.1.1. Muestras

Las muestras biológicas para la extracción del ARN y secuenciación del transcriptoma codificante serán extraídas de un total de 48 salmones machos, la mitad con maduración temprana y la otra mitad no maduros como se indica a continuación.

##### 4.1.2. Diseño experimental

Para el diseño experimental se seleccionarán salmones del segundo año del ciclo de agua dulce de la cepa *Lochy*. Los peces serán criados bajo condiciones de fotoperiodo natural y muestreados en la primavera luego de que se haya cumplido el segundo invierno. Se considerará un diseño de casos y controles con salmones machos en dos estadios de maduración, donde los casos serán los machos maduros tempranos y, los controles serán los machos no maduros. De estos peces, se extraerán muestras de tejidos de cerebro, hígado y gónada (Fig.3). El estadio de maduración temprana para los peces será valorado por ecografía y presencia de características sexuales secundarias. En el muestreo se seleccionarán en total 48 peces, de estos 24 salmones serán machos maduros tempranos y 24 machos serán no maduros.

#### 4.1.3. Construcción de librerías y secuenciación del ARN

La secuenciación del ARN de las muestras de los tejidos cerebro, hígado y gónadas de todos los animales se llevará a cabo en el secuenciador NovaSeq550 y se realizará por la empresa MACROGEN. Previo a la secuenciación se construirán las librerías genómicas empleando el método “QuantSeq” (LEXOGEN, 2020), que está diseñado para generar bibliotecas de secuencias compatibles con Illumina cerca del extremo 3', del ARN poliadenilado.

La biblioteca QuantSeq se produce a partir de un solo fragmento por transcripción, brindando la posibilidad de multiplexar una mayor cantidad de muestras en una sola corrida de una secuencia.

El método QuantSeq se resume en 5 pasos, descritos a continuación:

- Transcripción inversa: el kit emplea ARN total como entrada, de tal forma que la generación de la biblioteca comienza con el cebador que contiene la secuencia de adaptador de lectura 2 específica de Illumina.
- Eliminación de ARN después de la síntesis de la primera hebra.
- Síntesis de la segunda hebra mediante la ADN polimerasa y un partidor aleatorio que contiene la lectura 1 específica de Illumina, seguida por un paso de purificación
- Amplificación de la biblioteca: la multiplexación se puede realizar con hasta 9.216 códigos de barras combinaciones usando los 96 índices i7 disponibles y 96 índices i5.
- Secuencia: Las lecturas de NGS se generan hacia la cola de poli (A) y directamente corresponden a la secuencia de ARNm. Para señalar el extremo exacto de 3', pueden ser necesarias lecturas más largas.
- Después de la construcción de las bibliotecas, las secuencias obtenidas de ambos tejidos pasarán por un proceso de filtración y se procederá al mapeo de estas contra un transcriptoma de referencia de *Salmo salar*.

#### 4.1.4. Análisis de expresión global de genes

Posterior a la secuenciación del ARN se comparará la expresión global de genes de las 24 muestras de cada tejido de peces maduros contra las 24 muestras de cada tejido de los salmones inmaduros.

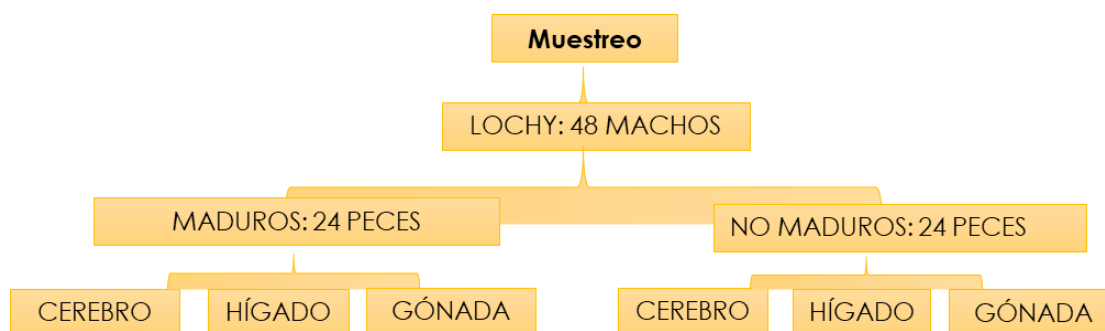


Fig 3. Diseño experimental para análisis de maduración en machos en el ciclo de agua dulce para la cepa Lochy

- La cuantificación de la expresión génica para cada tejido se realizará con el conteo de lecturas, usando el paquete DESeq2 (Love et al., 2014) de Bioconductor de R.



- Con el conteo obtenido se verificarán y compararán aquellos transcritos que se expresaron diferencialmente en animales maduros contra los peces no maduros para cada tejido.
- Para apreciar el nivel de expresión de los genes se trabajarán con heat maps
- Para comprender los procesos implicados en la maduración, se realizará una categorización funcional en términos de ontología de genes (GO – Gene Ontology), para conocer si aquellos expresados diferencialmente en cada tejido se asocian, por ejemplo, a procesos biológicos, funciones moleculares o componentes celulares como lo describe (Dörne, 2018).
- Posteriormente se trabajará con el análisis de vías de Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) para conocer la funcionalidad los genes expresados diferencialmente en cada tejido.
- Se describirá la actividad funcional, es decir los procesos fisiológicos asociados a maduración, con aquellos genes que se asocian a este proceso y que se hayan expresado diferencialmente.

## **4.2. Métodos para el objetivo específico 2:**

### **4.2.1. Población de estudio y datos fenotípicos**

Durante el otoño en dos distintos centros de cultivo de la empresa de “Salmones Camanchaca” se instalarán dos jaulas de 40 x 40 m, una por centro. En cada jaula serán sembrados 50.000 smolts machos de la cepa Lochy que serán sometidos a la aplicación de 24 horas luz con 4 focos de 600 watts por jaula desde la siembra hasta la cosecha. Los peces empleados para el GWAS serán seleccionados a partir de cada jaula en base a un diseño de casos y controles con machos de *Salmo salar*. Dado que, este estudio es parte de un análisis mayor de asociación genómica de rasgos productivos, se tendrá acceso a los peces en la cosecha, donde se seleccionarán 700 machos maduros correspondientes a los casos y 700 machos no maduros correspondientes a los controles, estadíos que serán reconocidos de acuerdo con sus características sexuales secundarias, el peso gonadal y el índice gonadosomático. De los peces cosechados se tomarán los datos de variables fenotípicas correspondientes al estado de maduración (maduro – no maduro) y crecimiento (peso del salmón desangrado WFE).

### **4.2.2. Genotipado**

Se recolectará una muestra de aleta de cada pez seleccionado del medio marino para proceder a la extracción del ADN usando un protocolo estándar. La genotipificación se realizará utilizando un Beadchip SNP 50 K previamente desarrollado por la PUCV para la empresa de salmones “Camanchaca”. Para el llamado de genotipos generados en las plataformas array de Illumina, se empleará el software GenomeStudio (Illumina, 2019). Posteriormente se controlará la calidad de las llamadas de genotipos en base a los parámetros descritos por Mohamed et al. (2019); i) SNP con una tasa de llamado de muestra <90%; ii) SNP con frecuencia de alelos menores <1% y iii) muestras con genotipos faltantes superiores al 5%.

### **4.2.3. Estudio de asociación genómico (GWAS)**

Se realizará un GWAS para diferenciar SNPs con efectos importantes en la edad de la maduración para la cepa Lochy. Previo al desarrollo del GWAS se realizará un análisis de componentes principales con la finalidad de determinar si existe algún grado de estructura poblacional y para poder identificar algún patrón de estructura familiar se realizará un análisis de parentesco genómico. Después del control de calidad se identificarán y eliminarán los peces que presenten inconsistencias que puedan sesgar los resultados del estudio. Finalmente, se realizará el

estudio de asociación genómica evaluando un SNP a la vez.

El GWAS se desarrollará con el software GenABEL (Aulchenko et al., 2007). Las estimaciones de la proporción de varianza genética (%VG) explicada por cada SNP con asociaciones significativas se establecerán ajustando todos los SNP significativos y la matriz de parentesco genómico usando el enfoque de modelo lineal mixto generalizado. La proporción de la varianza genética se calculará como el efecto cuadrado del SNP dividido por la estimación de la varianza genética total.

El modelo empleado en el GWAS se define en base al establecido por (Gutierrez et al., 2015), quienes utilizan la función “poligénica” para ajustar los modelos de estudio mediante la siguiente fórmula general:

$$Y = Xb + Sa + Zu + e$$

donde,

**Y** es el vector de observaciones fenotípicas (estado de madurez, maduro – no maduro)

**X** es la matriz de incidencia de los efectos fijos

**b** es el vector de efectos fijos (jaula) y covariable (peso WFE)

**S** es el vector de diseño para **a**

**a** es el efecto fijo del genotipo SNP

**Z** es la matriz de incidencia de los efectos aleatorios

**u** es el efecto genético aditivo aleatorio;  $u \sim N(0, A\sigma_g^2)$  siendo **A** la matriz de relaciones aditivas estimada por similitud molecular y  $\sigma_g^2$  la varianza de genotipo.

**e** es el vector de residuos aleatorios;  $e \sim N(0, I\sigma_e^2)$  siendo **I** la matriz identidad y  $\sigma_e^2$  la varianza residual.

## RESULTADOS ESPERADOS

Con la caracterización genómica de la madurez sexual en ambas cepas se espera identificar reproductores con genotipos favorables para la maduración tardía y de esta manera promover una alternativa de manejo que fortalezca la diseminación de este fenotipo dentro de programas de Mejora Genética y también para que se puedan establecer estrategias para que no ocurra la maduración temprana en el mar. Con esto se podría realizar la selección de animales que crezcan rápido, pero a la vez, que presenten el fenotipo de madurez tardía.

### **Para el objetivo específico 1: Comparar la expresión global de genes en peces machos de maduración temprana y no maduros de la cepa Lochy cultivados en agua dulce.**

Con la identificación de genes asociados a maduración y con el conocimiento de las funciones fisiológicas de estos, en la cepa Lochy se espera promover una alternativa de manejo que fortalezca nuevas estrategias de control de la maduración temprana dentro de programas de Mejora Genética, especialmente en el mar.

Además, se identificará y cuantificará el nivel de expresión diferencial de genes asociados a la edad de maduración en los 3 tejidos mencionados para conocer en cuál de estos se desarrolla una mayor actividad biológica relacionada con cada estadio (Maduro temprano – no maduro).

### **Para el objetivo específico 2: “Identificar polimorfismos de nucleótido simple (SNP) asociados a la edad de maduración en la cepa Lochy en peces cultivados en agua de mar.”**

Con el GWAS se pretende identificar SNPs altamente asociados que expliquen la mayor parte de la varianza genética y, en lo posible identificar genes candidatos u otros marcadores relacionados asociados al rasgo de la maduración en Lochy, mismos que serán ubicados dentro de los 10 marcadores más importantes.

## LITERATURA CITADA

- Aquagen. (2020). *QTL Innova LATEMAT*.
- Aulchenko, Y., Ripke, S., Isaacs, A. & Van Duijn, C. (2007). GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics*, 1294–1296.
- Ayllon, F., Kjærner-Semb, E., Furmanek, T., Wennevik, V., Solberg, M. F., Dahle, G., Taranger, G. L., Glover, K. A., Almén, M. S., Rubin, C. J., Edvardsen, R. B. & Wargelius, A. (2015). The vgll3 Locus Controls Age at Maturity in Wild and Domesticated Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Males. *PLOS Genetics*, 11(11), e1005628. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005628>
- Ayllon, F., Solberg, M. F., Glover, K. A., Mohammadi, F., Kjærner-Semb, E., Fjellidal, P. G., Andersson, E., Hansen, T., Edvardsen, R. B. & Wargelius, A. (2019). The influence of vgll3 genotypes on sea age at maturity is altered in farmed mowi strain Atlantic salmon. *BMC Genetics*, 20(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0745-9>
- Barson, N. J., Aykanat, T., Hindar, K., Baranski, M., Bolstad, G. H., Fiske, P., Jacq, C., Jensen, A. J., Johnston, S. E., Karlsson, S., Kent, M., Moen, T., Niemelä, E., Nome, T., Næsje, T. F., Orell, P., Romakkaniemi, A., Sægrov, H., Urdal, K., ... Primmer, C. R. (2015). Sex-dependent dominance at a single locus maintains variation in age at maturity in salmon. *Nature*, 528(7582), 405–408. <https://doi.org/10.1038/nature16062>
- BCENTRAL. (2020). *Publicaciones Estadísticas Banco Central de Chile*. <https://www.bcentral.cl/web/banco-central/buscador?categoria=Publicaciones/Estadísticas>
- Boulding, E. G., Ang, K. P., Elliott, J. A. K., Frank, P. & Schaeffer, L. R. (2019). Differences in genetic architecture between continents at a major locus previously associated with sea age at sexual maturity in European Atlantic salmon. *Aquaculture*, 500, 670–678. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.025
- Carillo, M., Zanuy, S. & Bayarri, M. (2009). El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control del ciclo sexual, de la pubertad y de la precocidad. In J. Espinosa de los Monteros (Ed.), *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. (pp. 175–246). Pub. Cient. Tec. FOESA - CSIC. Fundación Observatorio Español de Acuicultura
- Crampton, W. G. R., Rodríguez-Cattáneo, A., Lovejoy, N. R. & Caputi, A. A. (2013). Proximate and ultimate causes of signal diversity in the electric fish *Gymnotus*. *Journal of Experimental Biology*, 216(13), 2523–2541. <https://doi.org/10.1242/jeb.083261>
- Dörne, J. (2018). *Evaluación de patrones de expresión génica en respuesta a distintas concentraciones DHA en tejido hepático y mandibular de *Seriola lalandi* in vitro*. Universidad de Chile.
- Falcón, J., Besseau, L., Magnanou, E., Herrero, M. J., Nagai, M. & Boeuf, G. (2011). Melatonin, the time keeper: Biosynthesis and effects in fish. *Cybium*, 35(1), 3–18.
- FAO. (2020). *Fishery and Aquaculture Statistics*. [www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en](http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en).
- Fjellidal, P. G., Schulz, R., Nilsen, T. O., Andersson, E., Norberg, B. & Hansen, T. J. (2018). Sexual maturation and smoltification in domesticated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - is there a developmental conflict? *Physiological Reports*, 6(17), e13809. <https://doi.org/10.14814/phy2.13809>
- Fleming, I. A. (1998). Pattern and variability in the breeding system of Atlantic salmon (*Salmo salar*), with comparisons to other salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(S1), 59–76. <https://doi.org/10.1139/cjfas-55-s1-59>
- Fleming, I. A. & Reynolds, J. D. (2004). Salmonid Breeding System. *Evolution Illuminated* -

- Salmon and Their Relatives*, January 2004, 264–294.
- Good, C. & Davidson, J. (2016). A Review of Factors Influencing Maturation of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, with Focus on Water Recirculation Aquaculture System Environments. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(5), 605–632. <https://doi.org/10.1111/jwas.12342>
- Good, C., Weber, G. M., May, T., Davidson, J. & Summerfelt, S. (2016). Reduced photoperiod (18 h light vs. 24 h light) during first-year rearing associated with increased early male maturation in Atlantic salmon *Salmo salar* cultured in a freshwater recirculation aquaculture system. *Aquaculture Research*, 47(9), 3023–3027. <https://doi.org/10.1111/are.12741>
- Guerrero-Tortolero, D. A. & Bromage, N. (2008). Growth and maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations with different grilse proportions under natural photoperiod and superimposed nighttime light. *Aquaculture*, 285(1–4), 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.045>
- Gutierrez, A. P., Yáñez Ez, J. M., Fukui, S., Swift, B. & Davidson, W. S. (2015). Genome-Wide association study (GWAS) for growth rate and age at sexual maturation in atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS ONE*, 10(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119730>
- Halperin, D. S., Pan, C., Lusis, A. J. & Tontonoz, P. (2013). Vestigial-like 3 is an inhibitor of adipocyte differentiation. *Journal of Lipid Research*, 54(2), 473–481. <https://doi.org/10.1194/jlr.M032755>
- Hansen, T. J., Fjellidal, P. G., Folkedal, O., Vågseth, T. & Oppedal, F. (2017). Effects of light source and intensity on sexual maturation, growth and swimming behaviour of Atlantic salmon in sea cages. *Aquaculture Environment Interactions*, 9, 193–204. <https://doi.org/10.3354/AEI00224>
- Illumina. (2019). *Introduction to GenomeStudio Software: Convert array data into meaningful results*. <https://www.illumina.com/techniques/microarrays/array-data-analysis-experimental-design/genomestudio.html>
- Iversen, M., Myhr, A. I. & Wargelius, A. (2016). Approaches for delaying sexual maturation in salmon and their possible ecological and ethical implications. *Journal of Applied Aquaculture*, 28(4), 330–369. <https://doi.org/10.1080/10454438.2016.1212756>
- Jonsson, B. & Jonsson, N. (2009). A review of the likely effects of climate change on anadromous Atlantic salmon *Salmo salar* and brown trout *Salmo trutta*, with particular reference to water temperature and flow. *Journal of Fish Biology*, 75(10), 2381–2447. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02380.x>
- Kjærner-Semb, E., Ayllon, F., Furmanek, T., Wennevik, V., Dahle, G., Niemelä, E., Ozerov, M., Vähä, J. P., Glover, K. A., Rubin, C. J., Wargelius, A. & Edvardsen, R. B. (2016). Atlantic salmon populations reveal adaptive divergence of immune related genes - A duplicated genome under selection. *BMC Genomics*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2867-z>
- Kjærner-Semb, E., Ayllon, F., Kleppe, L., Sørhus, E., Skaftnesmo, K., Furmanek, T., Segafredo, F. T., Thorsen, A., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Taranger, G. L., Andersson, E., Schulz, R. W., Wargelius, A. & Edvardsen, R. B. (2018). Vgll3 and the Hippo pathway are regulated in Sertoli cells upon entry and during puberty in Atlantic salmon testis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20308-1>
- Kurko, J., Debes, P. V., House, A., Aykanat, T., Erkinaro, J. & Primmer, C. R. (2019). Transcription profiles of age-at-maturity-associated genes suggest cell fate commitment regulation as a key factor in the Atlantic salmon maturation. *BioRxiv*, 10(January), 235–246. <https://doi.org/10.1101/778498>
- Lepais, O., Manicki, A., Glise, S., Buoro, M. & Bardonnnet, A. (2017). Genetic architecture of

- threshold reaction norms for male alternative reproductive tactics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports*, 7(January), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep43552>
- LEXOGEN. (2020). *No Title*. <https://www.lexogen.com/quantseq-3mrna-sequencing/>
- Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- McClure, C. A., Hammell, K. L., Moore, M., Dohoo, I. R. & Burnley, H. (2007). Risk factors for early sexual maturation in Atlantic salmon in seawater farms in New Brunswick and Nova Scotia, Canada. *Aquaculture*, 272(1–4), 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.039>
- Mohamed, A. R., Verbyla, K. L., Al-Mamun, H. A., McWilliam, S., Evans, B., King, H., Kube, P. & Kijas, J. W. (2019). Polygenic and sex specific architecture for two maturation traits in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics*, 20(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5525-4>
- Muñoz-Cueto, J. A. (2009). Cerebro y reproducción en peces: bases neurales y neuroendocrinas. In M. Carrillo (Ed.), *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. (pp. 25–71). Fundación observatorio español de Acuicultura.
- Peterson, R. H. & Harmon, P. R. (2005). Changes in condition factor and gonadosomatic index in maturing and non-maturing Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Bay of Fundy sea cages, and the effectiveness of photoperiod manipulation in reducing early maturation. *Aquaculture Research*, 36(9), 882–889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01297.x>
- Qiu, D., Xu, S., Song, C., Chi, L., Li, X., Sun, G., Liu, B. & Liu, Y. (2015). Effects of spectral composition, photoperiod and light intensity on the gonadal development of Atlantic salmon *Salmo salar* in recirculating aquaculture systems (RAS). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 33(1), 45–56. <https://doi.org/10.1007/s00343-015-4011-3>
- SERNAPESCA. (2020). *Anuarios estadísticos de pesca y Acuicultura: chile*. <http://www.sernapesca.cl/informacion-utilidad/anuarios-estadisticos-de-pesca-y-acuicultura>
- Sinclair-Waters, M., Ødegård, J., Korsvoll, S. A., Moen, T., Lien, S., Primmer, C. R. & Barson, N. J. (2020). Beyond large-effect loci: large-scale GWAS reveals a mixed large-effect and polygenic architecture for age at maturity of Atlantic salmon. *Genetics Selection Evolution*, 52(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12711-020-0529-8>
- Soto, C. (2019). *Control de maduración en Salmo salar*.
- Taranger, G. L. & Hansen, T. (1993). Ovulation and egg survival following exposure of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodstock to different water temperatures. *Aquaculture Research*, 24(2), 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1993.tb00535.x>
- Taranger, Geir Lasse, Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F. A., Dufour, S., Karlsen, Ø., Norberg, B., Andersson, E. & Hansen, T. (2010). Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 483–515. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.004>
- Thorpe, J. E., Mangel, M., Metcalfe, N. B. & Huntingford, F. A. (1998). Modelling the proximate basis of salmonid life-history variation, with application to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Evolutionary Ecology*, 12(5), 581–599. <https://doi.org/10.1023/A:1022351814644>
- Thorstad, E., Whoriskey, F., Rikardsen, A. & Aarestrup, K. (2011). Aquatic Nomads: The Life and Migrations of the Atlantic Salmon. In Ø. Aas, S. Einum, A. Klemetsen & J. Skurdal (Eds.), *Atlantic Salmon Ecology* (pp. 1–23). Blackwell Publishing Ltd.
- Vähä, J.-P., Erkinaro, J., Niemela, E. & Primmer, C. R. (2007). Life-history and habitat features influence the within-river genetic structure of Atlantic salmon. *Molecular Ecology*, 16(13), 2638–2654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03329.x>

Webb, J., Verspoor, E., Aubin-Horth, N., Romakkaniemi, A. & Amiro, P. (2007). The Atlantic Salmon. In E. Verspoor, L. Stradmeyer & J. Nielsen (Eds.), *The Atlantic Salmon: Genetics, Conservation and Management* (pp. 17–56). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995846.ch2>

## TRABAJO ADELANTADO

Para el trabajo de genotipificación, hasta el momento se tiene anticipada la fabricación del chip array de 50.000 marcadores, elaborado por la empresa Illumina y desarrollado anteriormente por la PUCV para la empresa Salmones Camanchaca.

Para el diseño del array de marcadores tipo SNPs de 50K para estudios de asociación y selección genómica en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), se utilizaron muestras provenientes de dos poblaciones de salmón del Atlántico, las cepas Lochy y Fanad. Estas muestras fueron genotipadas exitosamente sobre el Axiom salmon genotyping array de Thermo Fisher Scientific. Se seleccionaron variantes asociadas a rasgos de interés económico (crecimiento, madurez sexual, resistencia a patógenos y otros) descritos en la literatura científica y variantes polimórficas de alta calidad, comunes e informativas para las cepas Lochy y Fanad, mapeadas en posición única sobre alguno de los 29 pares de cromosomas. Finalmente, para la validación del array diseñado, se utilizaron marcadores específicos del gen determinante del sexo genético, utilizando la intensidad de la señal del marcador que aumenta si la muestra proviene de un macho y disminuye si la muestra es de una hembra.

En lo referente a la investigación se han realizado análisis exploratorios de las bases de datos proporcionadas por la empresa Camanchaca, donde se pudo constatar las marcadas diferencias en la cantidad de animales maduros entre y dentro de las familias de la cepa Lochy que se manejan en la empresa (Fig. 3 y Fig.4)

Respecto de los análisis bioinformáticos se han realizado las descargas de datos de secuencias de poblaciones silvestres de *Salmo salar*, empleadas en estudios científicos cuyos resultados ya han sido publicados. Los datos han sido procesados y han pasado por las etapas de control de calidad, poda y filtrado, con los softwares específicos para cada actividad. Además, se cuenta con la descarga de los datos de los genomas de referencia, que a futuro serán empleados para el alineamiento, mapeo y llamada de variantes; para ello se ha trabajado en un supercomputador de la empresa DELL y en un supercomputador de la Universidad de Desarrollo de Santiago.





## **PRODUCTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN: PLAN DE PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS**

Se planifica realizar al menos 2 publicaciones y un capítulo de un libro bajo los nombres tentativos de:

1. Publicación 1: Análisis de la expresión global de genes en peces con maduración temprana y no maduros de la cepa Lochy de salmón del Atlántico.
2. Publicación 2: Estudio GWAS de la edad de maduración en la cepa Lochy de *Salmo salar*.
3. Capítulo libro: Sexual Maturation in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*): A Review

## **RECURSOS DISPONIBLES**

- Convenio estudio de asociación genómico entre la Empresa de Salmones Camanchaca y el laboratorio de genética y genómica aplicada de la PUCV.
- Programa de Cooperación internacional (PCI) Chile-Suecia de la Agencia Nacional de Investigación y desarrollo de Chile (ANID) y de la Fundación Sueca para la Cooperación Internacional en Investigación y Educación Superior (STINT) a través del proyecto N°CS2018 - 7993.
- Beca de Doctorado Nacional de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) / Programa de Becas / DOCTORADO BECAS CHILE / 2021-21211159