

UCH-FC
Biotecnología
J613
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**MARCADORES SNPS PARA RASGOS DE CRECIMIENTO EN GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS COMO RESPUESTA A DIETAS CON
INCLUSION DE NUTRIENTES VEGETALES EN TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus
mykiss*)**

Seminario de Título Entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Felipe Ignacio Jilberto Vallejos

Director del Seminario de Título

Dr. Cristian Araneda Tolosa

Profesor Patrocinante

Dr. David Véliz Baeza

Agosto - 2015

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Felipe Ignacio Jilberto Vallejos

“MARCADORES SNPS PARA RASGOS DE CRECIMIENTO EN GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS COMO RESPUESTA A DIETAS CON INCLUSIÓN DE NUTRIENTES VEGETALES EN TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Cristian Araneda Tolosa
Director Seminario de Título

A blue ink signature of Cristian Araneda Tolosa, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke.

Comisión de Evaluación

Dr. Elie Poulin
Presidente Comisión

A blue ink signature of Elie Poulin, featuring a large, stylized 'E' and 'P'.

Dra. Natalia Lam Pasten
Evaluador



Santiago, 6 de Agosto de 2015.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi director de memoria de título, Dr. Cristian Araneda Tolosa por la orientación, consejos y oportunidades brindadas durante el transcurso de desarrollo del presente seminario de título.

Igualmente agradecer y reconocer a la Dra. Natalia Lam, Dra. María Angélica Larraín y Dra. Patricia Iturra por la ayuda, recomendaciones y oportunidades dadas en más de una ocasión y que fueron de ayuda tanto para el desarrollo de este seminario de título como de otras actividades de investigación. También al Dr. Rodrigo Pulgar y Dra. Verónica Cambiazo del Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica del INTA por la información dada acerca de los genes diferencialmente expresados usados para el desarrollo de este seminario.

También mis agradecimientos por los consejos y risas a quienes son y fueron en algún momento compañeros del Laboratorio de Biotecnología y Genética en Acuicultura.

Por último, mis agradecimientos a mi Familia y amistades por el apoyo y aguante dado en todo este tiempo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción	
1.1 Acuicultura de Salmónidos y Nutrición	1
1.2 SNP y Asociación de Marcadores moleculares	4
1.3 Identificación de Genes	6
1.4 HRM	7
1.5 Hipótesis	8
1.6 Objetivos	9
2. Materiales y Métodos	
2.1 Dietas	10
2.2 Peso individuos	11
2.3 Genes	12
2.4 Variables de Crecimiento	12
2.5 Análisis estadístico	13
2.6 Predicción de Valores de Cría y Estimación Parámetros Genéticos	14
2.7 Selección de familias de Trabajo	16
2.8 Extracción y medición de ADN	16
2.9 Selección EST de trabajo y Diseño partidores	17
2.10 Genotipado	18
2.11 Validación relaciones de Parentesco	19
2.12 Desequilibrio de Ligamiento	19
2.13 Análisis de Asociación	20
3. Resultados	
3.1 Peso y Variables de Crecimiento	21
3.2 Predicción de Valores de Cría y Estimación Parámetros Genéticos	26

3.3 Selección EST de trabajo y Diseño partidores	28
3.4 Genotipado	31
3.5 Validación relaciones de Parentesco	35
3.6 Desequilibrio de Ligamiento y Análisis de Asociación	39
4. Discusión	
4.1 Variación fenotípica del crecimiento	44
4.2 Genotipado y Parentesco	47
4.3 Asociación de marcadores con crecimiento	48
4.4 Relevancia Biológica SNP seleccionados en Análisis de Asociación	49
4.5 Desequilibrio de Ligamiento (LD)	54
5. Conclusiones	56
6. Bibliografía	57
7. Anexo	
Anexo 1. Protocolo de Extracción ADN.	66
Anexo 2. Archivo genotipo paquete GWAF.	67
Anexo 3. Archivo fenotipo paquete GWAF.	67
Anexo 4. Archivo Parentesco paquete GWAF.	67
Anexo 5. Línea de Comando usada en el paquete GWAF para el análisis de asociación.	67
Anexo 6. Secuencia EST y partidores de SNP seleccionados.	68
Anexo 7. Resultados prueba de partidores.	68
Anexo 8. Gradiente de Temperatura para los partidores 41_8A y 166_2B.	70
Anexo 9. Genotipo, frecuencia genotípica y alélica por SNP.	71
Anexo 10. Salida Desequilibrio de ligamiento.	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de SNP según la técnica de HRM.	7
Tabla 2. Dietas usados en el ensayo experimental.	10
Tabla 3. N° de peces por dieta y peso promedio al iniciar el ensayo.	11
Tabla 4. Comparación de variables de crecimiento (media \pm desviación estándar) de peces alimentados con dietas de reemplazo de proteínas, de lípidos y dieta control.	22
Tabla 5. Comparación de variables de crecimiento (media \pm desviación estándar) entre las truchas machos y hembras incluidas en el estudio.	23
Tabla 6. Efecto del sexo y la dieta sobre el peso y las variables de crecimiento entre las truchas incluida en el estudio.	25
Tabla 7. Valores de varianza y heredabilidad para cada Parámetro de Crecimiento.	26
Tabla 8. Distribución de Individuos y familias seleccionados para análisis de asociación según valores de cría para SGR ₃₋₁ .	27
Tabla 9. Valores de cría familias seleccionadas vs valores promedio.	28
Tabla 10. Características de los EST y SNP seleccionados para los análisis de asociación.	30
Tabla 11. Resumen de estadísticas de diversidad genética y probabilidades de exclusión de paternidad/maternidad para cada uno de los diez SNP usados en este estudio.	37
Tabla 12. Individuos que presentaron diferencias en su genotipo con alguno de sus padres conocidos.	38
Tabla 13. Análisis de asociación basado en familia para los SNP en estudio con las variables peso a los 90 días (Peso ₃) y valor de cría para ganancia de peso (PBV ΔP_{3-1}).	41
Tabla 14. Análisis de asociación basado en familia para los SNP en estudio con las variables valor de cría para las tasas de crecimiento (PBV SGR ₃₋₁ y PBV TGC ₃₋₁).	42
Tabla 15. Crecimiento y variables de crecimiento para las 5 familias con alto PBV v/s las 5 menores.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de disociación normalizada, EST 108_3A SNP T/C, validación de controles homocigoto TT, heterocigoto CT y homocigoto CC. U, individuo de genotipo desconocido asignado a genotipo CC.	32
Figura 2. Curva de diferencia en relación al genotipo TT, EST 108_3A SNP T/C, validación de controles homocigoto TT, heterocigoto CT y homocigoto CC. U, individuo de genotipo desconocido asignado a genotipo CC.	32
Figura 3. Curva de disociación normalizada, EST 108_3A SNP T/C, genotipado de padres (U) junto con controles de genotipo conocido (TT, CT y CC).	33
Figura 4. Curva de diferencia en relación al genotipo TT, EST 108_3A SNP T/C, genotipado de padres (U) junto con controles de genotipo conocido (TT, CT y CC).	34
Figura 5. Curva de disociación normalizada, EST 108_3A SNP T/C, genotipado de progenies (U) junto con controles de genotipo conocido (TT, CT y CC).	34
Figura 6. Curva de diferencia en relación al genotipo TT, EST 108_3A SNP T/C, para el genotipado de progenies (U) junto con controles de genotipo conocido (TT, CT y CC).	35
Figura 7. Probabilidad de exclusión v/s número de marcadores SNP usados, en negro (PE-1P) rojo (PE-2P), azul (PE-PP), naranja (PE-SI) y verde (PE-I).	36
Figura 8. Mapa de Desequilibrio de ligamiento (D') para los 10 marcadores SNP usados en el estudio.	39
Figura 9. Vía de Señalización de TNF. Resaltado en rojo, gen <i>pgam5</i> .	53
Figura 10. Vía de Biosíntesis Mucinas. En rojo resaltado gen <i>gcnt4a</i> .	54
Figura 11. Prueba partidores SNP 25_1, 41_8A, 89_1 y 91_4C.	68
Figura 12. Prueba partidores SNP 108_3A, 166_2B y 175_2A.	68
Figura 13. Prueba partidores SNP 55_2B, 100_1, 110_2B y 120_1.	69
Figura 14. Prueba partidores SNP 45_1, 157_2B y 103_2B.	69
Figura 15. Prueba partidores SNP 180_1.	69
Figura 16. Gradiente de temperatura (63-55°C) en fase "annealing" para SNP 41_8A.	70
Figura 17. Gradiente de temperatura (61-53°C) en fase "annealing" para SNP 166_2B.	70
Figura 18. Prueba partidores 41_8A y 166_2B con nueva temperatura de "annealing" (61°C)	70

LISTA DE ABREVIATURAS

SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (Single-Nucleotide Polymorphism)
AFLP	Polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (Amplified Fragment length Polymorphism)
QTL	Loci de caracteres cuantitativos (Quantitative Trait Locus)
EST	Secuencia expresada etiquetada (Expressed Sequences Tag)
SGR	Tasa de crecimiento específico (Specific Grow Rate)
TGC	Coefficiente de crecimiento por unidad térmica (Thermal-Unit Growth Coefficient)
PBV	Valor de Cría (Predictive Breeding Value)
PSV	Variantes de secuencias parálogas (Paralogous Sequence Variants)
MSV	Variación multisitio (Multisite Variation)
HRM	Curva de disociación de alta resolución (High Resolution Melt)
LD	Desequilibrio de ligamiento (Linkage Disequilibrium)
EPA	Ácido Eicosapentaenoico C20:5
DHA	Ácido Docosahexaenoico C22:6

RESUMEN

En la acuicultura, el cultivo de salmónidos y en específico de la Trucha arcoíris, se basa en dietas formuladas con harina y aceite de pescado. Para la industria, el ítem alimentación tiene un fuerte impacto por su alto costo, debido al uso extensivo de éstos dos insumos. Actualmente se están desarrollando dietas remplazando las proteínas y aceites de pescado por otras de origen vegetal, las cuales han mostrado su viabilidad. Aun cuando se desconoce la base genética que subyace a la tolerancia u adaptación al consumo de dietas con reemplazo de nutrientes, ha sido posible identificar genes candidatos diferencialmente expresados en respuesta al uso de nuevas dietas que incorporan proteínas y aceites de origen vegetal. En los cuales a su vez, se han identificado marcadores moleculares de tipo SNP ("Single Nucleotide Polymorphism").

Utilizando una población genealogizada de 59 familias (n=499), se midió el crecimiento en ejemplares alimentados con dieta de reemplazo de lípidos, proteínas y una dieta control (sin reemplazo de harina y aceite de pescado por componentes vegetales), durante 60 y 90 días. Se estimaron ganancia de peso, tasas de crecimiento y valores de cría para estas variables. Se realizó un análisis de asociación basado en familias para 10 marcadores SNP con los valores de cría para cada una de las variables, usando el paquete para R: GWAF ("Genome-Wide Association analyses with Family data"). Los SNP fueron genotipificados usando análisis de HRM ("High Resolution Melting"). Los resultados muestran que familias alimentadas con la dieta con reemplazo de proteínas muestran mayor tasa de crecimiento en relación al reemplazo de lípidos y la dieta control sin reemplazo ($P=0,0124$). El análisis de asociación muestra que 5 SNP asocian con rasgos de crecimiento, encontrándose en los genes: *st3gal3*, *nudt17*, *atlll*, *pgam5* y *gcnt4a*, los cuales participan de diversas vías metabólicas.

ABSTRACT

In Aquaculture, salmonids farming and specific of Rainbow trout, is based on formulated diets with fish meal and fish oil. For industry, the food item has a strong impact because its high cost, due to extensive use of these two inputs. Actually, diets are being developed replacing fish meal and fish oil, by plant-based ingredients, which have been proved feasible. Although the underlying genetic basis for the adaptation or tolerance of consumption of diets with nutrient replacement is unknown, it has been possible to identify candidate genes differentially expressed in response to the use of new diets incorporating plant-based ingredients. Which in turn have been identified SNP ("Single Nucleotide Polymorphism") type molecular markers.

Using a population of 59 families ($n = 499$), growth was measured against nutrient replacement diets (substitution diet lipids and substitution diet protein) and a control diet (without replacement of fish meal and fish oil by vegetable components) for 60 and 90 days. Weight gain, growth rates and breeding values (PBV) for these variables were estimated. An analysis of family-based association for 10 SNP markers with the PBV for these variables was performed using the package for R: GWAF (Genome-Wide Association analyzes with Family data). The SNP were genotyped using analysis of HRM (High Resolution Melting).

The results show that families fed with the diet with replacement of proteins show higher growth rate than the diet with replacement of lipids and diet control without replacement ($P = 0.0124$). The association analysis shows that five SNPs are associated with growth traits, found in the following genes: *st3gal3*, *nudt17*, *atlll*, *pgam5* and *gcnt4a*, which participate in various metabolic pathways.

INTRODUCCIÓN

1.1 Acuicultura de Salmónidos y Nutrición

Dentro de la salmonicultura nacional encontramos que la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es la segunda especie en importancia económica después del salmón del Atlántico (*Salmo salar*), y estando por sobre el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y el salmón rey (*Oncorhynchus tshawytscha*) especies que le siguen en orden de importancia (SalmonChile, 2012).

La Trucha arcoíris, al igual que el resto de las especies de salmónidos cultivados en el país es una especie carnívora, siendo alimentada con dietas basadas en proteínas y lípidos de origen animal. La que tradicional y mayoritariamente, se compone de harina y aceite de pescado. Ambos insumos son altamente demandados y consumidos a nivel mundial por no solo por la industria acuícola. En específico, para el año 2008 la acuicultura demandó el 60.8% y el 73.8% de la producción mundial de harina y aceite de pescado respectivamente (Tacon y col, 2011). Siendo la industria asociada a la producción de salmones y truchas uno de los mayores consumidores de aceite y harina de pescado, utilizando un 53.5% de estos insumos la industria de salmones y un 19.2% la de trucha arcoíris. Esta situación vuelve a la industria altamente dependiente de estos insumos. Siendo también, el ítem alimentación uno de los mayores costos para este rubro (Naylor y col, 2009).

De igual modo, si entendemos a la industria de salmónidos como una consumidora de peces más que una productora de estos, sumado al hecho de que eventualmente la demanda por aceite y harina de pescado puede superar la producción anual de estos productos, se vuelve necesario encontrar alternativas viables en pos de suplir su uso en la dieta (Hardy, 2010). Como reacción a este escenario, es que durante las últimas décadas se han desarrollado dietas alternativas a partir de diversos insumos derivados de la industria ganadera y agrícola o el uso de productos sintéticos con el fin de disminuir la utilización de aceite y harina de pescado (Deutsch y col, 2007).

El empleo de aceites de origen vegetal ha sido ampliamente probado y estudiado como alternativa de reemplazo al uso de aceite de pescado. Teniendo como principal ventaja su alta disponibilidad, costo y un aumento progresivo de su producción (Nasopoulou & Zabetakis, 2012). El uso de diversos tipos de aceites como: soja y palma (Caballero y col, 2002), colza (Pettersson y col, 2009), canola (Turchini y col, 2013), sésamo, maravilla y lino (Köse & Yildiz, 2013) han mostrado su viabilidad, indicando que pueden reemplazar el uso de aceite de pescado en distintas especies de salmónidos como la trucha arcoíris o el salmón del Atlántico sin afectar el crecimiento de estos. Sin embargo, estos mismos estudios muestran que dietas con un reemplazo sobre el 50% pueden generar una variación en la composición de ácidos grasos, mostrando una variación en la proporción de EPA y DHA (ácidos grasos poli-insaturados Omega-3); con mayores niveles de ácidos grasos de 18 carbonos como el ácido oleico, linoleico y α -linoleico, afectando la calidad de estos peces para consumo humano (Turchini y col, 2009). Observándose también, una preferencia en trucha arcoíris por dietas que usan aceite de pescado versus aquellas con algún porcentaje de aceite vegetal (Geurden y col, 2005).

En lo que respecta a la harina de pescado, la prueba de nuevos productos se ha enfocado principalmente al uso de harina de soya, probando también harina de guisante y canola. Igualmente se ha ensayado usando concentrados de proteína de soya, canola y guisante. Ensayos realizados con dietas formuladas con estos seis ingredientes bajo una misma metodología muestran que el uso de harina de canola y soya afectan negativamente al crecimiento de peces alimentados en dietas formuladas con estos insumos (para una inclusión sobre el 25% de estos nutrientes), situación no observada para el resto de los productos (Collins y col, 2012).

Aun así, los resultados sobre las consecuencias del uso de estos productos en dietas formuladas con ellos son variados. Esto debido a las diversas metodologías utilizadas y a la formulación y procesamiento de las materias primas para la producción de las dietas experimentales. Revisiones meta-analíticas muestran que un incremento en la inclusión de harina y concentrados de soya y canola disminuye la tasa de crecimiento en salmónidos, no observando efectos sobre el crecimiento para la harina y concentrados proteína de guisante (Collins y col, 2013). La principal razón de este efecto negativo sobre el crecimiento en los peces se debe a la presencia de factores antinutricionales como inhibidores de proteínasa, lectinas, saponinas y oligosacáridos (Krogdahl y col, 2010). Los que reducen la utilización de nutrientes afectando distintos procesos digestivos, la microbiota intestinal (Desai y col, 2012) y las concentraciones de aminoácidos libres en el plasma (Larsen y col, 2012). Llegando a producir enfermedades como la enteritis (Chikwati y col, 2013). Además, presentan un perfil de aminoácidos esenciales distinto a la harina de pescado por lo cual deben ser suplementados en la dieta aquellos aminoácidos esenciales presentes en cantidades deficientes (como lisina, metionina y treonina) al fin de mantener un crecimiento adecuado (Burr y col, 2012).

Aun cuando el uso de estas dietas ha sido viable, conociendo sus ventajas y limitaciones, hasta ahora se desconocen los genes involucrados y los cambios a nivel de metabolismo que subyacen a la tolerancia a estas nuevas dietas, aun cuando distintos estudios han observado una expresión diferencial de genes relacionados con el crecimiento, metabolismo y uso energía, tanto a nivel de biosíntesis de colesterol y ácidos grasos insaturados (Leaver y col, 2008) como a nivel intestinal (Morais y col, 2012) y hepático (Panserat y col, 2009; Morais y col, 2011; Iturra y col, 2012)

Al desconocer genes involucrados, se desconocen las variantes genéticas o polimorfismos asociados a estos, lo que impide estudiar por ejemplo las interacciones genotipo-dieta, dificultando la posterior selección de genotipos que toleren o mejor aprovechen las dietas con reemplazo, y limitando la selección a individuos o familias que muestran una mejor tasa de crecimiento (Overturf y col, 2013)

1.2 SNP y Asociación de Marcadores moleculares

El empleo de marcadores moleculares es un punto de partida que posibilita la realización de estudios genéticos de asociación basados en poblaciones, esto permite conocer la contribución de las variantes genéticas sobre un determinado fenotipo cuantitativo en particular (Foulkes, 2009). En este caso, el crecimiento observado como respuesta a dietas con reemplazo de proteínas y aceite de pescado por proteínas y aceites vegetales. Actualmente los marcadores más utilizados en estudios de asociación basados en poblaciones son los polimorfismos de un solo nucleótido o marcadores SNP (Foulkes, 2009). Los SNP muestran una serie de ventajas sobre otros marcadores moleculares como microsatélites o AFLP. Entre las principales, están su mayor frecuencia y distribución al azar en los genomas, siendo posible encontrar SNP cerca o dentro de un

gen, ya sea a nivel de exónes o intrónes (Ragoussis, 2009). Además, SNP ubicados en exones o secuencias cercanas a un gen son de particular interés ya que estos podrían modificar la función o expresión de un gen, pudiendo explicar así un fenotipo observado (Kim & Misra, 2007). Este tipo de SNP también son llamados SNP codificantes o cSNP (Salem y col, 2012). Otra ventaja a nivel metodológico, es que existen múltiples plataformas de genotipado que permiten analizar desde uno solo a un millón de SNP simultáneamente, dependiendo del conocimiento del genoma de la especie estudiada y el objetivo de aplicar estos marcadores (Kim & Misra, 2007). Es por esto que los SNP se han usado en diversas áreas como biología de la conservación, medicina humana y forense, mejoramiento de cultivos y acuicultura (Kumar y col, 2012).

El uso de SNP ha sido llevado a áreas de producción animal, como por ejemplo: en ganado vacuno, donde ha sido usado tanto en estudios de validación familiar (Van Eenennaam y col, 2007) como en la asociación de SNP seleccionados a un rasgos de interés productivo (Gill y col, 2009). En producción acuícola los SNP se han usado en diversas aplicaciones. Por ejemplo, en estudios para identificar genes asociados a mayor tasa de crecimiento en respuesta a dietas de origen animal en trucha arcoíris (Salem y col, 2012), en la identificación de QTL vinculados a crecimiento y respuesta a estrés en trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) (Sauvage y col, 2012), el desarrollo y caracterización de SNP en trucha arcoíris a partir de bibliotecas de EST (Boussaha y col, 2012), y la identificación de cSNP obtenidos por RNA-sequencing en genes relacionados con crecimiento en trucha arcoíris (Salem, Vallejo et al., 2012)

Los SNP pueden asociar con fenotipos de interés mediante el uso de distintos programas de análisis de asociación como PLINK (Purcell y col, 2007) o el paquete GWAF (Genome-Wide association with family data), el cual funciona en el ambiente de análisis matemático

R (Chen & Yang, 2013). Ambos programas usan como base para los análisis el genotipo y las relaciones de parentesco entre los individuos (poblaciones genealogizadas), junto las variables fenotípicas a asociarse con los SNP. Con este tipo de análisis se pueden asociar uno a más SNP a un rasgo de interés, identificando así marcadores que permitan por ejemplo, clasificar los peces entre los que su crecimiento es afectado al ser alimentado con dietas con reemplazo de nutrientes y los que no ven afectado su crecimiento en relación a una dieta control.

1.3 Identificación de Genes candidatos

Como punto de partida para analizar la relación entre el genotipo y la respuesta a dietas de reemplazo, es necesaria la identificación de genes candidatos que participen de este proceso. En el contexto de este trabajo, esta identificación fue previamente llevada a cabo mediante análisis de micro-arrays a nivel de transcriptoma hepático de trucha arcoíris en el marco del Proyecto INNOVACHile-CORFO 07CN13PBT-41. Estas truchas fueron alimentadas con una dieta control sin componentes vegetales y con dos dietas experimentales, con un 50% de sustitución de proteínas y aceites animales por vegetales, respectivamente (Navarrete y col, 2012).

Mediante la aplicación de estas tres dietas se pudo identificar una serie de EST (genes) involucrados en la respuesta a las dieta de sustitución. En resumen, para cada EST de genes diferencialmente expresados se usó la base de datos SalmonDB (Di Genova y col, 2011) para diseñar partidores y obtener amplicones entre 200 a 400 pb de tamaño. Estos amplicones fueron secuenciados en 8 individuos no emparentados para realizar la búsqueda de marcadores SNP. Posteriormente, se seleccionó un grupo de 58 individuos de trucha arco iris, padres y progenies de 10 familias, para genotificado y validación de

SNP usando espectrometría de masas (MALDI-TOF, Sequenon®), y para descartar algún otro tipo de polimorfismo asociado al ADN como PSVs o MSVs (Fredman y col, 2004). El servicio de genotipado de SNP por Sequenom® fue proporcionado por el "Centro Nacional de Genotipado" (CEGEN-ISCIII)" (www.cegen.org) en Santiago de Compostela, España. Todos estos análisis se hicieron previo al desarrollo de este Seminario de Título.

1.4 HRM

Otro método de genotipado de SNP es la técnica de análisis de HRM. Esta técnica ha sido desarrollada para detectar SNP en pequeños amplicones, teniendo como principal ventaja de ser un método de bajo costo y fácil de realizar en cualquier laboratorio que posea un termociclador para tiempo real (Wu y col, 2008). La identificación de los SNP se logra gracias al empleo fluorocromos intercalantes que pueden unirse a saturación al ADN sin inhibir la reacción de PCR y el uso de instrumentos capaces de detectar las variaciones de fluorescencia durante la construcción de la curva de disociación o "melting" (Herrmann y col, 2006). Bajo esta técnica, la detección e identificación de un SNP se produce debido a las distintas curvas de "melting" generadas por la presencia de los distintos alelos del SNP a ser identificado (Seipp y col, 2010). Con este método los SNP se clasifican de acuerdo a la diferencia de temperatura necesaria para separar los distintos alelos/bases (Liew y col, 2004) de la siguiente forma (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación de SNP según la técnica de HRM.

Clase	Cambio de Base	Diferencia de T _m en la curva de Melting	Frecuencia SNP en el genoma humano
1	C/T y G/A	>0.5°C	0.67
2	G/T y C/A	0.2-0.4 a 0.5°C	0.18
3	C/G	0.2 a 0.4°C	0.09
4	A/T	~0.1°C	0.07

1.5 Hipótesis

Con todos los antecedentes expuestos anteriormente, se plantea la siguiente hipótesis:

Genes diferencialmente expresados en respuesta a sustitución de nutrientes en la dieta presentan polimorfismos que tendrían asociación con la tasa de crecimiento en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

1.6 Objetivos

Evaluar la asociación de polimorfismos de un solo nucleótido identificados en genes diferencialmente expresados en respuesta a sustitución de nutrientes animales por vegetales en la dieta, con la tasa de crecimiento en trucha arcoíris.

Objetivos específicos

1. Estimar los parámetros de crecimiento y valores de cría en familias de trucha arcoíris alimentadas con distintas dietas de reemplazo de nutrientes animales por vegetales.
2. Validar un panel de SNP identificados en genes diferencialmente expresados en respuesta a dietas con reemplazo de nutrientes animales por vegetales en trucha arcoíris.
3. Validar las relaciones de parentesco entre los individuos de las familias a trabajar y evaluar el potencial para realizar análisis de exclusión de paternidad de un panel de SNP en trucha arcoíris.
4. Evaluar la asociación de un panel de marcadores SNP con valor de cría para variables de crecimiento en trucha arcoíris.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Dietas

Las dietas fueron producidas con las siguientes especificaciones: La primera dieta experimental, de sustitución de proteínas, fue creada un 100% de aceite de pescado y un 50% de sustitución de harina de pescado por una mezcla de harinas vegetales (girasol, gluten de maíz y soya desgrasada). La segunda dieta experimental, de sustitución de aceites, fue diseñada con un 100% de harina de pescado y un 50% de reemplazo de aceite de pescado por aceite de raps. La dieta control no consideraba sustitución alguna (100% harina y aceite de pescado) y fue utilizada como base de comparación de los resultados frente a los tratamientos experimentales en los ensayos de expresión génica realizados en el Proyecto INNOVACHILE-CORFO 07CN13PBT-41 (Tabla 2).

Tabla 2. Dietas usados en el ensayo experimental.

	Control	Proteína	Aceite
Ingredientes (g/100 g)			
Harina de Pescado	40	20	40
Aceite de Pescado	23,5	24,5	11,3
Aceite de Raps	0	0	11,3
Trigo	16,6	14	16,8
Harina de Plumas	7	7	7
Harina de Visceras	7,3	7,3	7,3
Gluten de maíz	0	13	0
Girasol	0	6	0
Soya Desgrasada	0	6,2	0
Micronutrientes	2,3	2,7	2,5
Proteína	39	39,2	39

Continúa de tabla anterior

Lípidos	29,6	29,1	28,8
Cenizas	7,1	5,3	7,1
Fibra	0,6	1,7	0,6
Humedad	10,5	7	11
Proteína Digestible (DP)	33,1	33,1	33,1
Energía Digestible (DE)	18,8	18,8	18,8

2.2 Peso individuos

Se registró el peso de 499 juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) los cuales tenían un peso inicial promedio de $268,41 \pm 72,51$ g, perteneciendo estos a 59 familias distintas. Siendo conocidas las relaciones de parentesco (padres, hijos y hermanos) entre estos. Se contó además con el registro de peso de estos individuos a los 60 y 90 días, desde que se inició el ensayo con las dietas experimentales. Todos los peces estaban identificados con un marcaje electrónico (PIT-tag). Los individuos de cada una de las familias fueron agrupados de manera que cada familia estuviera representada en cada una de las 3 dietas de trabajo (Dieta Control y dietas con reemplazo de proteínas y aceites animales, por vegetales), con un número similar de peces (Tabla 3).

Tabla 3. N° de peces por dieta y peso promedio al iniciar el ensayo.

Dieta	N° total de Peces	Peso promedio \pm D. estándar (g)
Control	158	270,79 \pm 68,09
S. Proteína	162	269,13 \pm 77,28
S. Aceite	179	265,66 \pm 72,17
Total	499	268,41 \pm 72,51

2.3 Genes

Mediante la aplicación de estas tres dietas se pudo identificar una serie de EST (genes) involucrados en la respuesta a las dieta de sustitución. Se trabajó con 38 EST, en los cuales fueron identificados 58 SNP (Proyecto INNOVACHile-CORFO 07CN13PBT-41, datos sin publicar). Se contó con la secuencia de cada EST y la ubicación de cada SNP presente en estas secuencias (Anexo 6).

2.4 Variables de Crecimiento

Para realizar el análisis de crecimiento, se utilizó el peso inicial (Peso1), el peso a 60 días de iniciados los ensayos (Peso2) y el peso a 90 días de iniciados los ensayos de alimentación (Peso3). Con los datos de peso mencionados para los tres periodos de tiempo se estimaron las siguientes variables de crecimiento usados en salmónidos (Cho, 1992): ganancia de peso (ΔP), tasa de crecimiento específica (SGR) y coeficiente de crecimiento por unidad térmica (TGC).

Ganancia de peso (ΔP): se calculó como la diferencia entre el peso inicial y el peso final de la siguiente forma:

$$\Delta P = \text{Peso}F - \text{Peso}1$$

Este muestra el incremento de peso en un periodo dado.

Tasa de crecimiento específica (SGR): fue calculada usando la siguiente fórmula (Cho, 1992):

$$SGR = \frac{\ln \text{Peso} F - \ln \text{Peso} 1}{\text{Días}} * 100$$



Este la cual muestra el porcentaje de crecimiento diario de los peces.

El coeficiente de crecimiento por unidad térmica (TGC): fue calculado según formula de Cho (Cho, 1992):

$$TGC = \frac{\sqrt[3]{\text{Peso} F} - \sqrt[3]{\text{Peso} 1}}{\sum^{\circ} C * \text{Días}}$$

Este corresponde al aumento de peso por cada unidad de temperatura.

En todas las fórmulas precedentes, el PesoF corresponde al Peso3 o el Peso2, siendo calculados los parámetros calculados para ambos periodos, de 0 a 60 días y de 0 a 90 días.

2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se desarrolló utilizando los datos de peso de todos los individuos de las distintas familias. Para los datos de peso ya mencionados, se verificó la distribución normal por medio del test de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965). Una vez realizado y solo de ser necesario, los datos se normalizaron usando alguna de las siguientes transformaciones: logarítmica ($x' = \log_{10} x$), raíz cuadrada ($x' = \sqrt{x}$) o

recíproco ($x' = 1/x$) (Zar, 2010). La homogeneidad de varianza se evaluó usando el test de Fligner-Killeen (Fligner & Killeen, 1976).

Para las variables que no pudieron ser normalizadas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952), en caso de encontrarse diferencias significativas ($P < 0.05$) estas fueron identificadas usando el test de comparaciones múltiples de Dunn (Dunn, 1964) o de Gao (Gao y col, 2008). En caso contrario se utilizó un modelo factorial de análisis de varianza (ANDEVA). Diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los promedios fueron determinadas usando el test de comparaciones múltiples de Tukey (Zar, 2010). Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando los paquetes stats, graphics y gao del ambiente de análisis matemático R para Windows (R Core Team, 2014).

2.6 Predicción de Valores de Cría y Estimación Parámetros Genéticos

Se predijeron los valores de cría y estimaron los distintos componentes de varianza y correlaciones genéticas para los distintos parámetros de crecimientos calculados (ΔP , SGR y TGC) en cada dieta. Se trabajó con un modelo animal diseñado de la siguiente manera, usando el peso inicial como una co-variable para corregir las posibles diferencias familiares en el inicio del estudio:

$$Y_{ijk} = \mu + SX_i + DA_j + \beta PE_k + a_{ijk} + e_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} : El valor por individuo de cada uno de las variables de crecimiento calculados.

μ : Promedio de la población para cada variable medida.

SX_i : Efecto fijo del sexo ($i = 1$, macho; $i = 2$, hembra).

DA_j : Efecto fijo de las distintas dietas con los cuales los peces fueron alimentados ($j = 1$, dieta control; $j = 2$, dieta reemplazo aceite; $j = 3$, dieta reemplazo proteínas)

PE_k : Peso de los individuos a los 0 días de iniciado el ensayo.

β : Coeficiente de regresión del peso a los 0 días de los individuos de la muestra respecto a las variables de crecimiento.

a_{ijk} : Valor de cría de cada individuo para las variables de crecimiento.

e_{ijk} : Efecto no estimado por la constitución genotípica del ijk -ésimo salmón (residual)

La estimación de los valores de cría para cada uno de los distintos parámetros de crecimiento, se obtuvo al resolver la siguiente ecuación matricial:

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + A \frac{\sigma_e^2}{\sigma_a^2} \end{bmatrix}^{-1} \times \begin{bmatrix} X'x \\ Z'y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b \\ a \end{bmatrix}$$

Donde: A es la matriz de parentesco, σ_a^2 es la varianza genética aditiva y σ_e^2 es la varianza residual. La matriz de parentesco (A) fue construida a partir de las relaciones de parentesco provenientes entre los distintos individuos y verificada por métodos moleculares.

La estimación de los componentes de la varianza y la heredabilidad fue calculada utilizando el set de programas MTDFREML (Van Tassell & Van Vleck, 1996) sobre la base del modelo animal presentado anteriormente.

2.7 Selección de familias de Trabajo

La selección de las distintas familias a genotipar y con las cuales posteriormente desarrollar el análisis de asociación de marcadores, fue realizada a partir de los valores de cría obtenidos para cada una de las variables de crecimiento analizadas. Se seleccionaron 40 individuos con valores de cría más alto para la variable de crecimiento usada y 40 individuos con valores de cría más bajos. Finalmente sobre la base de estos individuos se seleccionaron las familias mejor representadas, es decir, con cuatro hijos o más, en ambos extremos de la distribución de los valores de cría para realizar los subsecuentes análisis de asociación. Seleccionando 5 familias de alto PBV y 5 de bajo PBV.

2.8 Extracción y medición de ADN

La extracción de ADN de los individuos seleccionados se realizó a partir de muestras de aleta, en total de 113 individuos (90 hijos y 23 padres). La extracción de DNA se realizó mediante el protocolo desarrollado para salmónidos por Taggart (Taggart y col, 1992). El protocolo detallado de extracción se describe en el Anexo 1. La visualización del ADN extraído se realizó en geles de agarosa al 1,2% cargando 3 μ L de cada muestra, con bromuro de etidio usando un transiluminador UV (Fotodyne modelo 3-3002).

El ADN fue cuantificado usando un espectrofotómetro NanoDrop® (Modelo: ND-1000) ubicado en el Laboratorio de Ecología Molecular de la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Una vez obtenida la concentración de ADN por muestra, estas

fueron diluidas en agua ultra pura a una concentración de $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ para su uso posterior en las pruebas con los partidores diseñados para análisis de HRM, así como también en el posterior genotipado de los distintos individuos.

2.9 Selección EST de trabajo y Diseño partidores

Se trabajó sobre un grupo inicial de 35 EST en los cuales se había identificado previamente la presencia de un total de 58 SNP. El diseño de los partidores se llevó a cabo usando como base la secuencia conocida para cada uno de los distintos EST en los cuales se encontró la presencia de uno o más SNP. El diseño de los partidores se realizó utilizando los programas AmplifX 1.6.2 (Jullien, 2013) y Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Los criterios para seleccionar los EST con los cuales trabajar tuvieron relación con la generación de productos de PCR adecuados para la técnica del HMR y fueron los siguientes:

1. Presencia de SNP clase 1 o 2 (ver Tabla 2, página 9).
2. Tamaño del Amplificado de 100-150 pb.
3. Temperatura de unión de los partidores entre 58-61°C.
4. Partidores diseñados para capturar solo un SNP en la secuencia del EST.
5. Tamaño partidores entre 18-24 pb.

Para las reacciones de prueba de los partidores diseñados se utilizó un termociclador Bio-Rad MJ Mini usando Platinum® Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Todas las pruebas realizadas incluyeron el control negativo respectivo. De ser necesario, se realizó gradiente de temperatura en la etapa de hibridación a aquellos partidores que

presentaron amplificados inespecíficos. El protocolo de PCR usado fue el mismo usado posteriormente durante la etapa del genotipado y consistió en: una fase de activación de la ADN polimerasa por 2 minutos a 96°C y luego 45 ciclos de amplificación compuestos de: una denaturalización de 15 segundos a 96°C y posterior unión de partidores por un minuto a 60°C, sin etapa de extensión.

El tamaño de los fragmentos amplificados se estimó utilizando en cada gel de agarosa un estándar de número de pares de bases de 50 pb o 100 pb (Invitrogen). Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa (2%) usando buffer TBE con bromuro de etidio. Para la visualización de los amplicones bajo luz ultravioleta se usó un transiluminador UV (Fotodyne modelo 3-3002). Se tomaron imágenes de cada gel de prueba las cuales fueron registradas con una cámara fotográfica Nikon Coolpix 990.

2.10 Genotipado

El genotipado se llevó a cabo usando el equipo Eco™ Real-Time PCR (Illumina). Tanto el protocolo de PCR y HRM, la disposición de las muestras y el posterior análisis de resultados, fue diseñado y establecido usando el programa ECO™ Real-Time PCR System 4.0 (Illumina). Se utilizó la mezcla Fast EvaGreen® qPCR Master Mix (Biotium) que contiene EvaGreen®, Cheetah™ Taq ADN polimerasa, dNTPs y buffer necesarios para la reacción PCR, así como para la lectura y creación de la curva de disociación. El perfil de temperatura programado para el desarrollo de la reacción de PCR con HRM fue el siguiente: Activación de Cheetah™ Taq ADN polimerasa por 2 minutos a 96°C, 45 ciclos de amplificación con 15 segundos de denaturación a 96°C y unión de partidores por un minuto a 60°C, finalizando con un ciclo extra para la construcción de

la curva de disociación (denaturación a 95°C por 15 segundos, hibridación por 15 segundos a 55°C y denaturación a 95°C por 15 segundos).

El genotipado se dividió en tres etapas: validación y genotipado de individuos control, genotipado de hijos y genotipado de padres. Para la etapa de genotipado y validación se trabajó con duplicados y triplicados de los individuos control cuyo genotipo fue obtenido previamente por Sequenom® durante el desarrollo del Proyecto INNOVACHile-CORFO 07CN13PBT-41.

2.11 Validación relaciones de Parentesco

La validación de las relaciones de parentesco entre los distintos individuos, análisis de exclusión de paternidad y maternidad, fue realizada mediante el programa de análisis familiar Cervus 3.0 (Kalinowski y col, 2007). Con este programa se obtuvo también los estadísticos de diversidad genética a partir de todos los individuos genotipados en el estudio. Estos fueron: heterocigosidad promedio por locus observada (H_o) y esperada (H_e), contenido de información polimórfica (PIC), además de las probabilidades de exclusión de paternidad/maternidad para cada uno de los distintos marcadores usados. Además, el programa puso a prueba el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) para cada uno de los loci marcadores utilizados.

2.12 Desequilibrio de Ligamiento

La estimación del desequilibrio de ligamiento mediante la estimación de D' y r^2 ; y la obtención del mapa de LD entre los marcadores usados se obtuvo con el uso de los paquetes para R: genetics (Warnes y col, 2013) y LDheatmap (Shin y col, 2006).

2.13 Análisis de Asociación

El análisis de asociación fue llevado a cabo usando el paquete GWAF (Chen & Yang, 2013) para R. Este paquete utiliza funciones de paquetes ya existentes en R para modelar adecuadamente la correlación residual dentro de las familias en la prueba de asociación fenotipo-genotipo. Permite utilizar un panel de SNP bajo distintos modelos genéticos especificados por el usuario (aditivo, recesivo, dominante o general). En este trabajo se uso un modelo general, el cual supone que cada genotipo proporciona un aporte diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos y homocigotos por separado respecto al homocigoto para el alelo más frecuente. También, para algunos SNP debido a las frecuencias alélicas, el programa determino usar un modelo dominante. Este modelo supone que una única copia de uno de los alelos es suficiente para modificar el aporte del gen y que el ser portador de dos copias, modifica de igual magnitud. Es decir, heterocigotos y homocigotos tienen la misma probabilidad, y se comparan estos dos genotipos respecto con el homocigoto restante (Iniesta y col, 2005).

Para tener en cuenta la correlación que se da entre las familias, GWAF usa un modelo de ecuaciones de estimación generalizadas (GEE, Generalized Estimation Equation) para testear la asociación entre un rasgo continuo como el crecimiento y cada SNP bajo alguno de los modelos genéticos ya mencionados. El paquete requiere de tres archivos de entrada: archivo de genotipo (Anexo 2), archivo de fenotipo (Anexo 3) y archivo de parentesco (Anexo 4). La línea de comandos usada para llevar a cabo este modelo de muestra en el Anexo 5.

RESULTADOS

3.1 Peso y Variables de Crecimiento

Para el Peso1, Peso2 y Peso3 en cada dieta, se verificó la distribución normal y la homogeneidad de varianzas. Las variables Peso2 y Peso3 presentaron distribución normal, mientras que Peso1 fue normalizada usando la transformación logarítmica. Todos los datos mostraron homogeneidad de varianza.

Una vez comprobada la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos de peso se construyeron las variables de crecimiento (ΔP , SGR y TGC) para la población de trucha arcoíris tanto a 60, como a 90 días de iniciado el ensayo, nuevamente fueron realizadas pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza. Solo las ganancias de peso cumplieron con los supuestos normalidad y homocedasticidad (ΔP_{2-1} y ΔP_{3-1}). Las restantes variables (SGR y TGC) no cumplieron estos supuestos a pesar de utilizar transformaciones, por lo que se utilizó una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) para comparar estos promedios. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de variables de crecimiento (media \pm desviación estándar) de peces alimentados con dietas de reemplazo de proteínas, de lípidos y dieta control.

	Control	Dieta R. Proteína	Dieta R. Aceite	F ó χ^2	P-value
n	158	162	179		
Peso1	270,79 \pm 68,09a	269,13 \pm 77,28a	265,66 \pm 72,17a	0,222	0,801
Ensayo a 60 días					
Peso2	476,73 \pm 119,03a	485,39 \pm 132,62a	466,33 \pm 123,22a	0,993	0,371
ΔP_{1-2}	205,94 \pm 62,69a	216,25 \pm 67,72a	200,88 \pm 72,51a	2,282	0,103
SGR₁₋₂	0,94 \pm 0,18a	0,99 \pm 0,19a	0,94 \pm 0,26a	5,238	0,073
TGC₁₋₂	2,73 \pm 0,57a	2,87 \pm 0,58a	2,69 \pm 0,76a	5,094	0,078
Ensayo a 90 días					
Peso3	644,11 \pm 163,43ab	674,64 \pm 171,1b	622,71 \pm 149,68a	4,432	0,0124
ΔP_{1-3}	373,32 \pm 109,91a	405,50 \pm 111,79b	357,64 \pm 102,83a	8,76	1,82e-4
SGR₁₋₃	0,96 \pm 0,15a	1,03 \pm 0,17b	0,95 \pm 0,20a	16,751	2,3e-4
TGC₁₋₃	2,84 \pm 0,52a	3,06 \pm 0,52b	2,78 \pm 0,59a	25,262	3,26e-6

Letras distintas en filas indican diferencias significativas entre los valores analizados ($P < 0.05$).

No hubo diferencias en el peso inicial de las truchas (Peso1) previo a la aplicación del ensayo de alimentación con las tres dietas experimentales (Tabla 4). A 60 días de iniciado el ensayo, no hubo diferencias significativas en el crecimiento de los peces ni tampoco para las variables de peso calculadas (Tabla 4). Si se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los peces alimentados con la dieta con sustitución de proteínas a los 90 días de iniciado el ensayo experimental contra la Dieta de sustitución de Aceite, no así con la dieta Control (Tabla 4). En cambio, se observa una diferencia significativa en las variables de crecimiento, donde para las tres variables calculadas (ΔP_{1-3} , SGR_{1-3} y TGC_{1-3}) la dieta de reemplazo de proteínas mostró un rendimiento

significativamente mayor. En función de lo anterior, se decidió trabajar solo con los datos de peces de la población en estudio a los 90 días de iniciado el ensayo, dado que estos mostraron diferencias significativas en el crecimiento de los peces analizados. Subsecuentemente se analizó el efecto del sexo sobre las variables de crecimiento de las truchas usadas en el estudio (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de variables de crecimiento (media \pm desviación estándar) entre las truchas machos y hembras incluidas en el estudio.

Sexo				
	Machos	Hembras	F ó χ^2	P-value
n	248	251		
Peso1	278,43 \pm 77,24a	258,38 \pm 66,02b	9,829	1,82e-3
Peso3	674,4 \pm 174,68a	619,6 \pm 150,66b	14,06	1,98e-4
ΔP_{1-3}	395,12 \pm 112,67a	361,22 \pm 104,12b	11,98	5,83e-4
SGR₁₋₃	0,99 \pm 0,18a	0,97 \pm 0,18a	0,767	0,382
TGC₁₋₃	2,95 \pm 0,55a	2,84 \pm 0,55b	5,052	0,025

Letras distintas en filas indican diferencias significativas entre los valores analizados ($P < 0.05$).

Se observa claramente un efecto del sexo sobre la población analizada. Donde tanto al iniciar el ensayo experimental como al finalizar este, los machos mostraron un peso mayor que las hembras, pesando en promedio un 7.7% más al iniciar el ensayo y 8.8% más a los 90 días respectivamente. Esto también se manifestó en las variables de crecimiento calculadas, donde los machos presentan un ΔP y TGC significativamente mayor que las hembras. Solo la variable de SGR mostró ser igual para ambos sexos (Tabla 5).

Al analizar en la interacción de sexo y dieta (Tabla 6, página 27) vemos que para los individuos ubicados en los estanques de la dieta control, existía una diferencia en sus pesos iniciales (Peso1), situación que no ocurre con los individuos ubicados en los

estanques que posteriormente fueron alimentados con dietas de reemplazo. Esta misma situación ocurre con el peso final (Peso3). Para las variables de peso, en el caso de la ΔP_{3-1} existen diferencias significativas en las tres dietas usadas. Situación no observada para la variable SGR_{3-1} donde no hubo diferencias significativas. En el caso de la variable TGC_{3-1} solo se encontraron diferencias significativas para las dietas de sustitución.

Tabla 6. Efecto del sexo y la dieta sobre el peso y las variables de crecimiento entre las truchas incluida en el estudio.

	Dieta Control S/Remplazo		Dieta Remplazo Proteína		Dieta Remplazo Aceite	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
n	81	77	85	77	82	97
Peso1	284,93±74,77a	255,91±57,06b	275,56±83,08a	262,04±70,18a	275,37±74,23a	257,44±69,70a
Peso3	678,81±174,68a	607,62±142,91b	699,51±178,99a	647,19±158,73a	641,04±149,65a	607,21±148,72a
ΔP₃₋₁	393,87±115,35a	351,71±100,12b	423,94±114,80a	385,14±105,38b	365,66±101,21a	349,77±104,11b
SGR₃₋₁	0,96±0,16a	0,96±0,15a	1,05±0,18a	1,01±0,15a	0,95±0,19a	0,96±0,21a
TGC₃₋₁	2,90±0,53a	2,78±0,49a	3,14±0,52a	2,97±0,49b	2,79±0,55a	2,77±0,61b

Letras distintas en filas indican diferencias significativas entre los valores analizados (P<0.05)



3.2 Predicción de Valores de Cría y Estimación Parámetros Genéticos

Una vez obtenidos los valores de las distintas variables de peso y crecimiento para cada individuo de la población analizada, se procedió a estimar los componentes de varianza y heredabilidad (Tabla 7), para predecir los valores de cría respectivos para cada uno de ellos. Esto fue hecho con el fin de poder seleccionar a los individuos y las familias a las cuales pertenecen, para genotipar los distintos SNP presentes en su genoma.

Tabla 7. Componentes de varianza y heredabilidad para cada variable de Crecimiento.

Variable	VA	VR	h^2	e^2
ΔP_{3-1}	3109,7896	4595,6394	0,4036	0,5764
SGR_{3-1}	0,0112	0,0154	0,4209	0,5701
TGC_{3-1}	0,1218	0,1682	0,4200	0,5800

VA, varianza genética aditiva. VR, varianza residual. h^2 , heredabilidad. e^2 , proporción de variación ambiental.

Los valores de cría para cada variable fueron correlacionados con valores fenotípicos de la variable original desde la cual se obtuvieron estos valores de cría. Se observa una mejor correlación de datos para las variables SGR_{3-1} ($r = 0,8056$) y TGC_{3-1} ($r = 0,8233$) en comparación con la ΔP_{3-1} ($r = 0,6415$), por lo cual se determinó trabajar con los valores de cría en función de los resultados obtenidos para el SGR_{3-1} y TGC_{3-1} .

La Tabla 8 muestra la selección de individuos y familias realizada a partir de los valores de cría para SGR_{3-1} de los 40 individuos con valores más altos y los cuarenta con valores más bajos. Además, se muestra el número total de individuos analizados en cada familia.

Tabla 8. Distribución de Individuos y familias seleccionados para análisis de asociación según valores de cría para SGR₃₋₁

Valores de cría más altos				Valores de cría más bajos			
<i>Familia</i>	<i>N individuos</i>	<i>%</i>	<i>Total Familia</i>	<i>Familia</i>	<i>N individuos</i>	<i>%</i>	<i>Total Familia</i>
5	4	10	11	10	7	17,5	11
32	1	2,5	11	12	4	10	14
40	5	12,5	10	16	10	25	15
44	6	15	13	20	2	5	10
46	1	2,5	13	21	1	2,5	11
52	1	2,5	15	24	1	2,5	13
54	13	32,5	13	36	7	17,5	16
55	9	22,5	13	39	6	15	9
				49	1	2,5	12
				58	1	2,5	8
Total	40	100	99	Total	40	100	119
Selec.	37	92,5	60	Selec.	34	85	65

Se seleccionaron un total de diez familias a incluir en los análisis de asociación (marcadas en negrita en la Tabla 8). Cinco con valores de cría para las tres variables de crecimiento estudiadas sobre el promedio de la población y otras cinco con valores de cría bajo el promedio. El valor de cría (PBV) se mide como un desvío del promedio, por lo tanto el valor promedio poblacional teórico es cero (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de cría familias seleccionadas v/s valores promedio poblacionales.

Familia	n	PBV ΔP_{3-1}	PBV SGR₃₋₁	PBV TGC₃₋₁
54	13	91,14	0,18	0,58
55	13	59,26	0,12	0,39
40	10	43,12	0,11	0,32
44	13	59,69	0,11	0,37
5	11	64,36	0,09	0,34
Promedio	11,34	2,82	0,01	0,02
12	14	-63,96	-0,09	-0,34
16	15	-63,56	-0,11	-0,38
36	16	-44,75	-0,11	-0,34
39	9	-60,76	-0,15	-0,48
10	11	-78,05	-0,15	-0,50

3.3 Selección EST de trabajo y Diseño partidores

A partir de los 58 SNP en 37 EST se diseñaron y seleccionaron partidores para 15 SNP en igual cantidad de EST. El resto fue descartado por las siguientes razones: 1) No se pudo generar partidores sobre la secuencia del EST o el par de partidores generados se solapa con otro SNP presente en la secuencia (23 casos). 2) El SNP presente es de clase 3 o 4 (3 casos). 3) El SNP presenta tres alelos posibles (2 casos). 4) El EST cuenta con otro(s) SNP en su secuencia (9 casos). 5) Los partidores diseñados presentaron una T_m fuera de rango óptimo recomendado (9 casos).

El grupo de SNP seleccionados cumple con todos los criterios de selección, salvo dos de ellos los cuales no cumplen alguno de los criterios, situación generada a propósito con el fin de contrastar la información teórica sobre los criterios óptimos sobre los cuales se debe desarrollar el genotipado de SNP por HRM. En la tabla 10 se muestran las características de los EST y SNP seleccionados, en Anexo 6 la secuencia de cada EST y de los partidores diseñados.

Tabla 10. Características de los EST y SNP seleccionados para los análisis de asociación.

Gen	SNP ID	Descripción	ID_GenBank	ID_SalmonDB	SNP	Clase
<i>hp</i>	25_1	Haptoglobina	CA039257	OM2U062222	C/T	1
<i>apoa1</i>	41_8A	Apolipoproteína A-I	CK990692	OM2U061798	C/A	1
Null	45_1	NULL ¹	CX034183	AGKD01070831.1	G/T	2
<i>exoc1</i>	55_2B ²	Componente del complejo de Exocitosis 1	DW576214	OM2U040125	C/T	1
<i>apoa2</i>	89_1	Apolipoproteína A-II	CA037348	OM2U062212	G/A	1
<i>atfiii</i>	91_4B	Antitrombina III	CA037876	OM2U060646	C/T	1
Null	100_1	NULL	CA053107	AGKD01008192.1	C/T	1
<i>pgam5</i>	103_2B	serine/threonine-protein phosphatase	CA060716	OM2U059929	G/T	2
<i>st3gal3</i>	108_3A	N-acetyllactosaminide α -2,3-sialyl transferase	CB488504	OM2U029672	C/T	1
<i>serpina1</i>	110_2B	Precursor α -1-Antitripsina	CB492682	OM2U062121	G/T	2
<i>rtn4</i>	120_1	Reticulon-4	CB502513	OM2U061970	C/A	2
<i>gcnf4a</i>	157_2B ³	β -1,6-N-acetylglucosaminyl transferase 4	EG925605	OM2U062121	G/A	1
<i>nudt17</i>	166_2B	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X) type motif 17	CB509527	OM2U041480	G/A	1
<i>ctrb</i>	175_2A	Quimotripsina B	EG807447	OM2U061798	C/T	1
<i>myl4</i>	180_1	Polipéptido ligero 4 de Miosina	BT049755	OM2U058763	G/A	1

¹ NULL = Indica secuencias de la que no se conoce nombre, descripción o función.² El amplificado de PCR posee una extensión mayor a 150 pb (Tamaño 175 pb)³ La Tm de los primarios es inferior a la mínima recomendada (58°C)

Una vez sintetizados los partidores, se trabajó en la prueba de los mismos. El objetivo de esto es obtener una reacción de PCR óptima, es decir un fragmento con un tamaño dentro de lo esperado y sin la presencia de fragmentos inespecíficos. Este último punto es de primordial importancia dada que la presencia de estos y el desconocimiento de la presencia de SNP en su secuencia, puede atentar con los resultados del HRM.

Del grupo de 15 SNP, en general se obtuvo buenos resultados con una reacción de PCR limpia (ver Anexo 7). Aun así, los SNP 166_2B y 41_8A presentaron amplificadores inespecíficos, por lo cual se realizó gradiente de temperatura en la fase de hibridación con el fin de buscar eliminar la presencia de estos. Lográndose resultados positivos al aumentar la temperatura de T_m a 61°C (ver Anexo 8).

3.4 Genotipado

Una vez estandarizadas las reacciones de PCR, se validaron los genotipos de los individuos control. A estos individuos se les conocía de antemano el genotipo (por secuenciación) y es necesario al menos conocer dos de los tres genotipos posibles (homocigoto1, heterocigoto y homocigoto2) obtenido en la etapa de identificación de SNP en los distintos EST. En las figuras 1 y 2 (página siguiente) se muestran a modo de ejemplo los resultados de la validación de los controles para el SNP 108_3A.

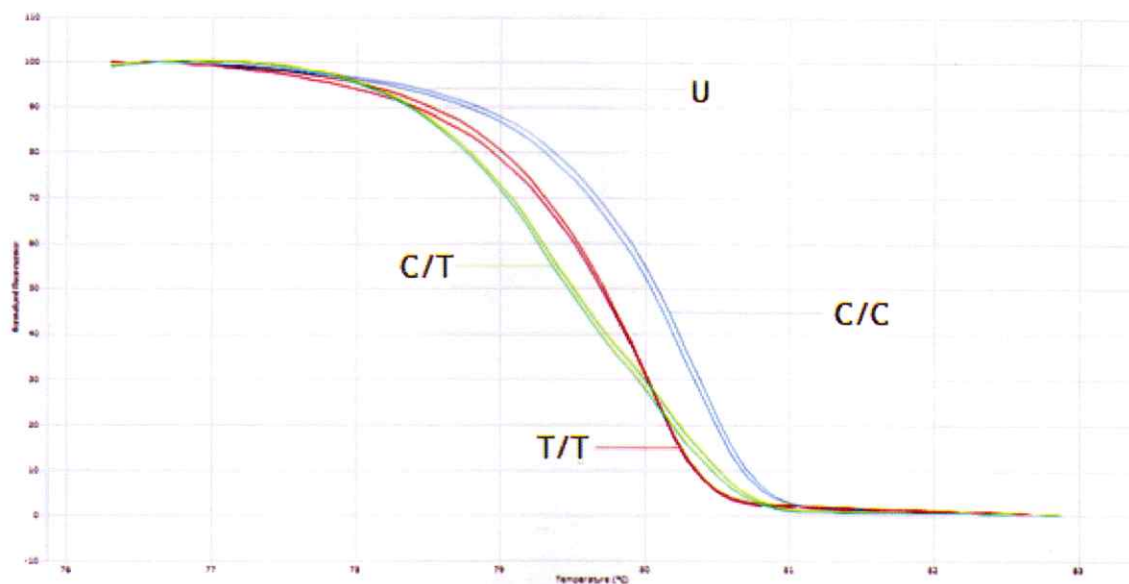


Figura 1. Curva de disociación normalizada, EST 108_3A SNP T/C, validación de controles homocigoto TT, heterocigoto CT y homocigoto CC. U, individuo de genotipo desconocido asignado a genotipo CC.

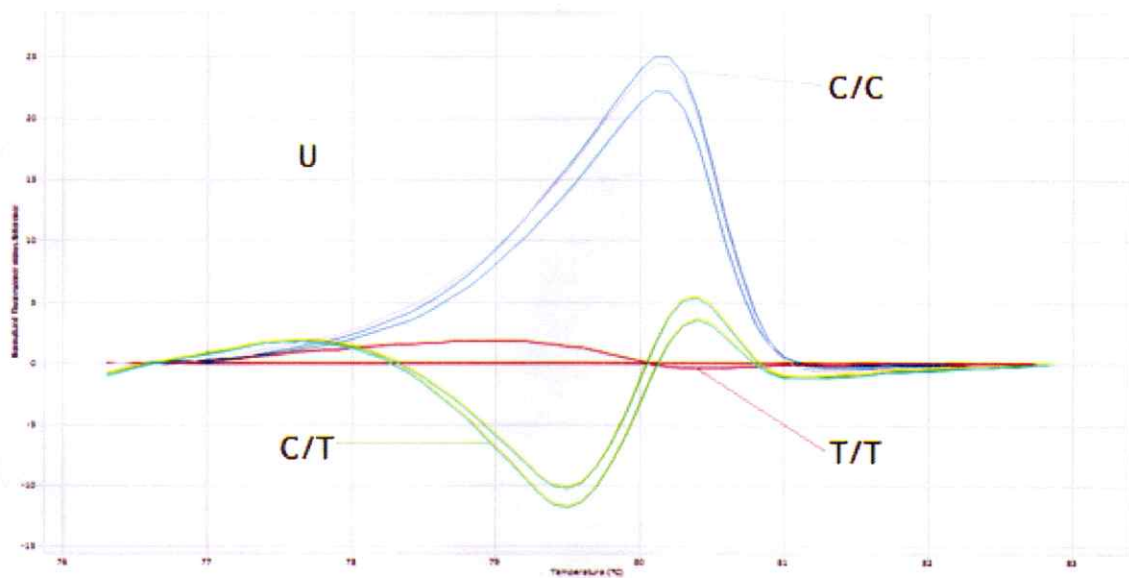


Figura 2. Curva de diferencia en relación al genotipo TT, EST 108_3A SNP T/C, validación de controles homocigoto TT, heterocigoto CT y homocigoto CC. U, individuo de genotipo desconocido asignado a genotipo CC.

Para dos SNP (55_2B y 120_1) no se pudo discriminar los genotipos entre los individuos control por lo cual se descartaron. Una vez validado el genotipo de los controles, se realizó el genotipado tanto de padres como hijos de las familias seleccionadas. A modo de ejemplo, en las Figuras 3 y 4 se muestran los resultados del HMR para de genotipado de los peces parentales de todas las familias seleccionadas (Ver tabla 8, página 29) incluidas en los análisis de asociación para el SNP 108_3A .

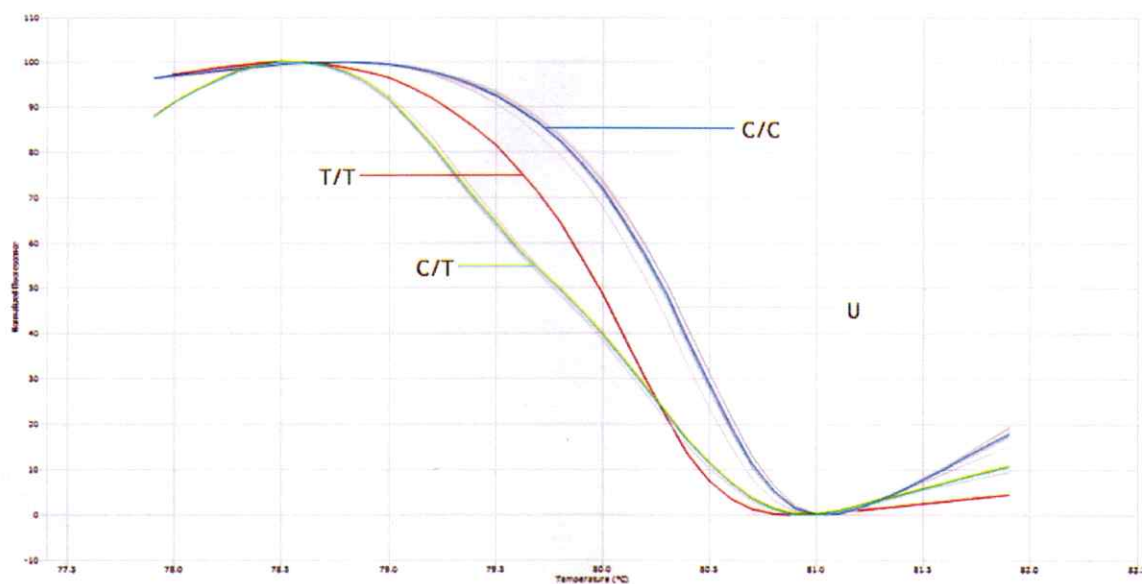


Figura 3. Curva de disociación normalizada, EST 108_3A SNP T/C, genotipado de padres (U) junto con controles de genotipo conocido (TT, CT y CC).

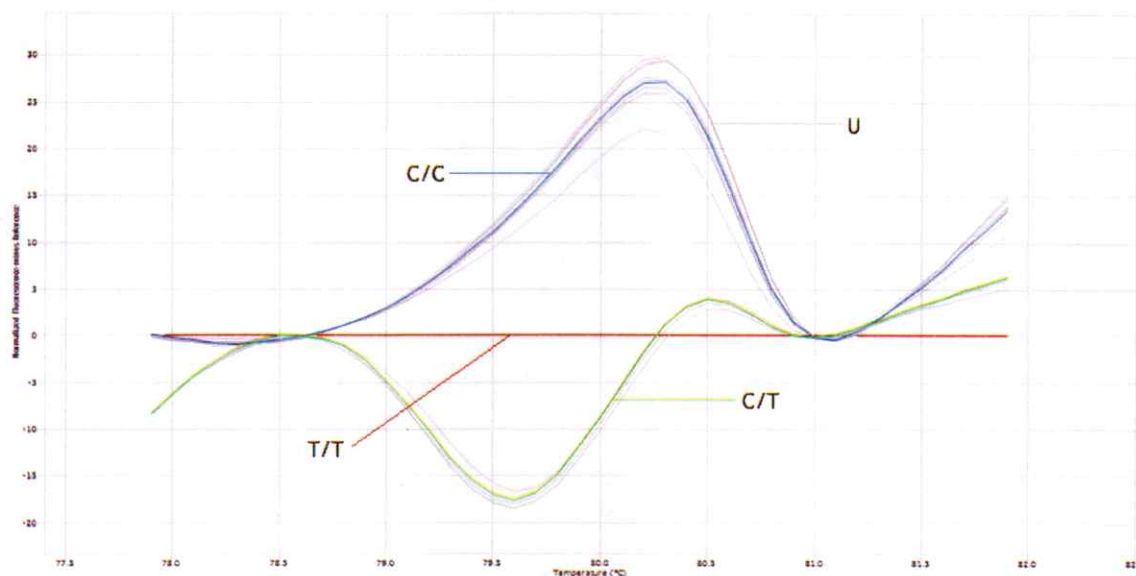


Figura 4. Curva de diferencia en relación al genotipo TT, EST 108_3A SNP T/C, genotipado de padres (U) junto con controles de genotipo conocido (TT, CT y CC).

En las Figuras 5 y 6 se muestran los resultados del genotipado de las progenies de las familias seleccionadas incluidas en los análisis de asociación para el SNP 108_3A

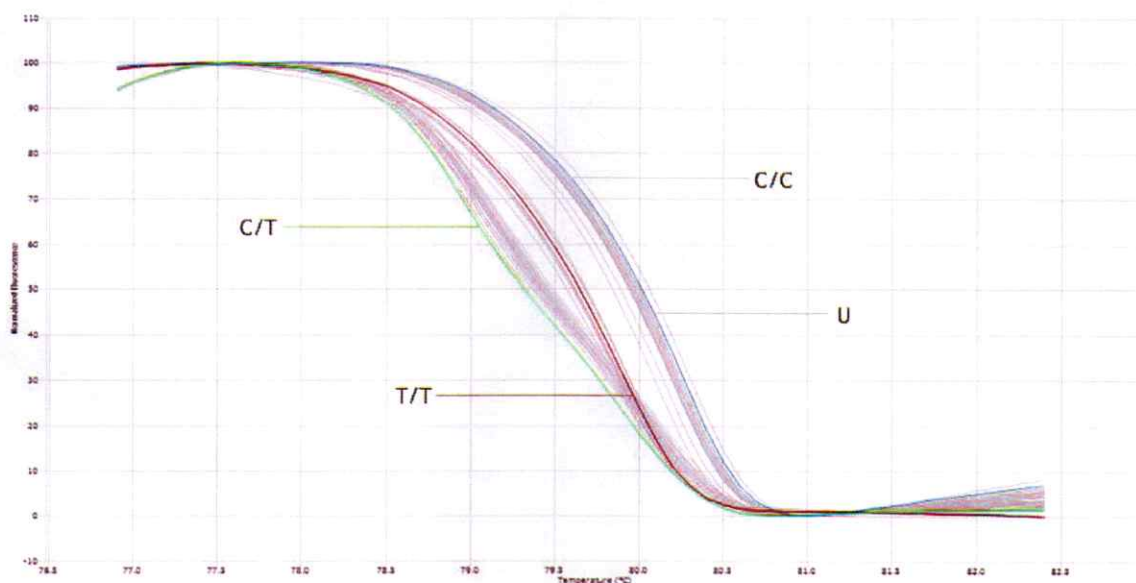


Figura 5. Curva de disociación normalizada, EST 108_3A SNP T/C, genotipado de progenies (U) junto con controles de genotipo conocido (TT, CT y CC).

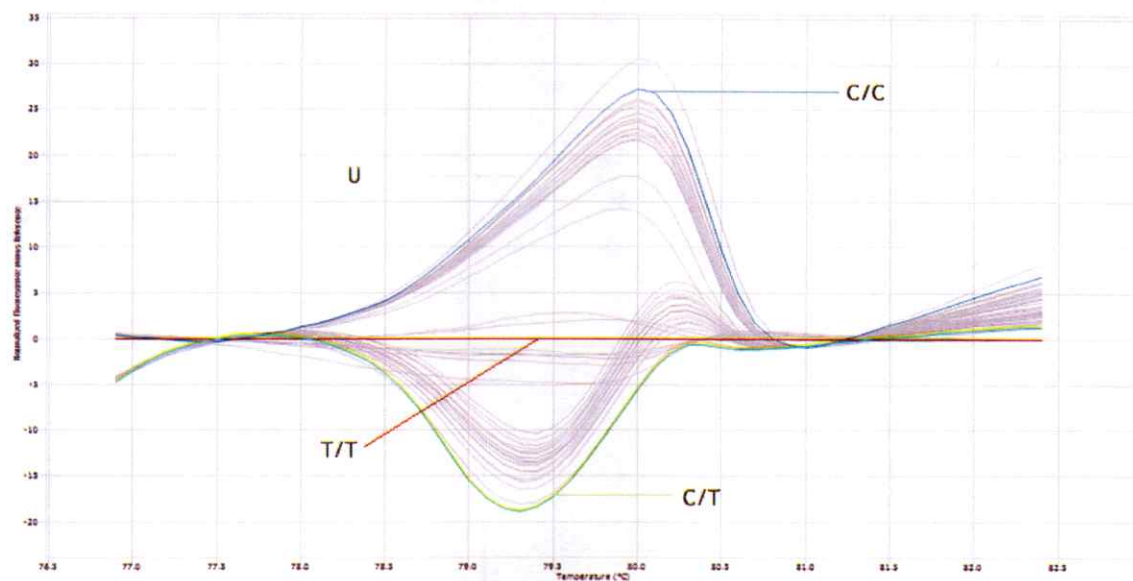


Figura 6. Curva de diferencia en relación al genotipo TT, EST 108_3A SNP T/C, para el genotipado de progenies (U) junto con controles de genotipo conocido (TT, CT y CC).

El genotipado se pudo realizar con éxito en 10 SNP de los 15 SNP. En los restantes cinco, en dos SNPs (89_1 y 110_2B) se observaron problemas en las curvas de melting, impidiendo asignar de manera clara un genotipo a los distintos individuos estudiados. En dos (120_1 y 55_2B) no se pudo encontrar los controles suficientes para realizar el análisis. Por último el SNP 180_1 resulto ser monomórfico para la población en estudio por lo que fue descartado. Los genotipos con sus respectivas frecuencias genotípicas y alélicas se muestran en el Anexo 9.

3.5 Validación relaciones de Parentesco

Las probabilidades de exclusión de paternidad, junto con las medidas de diversidad genética y las pruebas para el equilibrio de H-W de los distintos SNP se muestran en la Tabla 11, siguiente página. La Figura 7, muestra el incremento en las distintas probabilidades de exclusión de paternidad/maternidad al aumentar el número de SNP usados para el cálculo de las mismas.

Las relaciones de parentesco (padre/madre-progenie) fue confirmada para 82 (91.1%) individuos incluidos en el estudio, donde ocho individuos (8.9%) resultaron estar mal asignados en las distintas familias y que por lo tanto fueron descartados para análisis posteriores (Tabla 12).

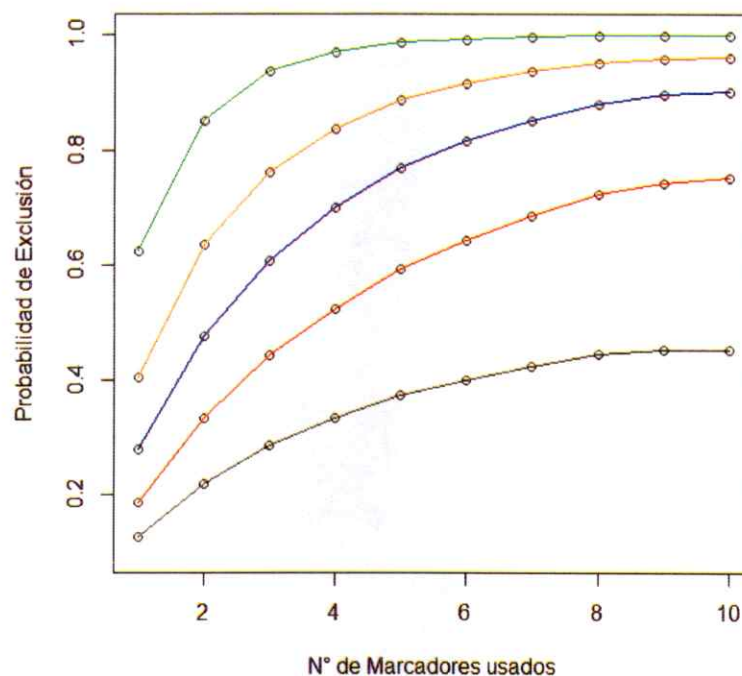


Figura 7. Probabilidad de exclusión v/s número de marcadores SNP usados, en negro (PE-1P) rojo (PE-2P), azul (PE-PP), naranja (PE-SI) y verde (PE-I)

Tabla 11. Resumen de estadísticas de diversidad genética y probabilidades de exclusión de paternidad/maternidad para cada uno de los diez SNP usados en este estudio⁴.

Locus	MAF	N	H _o	H _e	PIC	PE-1P	PE-2P	PE-PP	PE-I	PE-SI	H-W
108_3A	0,241	101	0,356	0,364	0,297	0,066	0,148	0,234	0,528	0,313	NS
166_2B	0,299	97	0,485	0,417	0,329	0,086	0,164	0,253	0,572	0,35	NS
175_2A	0,438	100	0,370	0,500	0,374	0,124	0,187	0,28	0,624	0,405	NS
25_1	0,167	101	0,327	0,275	0,236	0,037	0,118	0,195	0,435	0,245	NS
91_4B	0,081	99	0,152	0,158	0,145	0,012	0,072	0,129	0,277	0,148	ND
41_8A	0,165	99	0,333	0,279	0,239	0,039	0,12	0,197	0,44	0,249	NS
45_1	0,228	98	0,408	0,350	0,288	0,061	0,144	0,228	0,515	0,303	NS
103_2B	0,389	100	0,600	0,469	0,358	0,109	0,179	0,271	0,606	0,385	NS
157_2B	0,165	100	0,310	0,290	0,247	0,042	0,124	0,203	0,452	0,257	NS
100_1	0,025	100	0,060	0,058	0,057	0,002	0,028	0,054	0,111	0,057	ND
TOTAL				0,316	0,257	0,463	0,756	0,905	0,999	0,964	

⁴MAF: Frecuencia del alelo menos frecuente, N: Número de individuos analizados, H_o: Heterodigosidad observada, H_e: Heterodigosidad esperada, PIC: Contenido de información polimórfica, PE-1P: Probabilidad de exclusión para un padre candidato, PE-2P: Probabilidad de exclusión para un padre candidato dado el genotipo de un padre conocido del sexo opuesto, PE-PP: Probabilidad de exclusión de dos padres candidatos, PE-I: Probabilidad de exclusión de dos individuos no relacionados, PE-SI: Probabilidad de exclusión de dos hermanos. HW: Prueba estadística para la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, donde: NS, no significativo; ND, no realizado (frecuencia de un alelo muy baja).

Tabla 12. Individuos que presentaron diferencias en su genotipo con alguno de sus padres conocidos.

Locus	ID Individuo	Genotipo	ID Progenitor	
			Conocido	Genotipo
45_1	255	T T	Madre F6	G G
45_1		T T	Padre N4	G G
41_8A		C C	Padre N4	T T
25_1	411	T T	Madre F10	C C
25_1		T T	Padre macho 4	C C
108_3A	491	T T	Madre F5	C C
166_2B	583	A A	Padre N2-3	G G
41_8A		C C	Padre N2-3	T T
108_3A	596	T T	Madre F3	C C
108_3A		T T	Padre N2-3	C C
41_8A		C C	Padre N2-3	T T
166_2B	604	A A	Padre N2-3	G G
45_1		T T	Madre F3	G G
45_1		T T	Padre N2-3	G G
41_8A		C C	Madre N2-3	T T
108_3A	665	C C	Padre N4	T T
41_8A		C C	Padre N4	T T
25_1	746	T T	Padre macho 1 CO	C C

3.6 Desequilibrio de Ligamiento y Análisis de Asociación

La Figura 8 muestra el mapa de disequilibrio de ligamiento, obtenido con el paquete LDheatmap. Los valores estimados para los estadísticos de LD, D' y R^2 se pueden ver en el Anexo 10.

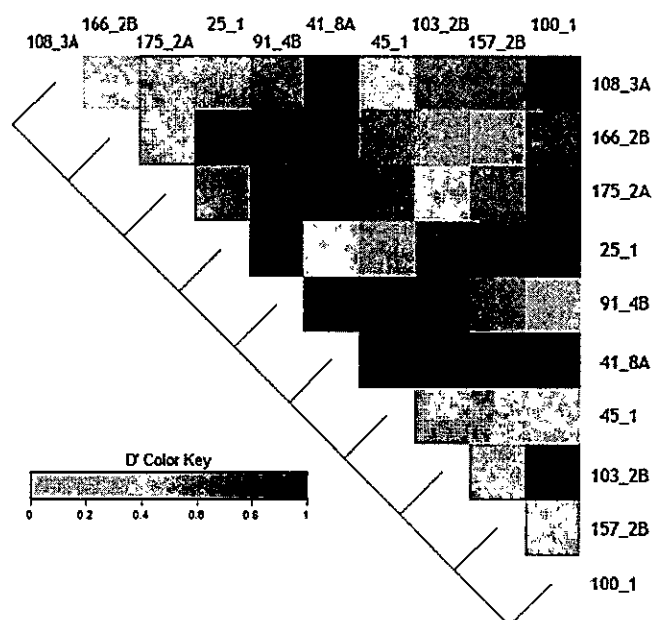


Figura 8. Mapa de Disequilibrio de ligamiento (D') para los 10 marcadores SNP usados en el estudio.

El análisis de asociación de los marcadores usados toma en cuenta las relaciones de parentesco entre la población analizada esto con el fin no obtener falsos positivos que pueden aparecer debido al uso de individuos no emparentados. La asociación se puso a prueba usando el crecimiento alcanzado por los individuos de la población estudiada a los 90 días de iniciado el ensayo, con el peso inicial como covariable, y los valores de cría obtenidos de los tres parámetros de crecimiento utilizados. Los resultados se muestran en las siguientes tablas: Tabla 13 (página 43) y Tabla 14 (página 44).

Todos los análisis de asociación se llevaron a cabo usando un modelo genético general debido al desconocimiento del aporte e influencia de los distintos SNP sobre el rasgo de crecimiento. Aun así el paquete GWAF puede discriminar cual modelo es mejor usar para cada SNP, lo que ocurrió en algunos casos (SNP 25_1 y 41_8A) donde se usó un modelo genético dominante. Además, el SNP 100_1 fue descartado por el paquete GWAF para el análisis de asociación. Esto debido a que fue prácticamente monomórfico en la población de estudio.

Tabla 13. Análisis de asociación basado en familia para los SNP en estudio con las variables peso a los 90 días (Peso3) y valor de cría para ganancia de peso (PBV ΔP_{3-1}).

SNP	Peso a los 90 días				PBV ΔP_{3-1}			
	χ^2	g.l.	Modelo	P-value	χ^2	g.l.	Modelo	P-value
108_3A	6,2519	2	General	0,0439*	8,9543	2	General	0,0114*
166_2B	5,5835	2	General	0,0613	10,7334	2	General	0,0047**
175_2A	1,8270	2	General	0,4011	0,7412	2	General	0,6903
25_1	1,0879	1	Dominante	0,2969	0,5375	1	Dominante	0,4635
91_4B	6,5914	2	General	0,0370*	45,7639	2	General	1,15E-10***
41_8A	0,9303	1	Dominante	0,3348	0,3507	1	Dominante	0,5537
45_1	31,4421	2	General	1,49E-07***	14,3207	2	General	0,0008***
103_2B	34,3091	2	General	3,55E-08***	45,0776	2	General	1,63E-10***
157_2B	20,8281	2	General	3,00E-05***	14,8528	2	General	0,0006***

*** indica P-value < 0,001. ** indica P-value < 0,01. * Indica P < 0,05.

Tabla 14: Análisis de asociación basado en familia para los SNP en estudio con las variables valor de cría para las tasas de crecimiento (PBV SGR₃₋₁ y PBV TGC₃₋₁).

SNP	PBV SGR ₃₋₁				PBV TGC ₃₋₁			
	X ²	g.l.	Modelo	P-value	X ²	g.l.	Modelo	P-value
108_3A	12,8423	2	General	0,0016**	11,2255	2	General	0,0037**
166_2B	8,5056	2	General	0,0142*	9,1767	2	General	0,0102*
175_2A	1,2709	2	General	0,5297	1,0140	2	General	0,6023
25_1	0,2264	1	Dominante	0,6342	0,2923	1	Dominante	0,5888
91_4B	59,8728	2	General	9,97E-14***	61,3191	2	General	4,84E-14***
41_8A	0,1790	1	Dominante	0,6722	0,2229	1	Dominante	0,6368
45_1	8,5856	2	General	0,0137*	11,0041	2	General	0,0041**
103_2B	38,6424	2	General	4,06E-09***	40,8632	2	General	1,34E-09***
157_2B	29,7018	2	General	3,55E-07***	26,4296	2	General	1,82E-06***

*** indica P-value < 0,001. ** indica P-value < 0,01. * indica P < 0,05. Donde: g.l.: Grados de libertad.

En general se observa que tres SNP: 175_2A, 25_1 y 41_8A ubicados en los genes para Quimotripsina B (EG807447), Haptoglobina (CA039257) y Apolipoproteína A-I (CK990692), respectivamente, no muestran asociación con ninguno de los rasgos de crecimiento evaluados, ni con el peso a los 90 días de edad (Tablas 13 y 14, páginas anteriores).

Por otro lado, hubo un grupo de seis SNP que mostraron asociación entre significativa (P -value $< 0,05$) a altamente significativa (P -value $< 0,001$) para las cuatro variables evaluadas (Peso3, PBV ΔP_{3-1} , PBV SGR₃₋₁ y PBV TGC₃₋₁). De estos seis, destacan los SNP 103_2B y 157_2B los cuales siempre mostraron asociación altamente significativa con todas las variables evaluadas (P -value $< 0,001$). Estos dos SNP se encuentran en los genes serine/threonine-protein phosphatase PGAM5 (CA060716) y β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 4 (CB488504), respectivamente.

Del resto de los SNP, vemos que los SNP 108_3A y 166_2B muestran asociación significativa ($0,001 < P$ -value $< 0,05$). Con el SNP 91_4B vemos que alcanza valores altamente significativos (P -value $< 0,001$) para las variables basadas en el valor de cría, situación que no ocurre con el peso donde se observa una significancia menor ($0,01 < P$ -value $< 0,05$). Situación inversa a la que ocurre en el SNP 45_1 donde vemos una alta significancia (P -value $< 0,001$) para la variable de peso y PBV ΔP_{3-1} y una asociación significativa ($0,01 < P$ -value $< 0,05$) con el resto de las variables basadas en el valor de cría (PBV SGR₃₋₁ y PBV TGC₃₋₁).

DISCUSIÓN

4.1 Variación fenotípica del crecimiento

En este estudio, como primera parte, se analizó el crecimiento de una población de trucha arcoíris alimentada con una dieta control compuesta de harina y aceite de pescado; y dietas de sustitución del 50% de estos componentes por aceites y proteínas vegetales. El crecimiento fue evaluado en función del peso el cual fue medido iniciado el ensayo experimental, a 60 y 90 días de empezado este. Además de evaluar variables de crecimiento como la diferencia de peso (ΔP), la tasa de crecimiento específica (SGR) y el coeficiente de crecimiento por unidad térmica (TGC).

Al comparar la dieta control y la de sustitución de proteínas, en la cual se reemplazo un 50% de harina de pescado por una combinación de harina de girasol (25%), gluten de maíz (50%) y soya desgrasada (25%), respecto a los pesos promedios finales alcanzados no hubo una diferencia significativa entre las dietas a 60 días de iniciado el ensayo experimental, situación similar a lo observado en otros estudios llevados a cabo en trucha arcoíris con dietas de sustitución de proteínas donde la harina de pescado fue reemplazada por mezclas de harina de soya (25%) y gluten de maíz (75%) (Gomes y col, 1995), mezclas de harina de soya (25%), gluten de maíz (37.5%) y trigo (37.5) (Cheng y col, 2003) o mezclas de harina de soya (35%) y trigo (65%) (Romarheim y col, 2006) donde no se observó diferencias entre los pesos finales, la ganancia de peso (ΔP), la tasa de crecimiento específico (SGR) y para el coeficiente de crecimiento por unidad térmica (TGC).

A 90 días no se observó diferencias significativas en los pesos finales. En experimentos similares, con una tasa de sustitución del 50% de harina de pescado por proteínas vegetales (25% harina de soya, 25% gluten de trigo y un 50% de gluten de maíz), por un periodo de tiempo similar (~90 días) en trucha arcoíris, fue observado el mismo resultado (Lansard y col, 2009). También en este mismo estudio se observaron diferencias significativas en las variables de crecimiento SGR y ΔP , donde para ambas es menor el crecimiento en la dieta de sustitución comparado con la dieta control. En cambio en el presente estudio se observó un patrón distinto, los valores de SGR y ΔP para la dieta de reemplazo son mayores a la dieta control. Lo que se puede deber a que las truchas arcoíris usadas en el estudio desde el cual se obtuvieron los datos para el presente seminario tenían algún grado de adaptación al consumo de dietas con ingredientes vegetales. Algo que ya ha sido observado en otros experimentos, donde un uso temprano de dietas con ingredientes vegetales favorece una posterior aceptación de éstas, en etapas tardías de la vida del pez (Geurden y col, 2013).

Es importante notar que la dieta de sustitución de proteínas tiene una inclusión de harina de soya del 25%, de acuerdo a lo recomendado por algunos autores que mencionan que la inclusión de harina de soya no debe superar el 20-25% con el fin de evitar problemas en el crecimiento de los peces, esto debido a la presencia de factores antinutricionales (Hardy 2003; Barrows y col, 2007).

Por otro lado, al contrastar la dieta control con la dieta de sustitución de aceites (50% de reemplazo de aceite de pescado por aceite de Raps) tanto a 60 como 90 días no hubo diferencias con el peso final alcanzado y las variables de crecimiento calculadas. Situación ya observada en otros estudios realizados en trucha arcoíris reemplazando el 60% del lípido por aceite de raps durante 27 semanas (Turchini y col, 2013), usando un

30% de aceite de raps por 60 días (Stone y col, 2011) o con un 50% de aceite de canola por 84 días (Yildiz y col, 2013).

Dentro de las familias seleccionadas para genotipado, encontramos que estas muestran un comportamiento claramente diferenciado. Familias con alto PBV mostraron significativamente un mayor peso final, mayor ganancia de peso (ΔP_{3-1}), una mayor tasa de crecimiento (SGR_{3-1}) y un mayor coeficiente de crecimiento por unidad térmica (TGC_{3-1}) (Tabla 15).

Tabla 15. Crecimiento y variables de crecimiento para las 5 familias con alto PBV v/s las 5 menores.

	Familias Bajo PBV	Familias Alto PBV	F ó χ^2	P-Value
n	65	60		
Peso1	268,7 ± 82,38	244,28 ± 64,47	3,366	0,06900
Peso2	435,38 ± 136,17	478,68 ± 116,67	3,618	0,05950
Peso3	568,02 ± 174,71a	671,58 ± 153, 32b	12,32.	0,00063
ΔP_{3-1}	299,32 ± 113,15a	427,3 ± 97,77b	45,44	5,43e-10
SGR_{3-1}	0,83 ± 0,21a	1,13 ± 0,12b	65,36	6,24e-16
TGC_{3-1}	2,39 ± 0,65a	3,31 ± 0,35b	63,53	1,57e-15

Letras distintas en filas indican diferencias significativas entre los valores analizados ($P < 0.05$).

Las familias seleccionadas con alto PBV tienen entonces una mayor capacidad para crecer con las nuevas dietas suministradas, teniendo una mejor respuesta ante los nutrientes presentes en las dietas vegetales, tanto a nivel de proteínas como aceites. Esto, marca una diferencia con las familias seleccionadas para bajo PBV las que muestran una menor capacidad de respuesta, reflejado en su menor crecimiento.

4.2 Genotipado y Parentesco

El genotipado de los individuos seleccionados de cada familia fue realizado por el análisis de HRM. El cual ha sido aplicado con éxito en la detección de SNP identificados en EST (Ujino-Ihara y col, 2010), siendo utilizado también en acuicultura tanto para detectar y descubrir SNP en distintas especies de salmónidos como trucha arcoíris (Hansen y col, 2011), trucha degollada "cutthroat" (*Oncorhynchus clarkii*) (McGlaulin y col, 2010) y salmón chum (*Oncorhynchus keta*) (Seeb y col, 2011).

En algunos de los estudios mencionados, se encuentran problemas similares a los que surgieron en la presente investigación durante la implementación de la técnica de HRM. Entre los problemas comunes se encuentran la incapacidad de asignar un genotipo aun teniendo los controles para los distintos genotipos esperados, debido a la aparición de múltiples curvas de disociación ("melting") una vez realizado el experimento, como fue observado por Seeb y colaboradores (2011). Esto supone la pérdida del SNP al ser genotipado, por la presencia de algún otro polimorfismo cercano al SNP de interés, lo cual genera una mayor cantidad de curvas e impide asignar correctamente los genotipos. Igualmente, se observa como limitante para esta técnica la poca capacidad de resolución que ofrece al trabajar con SNP clase III (C/G) o IV (A/T) (Liew y col, 2004).

Con el panel resultante de SNPs se evaluó su uso para parentesco. Una ventaja que se tenía a la hora de hacer el análisis es que ya se conocían de antemano los padres de cada familia. Con este panel se pudo eliminar individuos que no correspondían a las familias a las que fueron asignados al inicio del experimento de acuerdo a los registros

genealógicos, esto se logró determinar en función de los “mismatches” resultantes al comparar los genotipos de los padres con estos hijos. Debido a la cantidad de SNP usados y al ser estos marcadores bi-alélicos, la probabilidad de exclusión obtenida fue baja (60%) en comparación con el uso de otros marcadores moleculares multi-alélicos, como los microsatélites que son ampliamente usados para pruebas de paternidad (Pierce y col, 2008; Le Boucher y col, 2011; Sae-Lim y col, 2013).

Diversos estudios siguieron aumentar el número de SNP empleados en el análisis en torno a 20 o 30 (Baruch & Weller 2008; Karniol y col, 2009) o usar conjuntamente SNP y microsatélites, donde es posible reemplazar estos últimos añadiendo de dos a tres SNP por microsatélite, para alcanzar probabilidades de exclusión equivalentes (Weller y col, 2006). Esto, con el fin de lograr una probabilidad de exclusión similar al 99%, valor mínimo aceptado en humanos (Araneda y col, 2004) y que hubiese sido necesario alcanzar para dar como válido el panel de SNP utilizado para pruebas de exclusión de paternidad.

4.3 Asociación de marcadores con crecimiento

Con el análisis de asociación realizado se obtuvieron un total de seis SNP (45_1, 91_4B, 166_2B, 103_2B, 108_3A y 157_2B) proveniente de genes diferencialmente expresados que se asocian con el rasgo de crecimiento para los valores de cría de las variables de crecimiento (PBV ΔP_{3-1} , PBV SGR₃₋₁, PBV TGC₃₋₁) y usando también el peso a 90 días de cada individuo (Tablas 13 y 14, páginas 42 y 43 respectivamente). Además los SNP seleccionados no mostraron desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 11, página 38).

La mitad de los SNP que llegaron a la fase de asociación resultaron estar significativamente asociados con algún rasgo de crecimiento. Esta situación también se observa en estudios similares como los llevados a cabo por Salem y colaboradores (Salem y col, 2012) donde de un total de 54 SNP validados, en peces alimentados con dietas de origen animal, se asociaron con el crecimiento 22 SNP. Al comparar con este mismo estudio los genes en los cuales se encuentran los SNP seleccionados no se observan similitudes, siendo genes distintos que participan de procesos metabólicos como la glicolisis, componentes mitocondriales (Citocromo b o NADH deshidrogenasa) o se relacionan con proteínas musculares.

4.4 Relevancia Biológica SNP seleccionados en Análisis de Asociación

Con el grupo de SNP obtenidos del análisis de asociación y conociendo en que genes se ubican (Tabla 10, página 31), es relevante conocer en lo posible, la función que cumplen y los procesos biológicos de los cuales participan. Características que pueden dar cuenta de la respuesta frente al uso de dietas de sustitución de nutrientes vegetales por animales ejercida por estos genes. Por lo cual se realizó una revisión en bases de datos como Gene Ontology (Ashburner y col, 2000), UniProt (Apweiler y col, 2013) y KEGG (Kanehisa & Goto 2000).

El SNP 91_4B se encuentra en el gen *atIII* (Antitrombina III), el cual participa de una serie de procesos biológicos como la coagulación de la sangre, hemostasis y regulación de la respuesta inflamatoria y proteólisis. Su actividad ocurre en el espacio extracelular. Su función molecular ocurre por su actividad de inhibición de proteasas y

endopeptidasas del tipo serina, además de unirse a otras proteínas como la heparina y proteasas

Los SNP 157_2B (gen *gcnt4a*) y 108_3A (gen *st3gal3*), que codifican para las proteínas β -1,6-N-acetylglucosaminyl transferase 4 y N-acetyllactosaminide α -2,3-sialyl transferase respectivamente participan de la biosíntesis de O-Glicoproteínas.

El SNP 103_2B (gen *pgam5*) es parte de la vía de señalización de TNF (Factor de necrosis Tumoral). El SNP 166_2B (gen *nudt17*), a nivel de Gene Ontology, encontramos que solo se encuentra conocida su función molecular, la cual corresponde a actividad hidrolasa y unión a iones metálicos.

El SNP 45_1 se encuentra asociado a un EST de nombre, descripción y función desconocida. Al realizar blastn de esta secuencia en NCBI a EST de distintas especies modelo emparentadas con trucha arcoíris, como pez cebra (*Danio reiro*), medaka (*Oryzias latipes*) o pez globo (*Fugu rubripes*) junto con trucha arcoíris y salmón del Atlántico solo se obtiene similitud para estas dos últimas especies en secuencias de cDNA sin clasificar. Al realizar este mismo ejercicio sobre el genoma no se obtiene resultado alguno. Sin embargo, al realizar blastn en una base de datos más actualizada como Animal Genome¹ para trucha arcoíris, se obtiene resultados positivos tanto para genoma como EST. Aun así, estas secuencias no están anotadas por lo cual no se puede determinar a qué gen está asociado este EST. Al usar la herramienta de blastx, en NCBI para este EST, no se detectan dominios asociados a alguna proteína. Observándose match con dos proteínas pero, con valores de identidad y cobertura bajos.

¹ <http://www.animalgenome.org/blast/> (Última revisión: 26 de noviembre de 2014)

Al estar los SNP que se asociaron con el rasgo de crecimiento, en genes identificados de un análisis de expresión diferencial a partir de micro-arrays, podemos conocer la correspondencia de la expresión de cada uno respecto de cada dieta. Para la dieta de sustitución de aceites tenemos que todos los genes que continen estos EST mantuvieron su expresión, mientras que para la dieta de reemplazo de proteínas todos los genes la aumentaron (Datos no publicados. Gentileza Dra. Verónica Cambiazo y Dr. Rodrigo Pulgar. Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, INTA).

Aun cuando se tiene un panel de genes con SNP seleccionados por el análisis de asociación llevado a cabo, es necesario filtrar estos datos. En esta clase de estudios puede ocurrir que los mecanismos de acción por los cuales los genes asociados afectan al rasgo de interés no sean del todo claro. Esto debido a que se desconoce la función del gen o que con la información actual aun no hay una clara conexión entre el gen y el rasgo de interés (McCarthy & Hirschhorn 2008).

De los cinco genes asociados, tres resultan de interés (*atlll*, *gcnt4a* y *pgam5*) ya que se puede establecer una posible relación del gen con la tolerancia o adaptación a dietas que presentan proteínas de origen vegetal, en especial por el uso de harina de soya. Diversos estudios en distintas especies de peces como salmón del atlántico, trucha arcoíris, pez cebra y carpa común (*Cyprinus carpio*) muestran que la inclusión de harina de soya en la dieta influyen de manera negativa la absorción de nutrientes, sistema inmune y morfología (Hedreya y col, 2013); tanto intestinal caracteriza por una infiltración de distintas células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos o neutrófilos en la lamina propia, disminución en la altura del plegamiento e integridad de la mucosa intestinal, anormal vacuolización y ampliación del estroma central (Baeverfjord & Kroghdahl 1996; Heikkinen y col, 2006) llegando a desencadenar una

inflamación en la zona distal del intestino denominada enteritis (Merrifield y col, 2009; Hart y col, 2010; Krogdahl y col, 2010); o hepática caracterizada por una atrofia en los hepatocitos y en el aumento en la actividad enzimática de algunas enzimas como la cystathionine g-lyase (Yamamoto y col, 2007).

Los tres genes mencionados (*atIII*, *gcnt4a* y *pgam5*) pueden estar involucrados en la respuesta al proceso de inflamación en el intestino. La Antitrombina III (gen *atIII*) además de ser parte de procesos relacionados con la coagulación de la sangre, participa en la regulación de procesos inflamatorios, afectando la activación de leucocitos (Wiedermann & Römisch 2002), aun cuando en inflamación aguda la antitrombina III se encuentra consumida y/o inactivada (Esmon 2005). La posible relación entre este gen y el uso de dietas de sustitución surge, como se menciono anteriormente, en que durante los procesos de enteritis existe una infiltración leucocitos en el intestino en respuesta a estas dietas. Además, como ya se comento, este gen sufre un alza de su expresión lo que estaría dando cuenta de una respuesta a las nuevas dietas y de cierto modo, una muestra de la capacidad de la adaptación del pez a éstas.

El gen *pgam5* se encuentra en la vía de señalización de TNF (Factor de Necrosis Tumoral, vía de señalización en Figura 9, página siguiente). TNF es una citocina pro-inflamatoria que juega un rol importante en inmunidad e inflamación controlando también proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis y necrosis (Baud & Karin 2001; Chu 2013). PGAM5, en específico, forma parte de la vía que conduce a la necrosis vía DRP1, en donde “knockdown” para esta proteína muestran una necrosis atenuada (Wang y col, 2012) también junto a KEAP1 promueve la degradación proteínas antiapoptóticas como BCL2 . TNF muestra un alza en su expresión durante

además las mucinas juegan un papel importante para la microbiota intestinal al ser un importante sustrato y componente de adhesión (Sheng y col, 2012), donde cambios en la composición de estas afectan a la microbiota intestinal algo observado durante la alimentación con harina de soya (Merrifield y col, 2009). Los resultados de expresión diferencial muestran una sobreexpresión de este gen, lo que puede estar dando cuenta de los eventos mencionados anteriormente, mostrando como este gen participa de la tolerancia a las dietas con proteína vegetal.

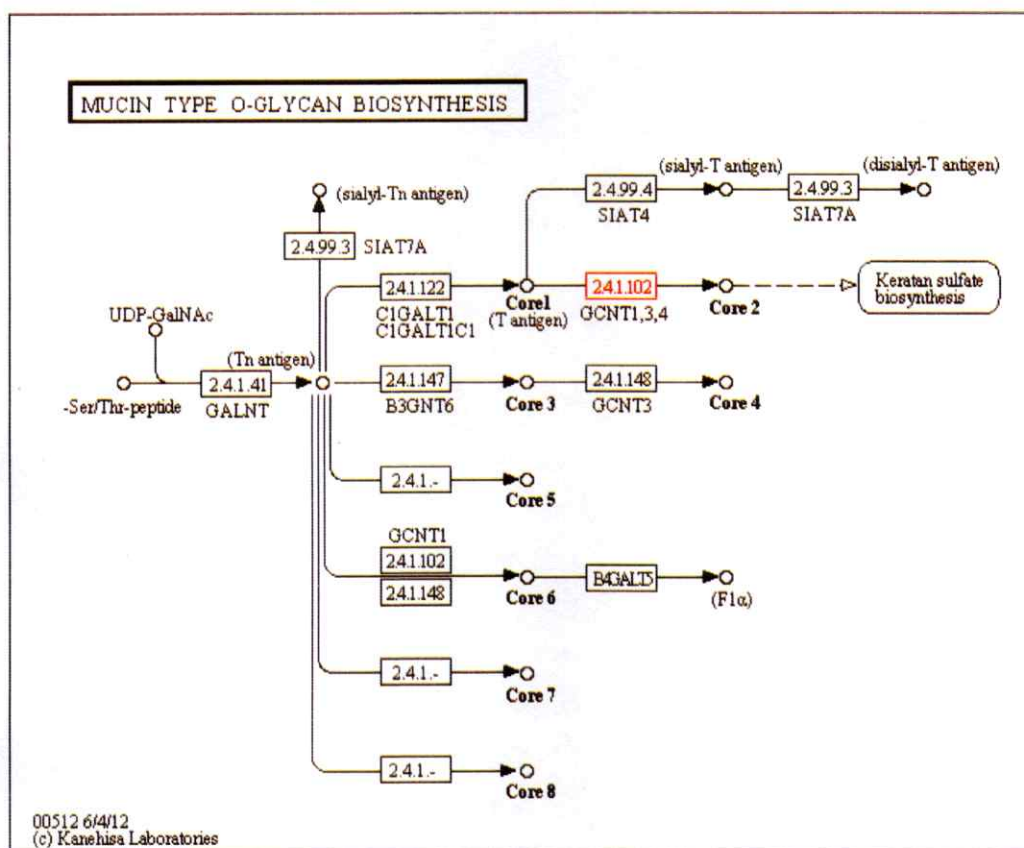


Figura 10. Vía de Biosíntesis Mucinas. En rojo resaltado gen *gcnt4a*.

4.5 Desequilibrio de Ligamiento (LD)

Debido a la complejidad y duplicaciones presentes en el genoma de trucha arcoíris, el ensamble de su genoma y respectivos cromosomas ha sido complejo. Si bien se han

realizado acercamientos en pos de cumplir este objetivo con la generación de mapas de ligamiento (Guyomard y col, 2012) o integrados (Palti y col, 2012). Además, dado que los marcadores SNP del presente trabajo son nóveles, no es posible conocer la ubicación a nivel de cromosomas de los genes de interés, o si se encuentran en algún grupo de ligamiento conocido en cercanía unos de otros. Sin embargo, fue posible estimar el LD a partir de los valores obtenidos de D' y R^2 , para los distintas parejas SNP estudiados.

La comparación de los niveles de LD entre genes individuales solo se pudo hacer usando el genoma de referencia del pez cebra, que se ha propuesto como modelo para estudios de nutrición en salmones (Ulloa y col, 2011) y además se ha descrito sintenia entre los marcadores de este pez y los de trucha arcoíris (Guyomard y col, 2012). Interesantemente, se observa que dos parejas de genes estudiados se encuentran en ubicadas en dos cromosomas de este pez modelo. En primer lugar se observa que el gen *pgam5* se encuentra duplicado en pez cebra, ubicándose en los cromosomas 22 y 5. El resto de los otros genes no se encuentran duplicados. Se observa que los genes *atlll* y *pgam5* (una de sus copias) se encuentran en el cromosoma 22 de pez cebra. En tanto, se observa a los genes *pgam5* (su otra copia) y *gcnt4a* en el cromosoma 5. Esto supondría una situación similar en trucha arcoíris donde se encontrarían próximos uno de otros. En el caso de la pareja *atlll* y *pgam5* se obtienen valores de $D'=0,8017$ y $R^2=0,0948$. Obteniéndose, con la pareja *pgam5* y *gcnt4a* valores de $D'=0,3292$ y valores de $R^2=0,0369$ respectivamente. Que explicaría los niveles de LD presentes por algún grado de proximidad geográfica entre estos genes, especialmente la pareja *atlll* y *pgam5*. Aun así, estos resultados se deben contrastar por alguna técnica de mapeo clásica.

CONCLUSIONES

1. Existe una diferencia de crecimiento en truchas arcoíris alimentadas con la dieta de sustitución de proteínas animal por una vegetal. Esta diferencia también se da en relación al sexo, donde los machos tuvieron un crecimiento significativamente mayor a las hembras.
2. Las pruebas de exclusión de paternidad permitieron la identificación de individuos mal asignados a familias a pesar que mostraron bajas probabilidades de exclusión debido al uso de solo 10 SNP.
3. Los SNP que asocian para las variables de crecimiento PBV SGR_{3-1} y PBV TGC_{3-1} , corresponden a genes que participan en procesos biológicos como: glicosilación de proteínas (*st3gal3* y *gcnt4a*), regulación de la respuesta inflamatoria (*atlll*), procesos de muerte celular (*pgam5*) y actividad hidrolasa (*nudt17*).
4. De acuerdo a los valores de D' y R^2 , los genes *pgam5-atlll* podrían estar en un mismo grupo de ligamiento. Esto puede ser contrastado usando alguna técnica de mapeo físico como Fish (Fluorescence in situ hybridization), mapeo genético por recombinación o integrando los marcadores identificados en estos genes a algún grupo de ligamiento conocido en trucha arcoíris.

BIBLIOGRAFIA

- Apweiler, R., M. J. Martin, C. O'Donovan y col. 2013. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Research*. **41**: 43-47.
- Araneda, C., C. Correa, N. Lam y col. 2004. Asignación de Paternidad-Maternidad y parentesco cercano en un plantel de avestruces (*Struthio camelus*), utilizando seis Loci microsatélites polimórficos. *Avances en Producción Animal*. **29**: 3-14.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake y col. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*. **25**: 25-29.
- Baeverfjord, G. y A. Krogdahl. 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L, distal intestine: A comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*. **19**: 375-387.
- Barrows, F. T., T. G. Gaylord, D. A. J. Stone y col. 2007. Effect of protein source and nutrient density on growth efficiency, histology and plasma amino acid concentration of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*. **38**: 1747 - 1758.
- Baruch, E. y J. I. Weller. 2008. Estimation of the number of SNP genetic markers required for parentage verification. *Animal Genetics*. **39**: 474-479.
- Baud, V. y M. Karin. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. **11**: 372-377.
- Boussaha, M., R. Guyomard, C. Cabau y col. 2012. Development and characterisation of an expressed sequence tags (EST)-derived single nucleotide polymorphisms (SNPs) resource in rainbow trout. *BMC Genomics*. **13**: 238.
- Burr, G. S., W. R. Wolters, F. T. Barrows y col. 2012. Replacing fishmeal with blends of alternative proteins on growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and early or late stage juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. **334-337**: 110-116.
- Caballero, M., A. Obach, G. Rosenlund y col. 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout. *Aquaculture Nutrition*. **214**: 253-271.
- Collins, S. A., A. R. Desai, G. S. Mansfield y col. 2012. The effect of increasing inclusion rates of soybean, pea and canola meals and their protein concentrates on the growth of rainbow trout: Concepts in diet formulation and experimental design for ingredient evaluation. *Aquaculture*. **344-349**: 90-99.
- Collins, S. A., M. Øverland, A. Skrede y col. 2013. Effect of plant protein sources on growth rate in salmonids: Meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture*. **400-401**: 85-100.

Chen, M. H. y Q. Yang. 2013. GWAF: an R package for genome-wide association analyses with family data. R package version 2.1 <http://CRAN.R-project.org/package=GWAF>. *Bioinformatics*. **26**: 580-581.

Cheng, Z. J., R. W. Hardy y M. Blair. 2003. Effects of supplementing methionine hydroxy analogue in soybean meal and distiller's dried grain-based diets on the performance and nutrient retention of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)]. *Aquaculture Research*. **34**: 1303-1310.

Chikwati, E. M., C. Sahlmann, H. Holm y col. 2013. Alterations in digestive enzyme activities during the development of diet-induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*. **402-403**: 28-37.

Cho, C. Y. 1992. Feeding Systems for Rainbow-Trout and Other Salmonids with Reference to Current Estimates of Energy and Protein-Requirements. *Aquaculture*. **100**: 107-123.

Chu, W. M. 2013. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*. **328**: 222-225.

Desai, A. R., M. G. Links, S. A. Collins y col. 2012. Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. **350-353**: 134-142.

Deutsch, L., S. Gräslund, C. Folke y col. 2007. Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. *Global Environmental Change*. **17**: 238-249.

Di Genova, A., A. Aravena, L. Zapata y col. 2011. SalmonDB: a bioinformatics resource for *Salmo salar* and *Oncorhynchus mykiss*. *Database*. **2011**:

Dunn, O. J. 1964. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics*. **6**: 241-252.

Esmon, C. T. 2005. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol*. **131**: 417-430.

Fligner, M. y T. Killeen. 1976. A Class of Two-Sample Distribution-Free Tests for Scale. *American Statistical Association*. **74**: 889-893.

Foulkes, A. S. 2009. Applied statistical genetics with R : for population-based association studies. Springer Verlag. New York.

Fredman, D., S. J. White, S. Potter y col. 2004. Complex SNP-related sequence variation in segmental genome duplications. *Nature Genetics*. **36**: 861-866.

Gao, X., M. Alvo, J. Chen y col. 2008. Nonparametric multiple comparison procedures for unbalanced one-way factorial designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*. **138**: 2574-2591.

Geurden, I., A. Cuvier, E. Gondouin y col. 2005. Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiology & Behavior*. **85**: 107-114.

Geurden, I., P. Borchert, M. N. Balasubramanian y col. 2013. The positive impact of the early-feeding of a plant-based diet on its future acceptance and utilisation in rainbow trout. *PLoS ONE*. **8**: e83162.

Gill, J. L., S. C. Bishop, C. McCorquodale y col. 2009. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genetics Selection Evolution*. **41**: 36.

Gomes, E., P. Rema y J. Sadasivam. 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture*. **130**: 177-186.

Guyomard, R., M. Boussaha, F. Krieg y col. 2012. A synthetic rainbow trout linkage map provides new insights into the salmonid whole genome duplication and the conservation of synteny among teleosts. *BMC Genetics*. **13**: 15.

Hansen, M. H., S. Young, H. B. Jorgensen y col. 2011. Assembling a dual purpose TaqMan-based panel of single-nucleotide polymorphism markers in rainbow trout and steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) for association mapping and population genetics analysis. *Molecular Ecology Resources*. **11**: 67-70.

Hardy, R. W. 2003. Use of soybean meals in diets of Salmon and Trout. American Soybean Association, United Soybean Board. 16.

Hardy, R. W. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*. **41**: 770-776.

Hart, S. D., A. S. Bharadwaj y P. B. Brown. 2010. Soybean lectins and trypsin inhibitors, but not oligosaccharides or the interactions of factors, impact weight gain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. **306**: 310-314.

Hedrera, M. I., J. A. Galdames, M. F. Jimenez-Reyes y col. 2013. Soybean meal induces intestinal inflammation in zebrafish larvae. *PLoS ONE*. **8**: e69983.

Heikkinen, J., J. Vielma, O. Kemilainen y col. 2006. Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. **261**: 259-268.

Herrmann, M. G., J. D. Durtschi, K. V. Voelkerding y col. 2006. Instrument Comparison for DNA Genotyping by Amplicon Melting. *Journal of the Association for Laboratory Automation*. **11**: 273-277.

Hunt, P. N., M. D. Wilson, K. R. von Schalburg y col. 2005. Expression and genomic organization of zonadhesin-like genes in three species of fish give insight into the evolutionary history of a mosaic protein. *BMC Genomics*. **6**: 165.

Iniesta, R., E. Guino y V. Moreno. 2005. Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Sanit*. **19**: 333-341.

Iturra, P., V. Cambiazo, M. Gonzalez y col. 2012. Genómica de Salmónidos: Identificación de genes asociados al uso de proteínas y aceites vegetales en la nutrición en salmón del Atlántico y trucha arcoíris. *Versión Diferente*. **9**: 36-40.

Jullien, N. 2013. AmplifX 1.6.2 by Nicolas Jullien ; CNRS, Aix-Marseille Université (<http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>).

Kalinowski, S. T., M. L. Taper y T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. **16**: 1099-1106.

Kanehisa, M. y S. Goto. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**: 27-30.

Karniol, B., A. Shirak, E. Baruch y col. 2009. Development of a 25-plex SNP assay for traceability in cattle. *Animal Genetics*. **40**: 353-356.

Kim, S. y A-. Misra. 2007. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. **9**: 31.

Kim, S. y A. Misra. 2007. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. **9**: 289-320.

Köse, I. y M. Yildiz. 2013. Effect of diets containing sesame oil on growth and fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*. 1-7.

Krogdahl, Å., M. Penn, J. Thorsen y col. 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*. **41**: 333-344.

Kruskal, W. H. y W. A. Wallis. 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *American Statistical Association*. **47**: 583-621.

Kumar, S., T. W. Banks y S. Cloutier. 2012. SNP Discovery through Next-Generation Sequencing and Its Applications. *International Journal of Plant Genomics*. **2012**:

Lansard, M., S. Panserat, I. Seilliez y col. 2009. Hepatic protein kinase B (Akt)-target of rapamycin (TOR)-signalling pathways and intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are not significantly affected by feeding plant-based diets. *British Journal of Nutrition*. **102**: 1564-1573.

Larsen, B. K., J. Dalsgaard y P. B. Pedersen. 2012. Effects of plant proteins on postprandial, free plasma amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. **326-329**: 90-98.

Le Boucher, R., E. Quillet, M. Vandeputte y col. 2011. Plant-based diet in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): Are there genotype-diet interactions for main production traits when fish are fed marine vs. plant-based diets from the first meal? *Aquaculture*. **321**: 41-48.

Leaver, M. J., L. A. Villeneuve, A. Obach y col. 2008. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*. **9**: 299.

Liew, M., R. Pryor, R. Palais y col. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry*. **50**: 1156-1164.

McCarthy, M. I. y J. N. Hirschhorn. 2008. Genome-wide association studies: potential next steps on a genetic journey. *Human Molecular Genetics*. **17**: 156-165.

McGlauffin, M. T., M. J. Smith, J. T. Wang y col. 2010. High-Resolution Melting Analysis for the Discovery of Novel Single-Nucleotide Polymorphisms in Rainbow and Cutthroat Trout for Species Identification. *Transactions of the American Fisheries Society*. **139**: 676-684.

Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, G. Bradley y col. 2009. Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. **32**: 755-766.

Morais, S., J. Pratoomyot, J. B. Taggart y col. 2011. Genotype-specific responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil: a liver transcriptomic analysis. *BMC Genomics*. **12**: 255.

Morais, S., T. Silva, O. Cordeiro y col. 2012. Effects of genotype and dietary fish oil replacement with vegetable oil on the intestinal transcriptome and proteome of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*. **13**: 448.

Nasopoulou, C. y I. Zabetakis. 2012. Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. *LWT - Food Science and Technology*. **47**: 217-224.

Navarrete, P., F. Magne, C. Araneda y col. 2012. PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PLoS ONE*. **7**:

Naylor, R. L., R. W. Hardy, D. P. Bureau y col. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**: 15103-15110.

Overturf, K., F. T. Barrows y R. W. Hardy. 2013. Effect and interaction of rainbow trout strain (*Oncorhynchus mykiss*) and diet type on growth and nutrient retention. *Aquaculture Research*. **44**: 604-611.

Palti, Y., C. Genet, G. Gao y col. 2012. A second generation integrated map of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) genome: analysis of conserved synteny with model fish genomes. *Marine Biotechnology*. **14**: 343-357.

- Panserat, S., G. A. Hortopan, E. Plagnes-Juan y col. 2009. Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture*. **294**: 123-131.
- Pettersson, A., L. Johnsson, E. Brännäs y col. 2009. Effects of rapeseed oil replacement in fish feed on lipid composition and self-selection by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*. **15**: 577-586.
- Pierce, L. R., Y. Palti, J. T. Silverstein y col. 2008. Family growth response to fishmeal and plant-based diets shows genotype×diet interaction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. **278**: 37-42.
- Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown y col. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. **81**: 559-575.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.cran.r-project.org/>.
- Ragoussis, J. 2009. Genotyping Technologies for Genetic Research. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. **10**: 117-133.
- Romarheim, O. H., A. Skrede, Y. Gao y col. 2006. Comparison of white flakes and toasted soybean meal partly replacing fish meal as protein source in extruded feed for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. **256**: 354-364.
- Rozen, S. y H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers (<http://primer3.ut.ee/>). *Methods Mol Biol*. **132**: 365-386.
- Sae-Lim, P., H. Komen, A. Kause y col. 2013. Enhancing selective breeding for growth, slaughter traits and overall survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. **372-375**: 89-96.
- Salem, M., R. L. Vallejo, T. D. Leeds y col. 2012. RNA-Seq Identifies SNP Markers for Growth Traits in Rainbow Trout. *PLoS ONE*. **7**: e36264.
- Salem, M., R. L. Vallejo, T. D. Leeds y col. 2012. RNA-Seq Identifies SNP Markers for Growth Traits in Rainbow Trout. *PLoS ONE*. **7**:
- Sauvage, C., M. Vagner, N. Derome y col. 2012. Coding Gene SNP Mapping Reveals QTL Linked to Growth and Stress Response in Brook Charr (*Salvelinus fontinalis*). *G3 Genes|Genomes|Genetics*. **2**: 707-720.
- Seeb, J. E., C. E. Pascal, E. D. Grau y col. 2011. Transcriptome sequencing and high-resolution melt analysis advance single nucleotide polymorphism discovery in duplicated salmonids. *Molecular Ecology Resources*. **11**: 335-348.
- Seipp, M. T., M. Herrmann y C. T. Wittwer. 2010. Automated DNA extraction, quantification, dilution, and PCR preparation for genotyping by high-resolution melting. *J Biomol Tech*. **21**: 163-166.

Shapiro, S. S. y M. B. Wilk. 1965. An Analysis of variance test for Normality (complete samples). *Biometrika*. **52**: 591 - 611.

Sheng, Y. H., S. Z. Hasnain, T. H. J. Florin y col. 2012. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **27**: 28-38.

Shin, J., S. Blay, N. Lewin-Koh y col. (2006). LDheatmap: An R function for graphical display of pairwise linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms. R package version 2.1. <http://CRAN.R-project.org/package=LDheatmap>. *Journal of Statistical Software*. **16**: Code Snippet 3.

Stone, D. A. J., A. C. M. Oliveira, C. F. Ross y col. 2011. The effects of phase-feeding rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with canola oil and Alaskan pollock fish oil on fillet fatty acid composition and sensory attributes. *Aquaculture Nutrition*. **17**: 521-529.

Tacon, A. G. J., M. R. Hasan y M. Metian 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Taggart, J. B., R. A. Hynes, P. A. Prodöhl y col. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*. **40**: 963-965.

Turchini, G. M., V. M. Moretti, K. Hermon y col. 2013. Monola oil versus canola oil as a fish oil replacer in rainbow trout feeds: Effects on growth, fatty acid metabolism and final eating quality. *Food Chemistry*. **141**: 1335-1344.

Turchini, G. M., B. E. Torstensen y W.-K. Ng. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*. **1**: 10-57.

Ujino-Ihara, T., Y. Taguchi, Y. Moriguchi y col. 2010. An efficient method for developing SNP markers based on EST data combined with high resolution melting (HRM) analysis. *BMC Research Notes*. **3**: 51.

Ulloa, P., P. Iturra, R. Neira y col. 2011. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 1-18-18.

Uran, P. A., A. A. Goncalves, J. J. Taverne-Thiele y col. 2008. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol*. **25**: 751-760.

Van der Marel, M., M. J. Pröpsting, F. Battermann y col. 2014. Differences between intestinal segments and soybean meal-induced changes in intestinal mucus composition of common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Nutrition*. **20**: 12-24.

Van Eenennaam, A. L., R. L. Weaver, D. J. Drake y col. 2007. DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. *Journal of Animal Science*. **85**: 3159-3169.

- Van Tassell, C. P. y L. D. Van Vleck. 1996. Multiple-trait Gibbs sampler for animal models: flexible programs for Bayesian and likelihood-based (co)variance component inference. *Journal of Animal Science*. **74**: 2586-2597.
- Wang, Z., H. Jiang, S. Chen y col. 2012. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*. **148**: 228-243.
- Warnes, G., G. Gorjanc, F. Leisch y col. (2013). genetics: Population Genetics. R package version 1.3.8.1. <http://CRAN.R-project.org/package=genetics>.
- Weller, J. I., E. Seroussi y M. Ron. 2006. Estimation of the number of genetic markers required for individual animal identification accounting for genotyping errors. *Animal Genetics*. **37**: 387-389.
- Wiedermann, C. J. y J. Römisch. 2002. The Anti-Inflammatory actions of Antithrombin - A Review. *Acta Medica Austriaca*. **3**: 89 - 92.
- Wu, S. B., M. G. Wirthensohn, P. Hunt y col. 2008. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theoretical Applied Genetics*. **118**: 1-14.
- Yamamoto, T., N. Suziki, H. Furuita y col. 2007. Supplemental effect of bile salts to soybean meal-based diet on growth and feed utilization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Science*. **73**: 123 - 131.
- Yildiz, M., O. T. Eroldogan, K. Engin y col. 2013. Effects of Dietary Cottonseed and/or Canola Oil Inclusion on the Growth Performance, FA Composition and Organ Histology of the Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **13**: 453 - 464.
- Zar, J. 2010. *Biostatistical Analysis*. Pearson Prentice Hall. 286-295, New Jersey.

ANEXO

Anexo 1. Protocolo de Extracción ADN.

Modificado por Taggart et al. (1992). A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*, 40: 963-965

Materiales requeridos.

Soluciones

1. 0.2 M EDTA pH 8.0; 0.5% sodium lauroylsarcosine (SIGMA L-5125) o 50 mM Tris HCl pH 8.0; 100 mM EDTA pH 8.0; 100 mM NaCl; 1% SDS
2. Proteinasa K 20 mg / ml
3. RNAsa (libre de DNAsa) 20 mg / ml
4. Fenol equilibrado pH 8.0
5. Cloroformo
6. Etanol 92%
7. Etanol 70%
8. Buffer TE (1/4 TE; 3/4 Agua PCR)

Tubos Eppendorff con tapa estériles

Puntas de micropipetas estériles

Baño de agua / incubador a 55° C y 37° C

Día 1

1. Agregar a cada tubo Eppendorff 375 ul de la Solución 1 y 10 ul de Proteinasa K
2. Agregar tejido a cada tubo (por ejemplo 70 mg músculo, 10 mg hígado), secar con un papel absorbente el exceso de Etanol en el tejido.
3. Agitar vigorosamente e incubar (baño de agua) durante la noche, con movimiento, a una temperatura de 55° C.

Día 2

4. Agregar 10 ul de RNAsa a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos e incubar por 60 minutos a una temperatura de 37° C.
5. Agregar 400 ul de Fenol a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos y luego agitarla por 20 minutos.
6. Agregar 400 ul de Cloroformo a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos y luego agitarla por 20 minutos.
7. Centrifugar los tubos (ej. 10.000 rpm) durante 5 minutos
8. Cuidadosamente remover 300 ul de la fase acuosa superior (usando una punta de micropiteta de boca ancha) a un tubo Eppendorff nuevo. Nota: No tocar el material de la interfase. Usar solo las fases acuosas libres de desechos residuales.

9. Agregar 900 ul de Etanol 92%. Mezclar mediante vigorosa inversión de los tubos 6 veces. El ADN debiera precipitar (condensarse). Dejarlo reposar durante 3 minutos. Extraer el Etanol.
10. Agregar 1000 ul de Etanol 70%. Agitarlo suavemente por 30 minutos (preferiblemente durante la noche a temperatura ambiente). Cuidadosamente extraer el Etanol.
11. Cuidadosamente extraer el Etanol restante (50 a 100 ul) usando una micropipeta.
12. Permitir que el ADN se seque parcialmente a temperatura ambiente (5 minutos), NO permitir que se seque completamente. Resuspender el pellet en el Buffer TE (aleta en 100 ul). Permitir que el ADN se disuelva a temperatura ambiente por dos días. Luego congelar el ADN a -70°C .

Anexo 2. Archivo genotipo paquete GWAF.

Tabla de archivos que contiene el ID de cada individuo y seguido de los datos de genotipo de cada uno. Los SNP son codificados usando los números 1, 2 y 3. Los cuales representan las copias de cada alelo. Para ver tabla de datos:

<https://www.dropbox.com/sh/arvu36m19wd5w7g/fv6iPzY4a7>

Anexo 3. Archivo fenotipo paquete GWAF.

Tabla de archivos que contiene el ID de cada individuo, su fenotipo y las covariables asociadas. Creándose cuatro tablas distintas para cada una de las variables de interés (Peso final, DIF, SGR y TGC). Donde solo se uso una covariable (Peso inicial) en la tabla de Peso final. Para ver tablas de datos:

<https://www.dropbox.com/sh/arvu36m19wd5w7g/fv6iPzY4a7>

Anexo 4. Archivo Parentesco paquete GWAF.

Tabla de archivos que contiene la asignación familiar de cada individuo: Familia a la cual pertenecen, Padre, Madre, sexo individuo y ID de cada individuo. Para ver tabla de datos:

Anexo 5. Línea de Comando usada en el paquete GWAF para el análisis de asociación.

```
>geepack.quant.batch(phenfile="Phenotype file.csv", genfile="Genotype file.csv",
pedfile="Pedigree file.csv", phen="phen1", covars=T, model="a", outfile="simout.csv",
sep.ped=";", sep.phe=";", sep.gen=";")
```

Donde:

Geepack.quant.batch: Corresponde a la función utilizada.

phenfile="Phenotype file.csv": Archivo de fenotipo.

genfile="Genotype file.csv": Archivo de genotipo.

pedfile="Pedigree file.csv": Archivo de parentesco.

phen="phen1": Nombre columna de fenotipo en archivo de fenotipo.

covars=T: Se acepta el uso de covariable.

model="a": Modelo usado; "a" aditivo, "r" recesivo, "d" dominante y "g" general
 outfile="simout.csv": Archivo de salida de datos.
 sep.ped=",", sep.phe=",", sep.gen=",": Corresponde al separador usado los tres
 archivos de entrada.

Anexo 6. Secuencia EST y partidores de SNP seleccionados.

La secuencia de cada EST y partidor diseñado para cada SNP se encuentra disponible en formato Excel en la siguiente dirección:

<https://www.dropbox.com/sh/arvu36m19wd5w7g/fv6iPzY4a7>

Anexo 7. Resultados prueba de partidores.

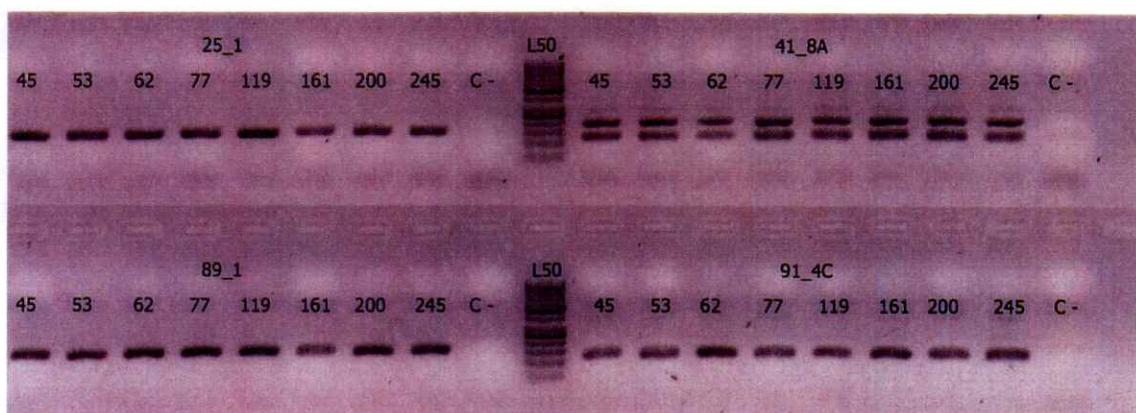


Figura 11. Prueba partidores SNPs 25_1, 41_8A, 89_1 y 91_4C.

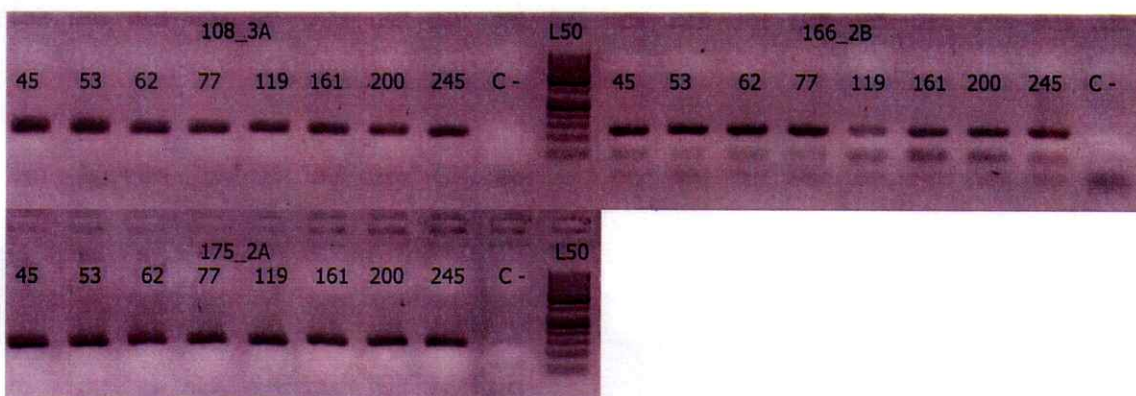


Figura 12. Prueba partidores SNPs 108_3A, 166_2B y 175_2A.

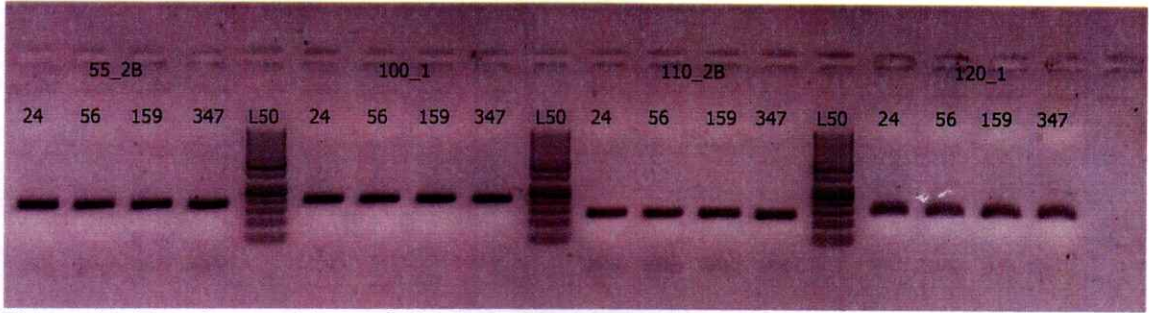


Figura 13. Prueba partidores SNPs 55_2B, 100_1, 110_2B y 120_1.

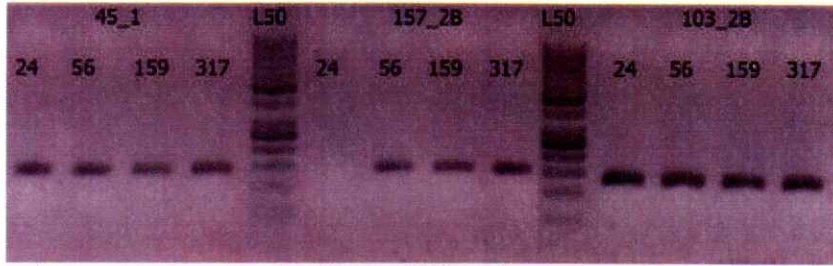


Figura 14. Prueba partidores SNPs 45_1, 157_2B y 103_2B.

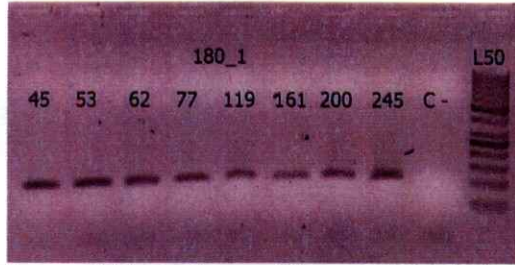


Figura 15. Prueba partidores SNP 180_1.

Anexo 8. Gradiente de Temperatura para los partidores 41_8A y 166_2B.

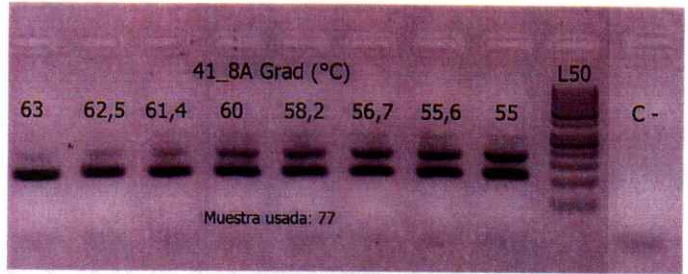


Figura 16. Gradiente de temperatura (63-55°C) en fase aneling para SNP 41_8A.

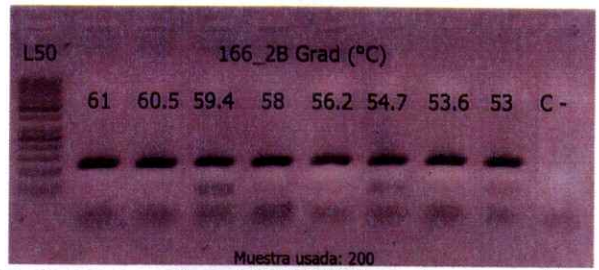


Figura 17. Gradiente de temperatura (61-53°C) en fase aneling para SNP 166_2B.

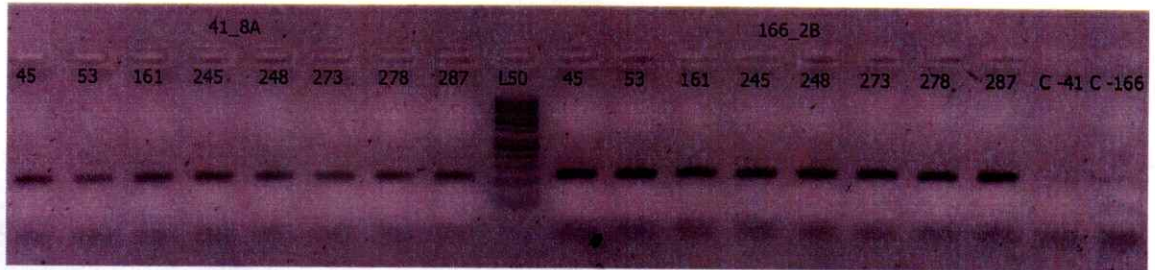


Figura 18. Prueba partidores 41_8A y 166_2B con nueva temperatura de aneling (61°C)

Anexo 9. Genotipo, frecuencia genotípica y alélica por SNP.

SNP	Genotipo	N	Frecuencia Genotípica	Alelo	Frecuencia Alélica
108_3A	CC	47	0.58	C	0.76
	TT	5	0.06	T	0.24
	CT	29	0.36	-	-
166_2B	AA	3	0.04	A	0.30
	GG	34	0.44	G	0.70
	AG	40	0.52	-	-
175_2A	CC	22	0.27	C	0.44
	TT	32	0.40	T	0.56
	CT	27	0.33	-	-
25_1	CC	54	0.67	C	0.83
	TT	0	0.00	T	0.17
	CT	27	0.33	-	-
91_4B	TT	68	0.85	T	0.92
	CC	1	0.01	C	0.08
	CT	11	0.14	-	-
41_8A	CC	53	0.67	C	0.84
	TT	0	0.00	T	0.16
	CT	26	0.33	-	-
45_1	GG	44	0.56	G	0.77
	TT	1	0.01	T	0.23
	GT	34	0.43	-	-
103_2B	TT	24	0.30	T	0.61
	GG	6	0.07	G	0.39
	GT	51	0.63	-	-
157_2B	GG	55	0.70	G	0.84
	AA	2	0.03	A	0.16
	AG	22	0.28	-	-
100_1	TT	77	0.95	T	0.98
	CC	0	0.00	C	0.02
	TC	4	0.05	-	-

