



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE ASOCIACIÓN GENÉTICA ENTRE
TAMAÑO CORPORAL Y RESISTENCIA FRENTE A
PANCREATITIS NECROTICA INFECCIOSA (IPN) EN
SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) EN UN DESAFÍO
EXPERIMENTAL

MIGUEL GUZMÁN MUÑOZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA : VICTOR MARTINEZ M.

Financiamiento: Proyecto Corfo-Innova (05CT6 PP-10).

SANTIAGO, CHILE
2009



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE ASOCIACIÓN GENÉTICA ENTRE TAMAÑO CORPORAL Y RESISTENCIA FRENTE A PANCREATITIS NECROTICA INFECCIOSA (IPN) EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) EN UN DESAFÍO EXPERIMENTAL

MIGUEL GUZMÁN MUÑOZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento Fomento de la
Producción Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : VÍCTOR MARTÍNEZ M.
PROFESOR CONSEJERO: HERNAN AGÜERO E.
PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO L.

SANTIAGO, CHILE
2009

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica.....	3
2.1. Objetivos del mejoramiento.....	3
2.2. Resistencia y tolerancia.....	3
2.3. Correlaciones.....	4
2.4. Covarianzas entre resistencias a enfermedades y otros caracteres de interés en especies productivas.....	4
2.5. Correlaciones en moluscos.....	5
2.6. Variación genética para resistencia a enfermedades en peces.....	5
2.7. Anemia Infecciosa del Salmón.....	6
2.8. Pancreatitis Necrótica Infecciosa.....	8
2.9. Asociación entre producción y resistencia a enfermedades.....	9
2.10. Desafíos experimentales vs. brotes de campo.....	11
2.11. Modelos estadísticos utilizados en el mejoramiento de la resistencia a enfermedades.....	12
2.12. Genética del parecido entre parientes.....	13
3. Objetivo general.....	15
4. Objetivos específicos.....	15
5. Material y métodos.....	16
5.1. Desafío experimental.....	16
5.2. Medición de características.....	17
5.3. Análisis estadístico.....	18
5.4. Cálculo de parámetros genéticos.....	19
6. Resultados y discusión.....	20
6.1. Descripción estadística de las variables.....	20
6.2. Análisis genético.....	26
6.2.1. Estimación de componentes de varianza explicado como parte del modelo.....	26

6.2.2. Estimación de parámetros genéticos: heredabilidades y correlaciones.....	26
6.2.3. Estimación de respuesta a la selección.....	30
6.2.4. Respuestas correlacionadas.....	31
6.2.5. Efecto de la selección natural.....	32
6.2.6. Selección directa por resistencia.....	33
7. Conclusiones.....	35
8. Bibliografía.....	36

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, de quienes he sentido un gran apoyo no sólo durante mi etapa universitaria y durante el desarrollo de este trabajo, si no también a lo largo de toda mi vida. Esto a pesar de ciertas fluctuaciones en el tenor de nuestras relaciones, lo que incluye desde haber estado en mas de una ocasión al borde del exilio, hasta todos los buenos momentos que son la mayoría.

A Claudia, quien ha estado conmigo desde que empecé esta memoria, por su apoyo y compañía, y haberse dado el trabajo de leerla para ayudarme a corregirla. Pero muy especialmente porque me alegra la vida a diario, y sé que siempre estará a mi lado para reírme “con ella” (no de ella).

A mis amigos, tanto dentro de la Universidad como fuera de ella, ya que siempre es importante saber con quien se puede contar en cualquier situación, además de pasar buenos ratos compartiendo, o jugando fútbol.

A mi profesor guía, Víctor Martínez, que junto a José Manuel Yañez han sido imprescindibles al momento de entrar en el mundo de la genética. Además, siempre han sabido darse un tiempo para ayudarme con todas mi dudas.

A mis profesores consejeros: Hernán Agüero, por su dedicación y paciencia, además de todas las modificaciones que sugirió para mejorar esta memoria. José Pizarro, por su gran eficiencia y rapidez para revisar este trabajo, y por hacerme ver cosas importantes que había pasado por alto

A Norma San Martín y Octavio González, que como parte del departamento de Fomento de la Producción Animal, han tenido que brindarme su ayuda como con otros tantos tesistas, y siempre lo han hecho con una gran amabilidad.

RESUMEN

La Pancreatitis Necrótica Infecciosa (IPN) es una enfermedad distribuida mundialmente que afecta a distintas especies de salmónidos, siendo uno de los más susceptibles el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). En Chile, así como en otros países, es una de las principales causas de mortalidad, especialmente durante la fase de crianza de agua dulce. Considerando la importancia económica de dicha enfermedad para la salmonicultura nacional, el propósito de este estudio es determinar las fuentes de (co) variación genética de la resistencia a IPN y el peso corporal; y así estimar la respuesta correlacionada en resistencia debida a la selección directa por peso corporal de alevín.

Se utilizó un modelo de estudio de desafío experimental en el Laboratorio de Virología de la Universidad de Santiago de Chile. Un total de 4.310 alevines (pertenecientes a 29 familias de propios hermanos) se enfrentó al virus del IPN (IPNv) mediante inmersión. La crianza inicial después de la incubación, se llevó a cabo en la Unidad Experimental de la “Universidad de Chile”, en Castro.

Se utilizó un modelo bivariado para la estimación de los parámetros genéticos para peso corporal y resistencia a IPN (medida como días hasta la muerte). El peso corporal fue obtenido inmediatamente después de la muerte; mientras que la resistencia a IPN se consideró como una variable normal a través del tiempo.

Se obtuvo varianza genética significativa tanto para peso corporal como resistencia a IPN, con heredabilidades que alcanzan a $0,66 \pm 0,19$ y $0,56 \pm 0,32$; respectivamente. Los valores relativamente grandes de estas estimaciones de los parámetros es probable que se deban por los efectos ambientales comunes. Una correlación genética significativa de $-0,68 \pm 0,11$ se encontró entre ambas características.

Los resultados muestran que seleccionar directamente por resistencia entregaría una respuesta correlacionada negativa para peso corporal; mientras que, la selección hecha antes de la fase de agua dulce para aumentar el peso corporal, tendría un gran impacto en disminuir la resistencia a IPN del salmón del Atlántico.

SUMMARY

The infectious Pancreatic Necrosis (IPN) is a worldwide distributed disease that affects different salmonids, the Atlantic salmon (*Salmo salar*) being one of more susceptible species worldwide. In Chile, as in other countries, it is one of most important diseases causing severe mortalities, in particular during the fresh-water rearing phase. Considering the economic importance of this disease for the national salmon farming, the purpose of this study is to determine the sources of genetic (co) variance to IPN resistance and body weight; thus estimating the correlated response to resistance caused by the direct selection for fry's body weight.

A study of experimental challenge model was utilized at the Virology Laboratory of the "Universidad de Santiago de Chile". A total of 4,310 fry (belonging to 29 full-sib families) was challenged to the IPN virus (IPNv) by immersion. The initial rearing after hatching was carried out at the Experimental unit of the "Universidad de Chile" in Castro.

A Bivariate model was used for estimating genetic parameters for body weight and IPN resistance (measured as the days at death). The body weight was obtained immediately after death; meanwhile the IPN resistance was considered as a normal variable across the time.

Significant genetic variance was obtained for both body weight and IPN resistance, with heritabilities reaching to $0,66 \pm 0,19$ and $0,56 \pm 0,32$; respectively. The relatively large values of these parameter estimates are likely to be due by common environmental effects. A significant genetic correlation of $-0,68 \pm 0,11$ was found between both traits.

The results show that selection directly by resistance would get a negative correlated response to body weight; meanwhile, the selection made before the sea water phase increasing the body weight, would have a large impact in decreasing the IPN resistance of Atlantic salmon.

1. INTRODUCCIÓN

Chile es un país con extraordinarias cualidades para el desarrollo del sector acuicultor, dada la existencia a lo largo de todo el territorio nacional de favorables y diversas condiciones medioambientales para la producción de variadas especies. La mayor parte de los cultivos se llevan a cabo por la industria salmonera, alcanzando un 80% (FAO, 2008). Una característica importante de las exportaciones nacionales, es el hecho que se encuentran bastante concentradas, principalmente en Japón y EE.UU.

El virus de la Pancreatitis Necrótica Infecciosa (IPN) produjo durante el año 1996 pérdidas por un monto igual a 60 millones de dólares en Noruega (Christie, 1997). Este hecho pone en evidencia la importancia de mantener bajo control las enfermedades infecciosas en el salmón por el impacto que tienen dentro del sistema productivo. El control y tratamiento de enfermedades infecciosas se ha llevado a cabo principalmente en base a vacunas y antibióticos, siendo importantes también las medidas de bioseguridad y minimización del estrés. Sin embargo, ninguna medida por separado es suficiente, y es necesaria la complementación de todas en un programa eficiente de control de enfermedades infecciosas.

Los programas de mejoramiento genético en salmones han permitido aumentar el retorno económico en diversas especies de interés productivo. Para ésto, debe establecerse los objetivos de mejoramiento para cada especie y población en particular, y así incluir todas las características de interés productivo para maximizar el retorno económico. De esta forma, en los salmones se incluyen caracteres relacionados con el crecimiento corporal, color, y textura de la carne, y más recientemente la resistencia genética a enfermedades de tipo viral y bacteriano. Todos estos programas han sido exitosos gracias a la alta fecundidad de los salmones y la elevada variabilidad genética que tienen las características asociadas (Fjalestad *et al.*, 2003).

El mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades puede entregar una solución directa para el control de enfermedades infecciosas, y con ésto disminuir los costos

asociados a planes de vacunación y tratamientos, además de reducir las pérdidas directas ocasionadas por las mortalidades, así como disminuir las pérdidas productivas en términos económicos. Además, cuando se trata de enfermedades bacterianas, el abuso o mal uso de antibióticos puede conllevar a un aumento en la resistencia por parte de las bacterias (Gjøen *et al.*, 1997).

Para considerar la resistencia a enfermedades, en conjunto con otras variables económicamente importantes dentro de un programa de mejoramiento genético, es importante conocer previamente la correlación con otros caracteres incluidos dentro del objetivo de mejoramiento, de forma tal de generar un objetivo que permita finalmente maximizar la rentabilidad global del sistema productivo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para el año 2004 se alcanzó una producción mundial en la acuicultura de peces, crustáceos y moluscos cercana a 45 millones de t. De este total, casi 2 millones de t fueron del grupo de salmones, truchas y eperlanos; correspondiendo casi el 60% de ese subgrupo al cultivo del Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), (FAO, 2008). La producción acuícola mundial superó las estimaciones hechas años atrás, en las cuales se esperaba que para 2010 hubiese 37,5 millones de toneladas en el ítem de producción total de la acuicultura (Gjedrem, 1997). Este incremento ha sido posible por una suma de factores, como el desarrollo de tecnologías, mejoramiento de las medidas de higiene y bioseguridad, desarrollo de vacunas, y en forma muy importante la selección genética en los peces.

2.1. Objetivos del mejoramiento

Noruega llevó a cabo un programa nacional de mejoramiento entre los años 1975 y 1996, donde completó 5 generaciones seleccionadas de Salmón del Atlántico y 7 de trucha arcoiris. Los caracteres considerados en este programa fueron tasa de crecimiento, calidad de canal, y resistencia a IPN y Furunculosis. Se pudo comprobar que los peces producto de este programa crecieron un 77% más rápido que los peces silvestres (Gjedrem, 1998).

2.2. Resistencia y tolerancia

La capacidad de un hospedero para generar una respuesta con el objetivo de prevenir el asentamiento de un agente infeccioso y que por consiguiente se establezca un cuadro infeccioso, se denomina “resistencia” (Nath *et al.*, 2004). Por otro lado, si el agente infeccioso logra evadir los mecanismos de defensa del hospedero y genera una enfermedad, se define como “tolerancia” a la capacidad del hospedero de mantener una producción relativamente normal mientras padezca la enfermedad (Bisset y Morris, 1996).

2.3. Correlaciones

Una correlación es una medida del grado de asociación entre dos características. La principal causa genética de correlación entre dos caracteres es la pleiotropía, que es la propiedad de un gen de afectar a dos o más caracteres. La correlación que es posible obtener directamente a través de las observaciones es la correlación fenotípica (Falconer y Mackay, 1996).

Dentro de los programas de mejoramiento desarrollados para producción animal, donde la industria salmonera no está al margen, es importante conocer las correlaciones entre los caracteres que se incluyan dentro de los objetivos de mejoramiento.

2.4. Covarianzas entre resistencia a enfermedades y otros caracteres de interés en especies productivas

Luego de aplicar una vacuna a virus vivo de Newcastle en pavos es normal que haya un cierto porcentaje de mortalidad. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a la tasa de mortalidad entre distintas líneas genéticas. De esta forma, se ha determinado que la línea seleccionada para obtener un mayor peso corporal, es la que resultó tener las más altas mortalidades (Saif y Nestor, 2001). Por lo tanto, en este caso se observa como la selección genética para mejorar una característica (aumento de peso corporal), tuvo como desventaja que los ejemplares sean menos resistentes frente a la vacunación para el virus de Newcastle. Esto sugiere que al mismo tiempo que se ha seleccionado genes favorables para un mayor peso corporal, se ha seleccionado indirectamente genes relacionados con la respuesta inmune, que resultaron detrimentales al momento de enfrentarse a una vacuna contra esta enfermedad.

En gallinas Leghorn, también se ha observado relaciones de este tipo. En un estudio donde la respuesta inmune o resistencia a determinados eventos infecciosos, se evaluó mediante niveles de anticuerpos sanguíneos, se encontró que los animales más livianos se correspondían con los niveles de anticuerpos más altos (Gross *et al.*, 2002).

2.5. Correlaciones en moluscos

Se ha podido determinar que los camarones presentan variación genética, tanto a peso corporal a la cosecha como a las enfermedades infecciosas. De esta forma, se ha estimado que la correlación entre peso corporal a la cosecha y resistencia al “Virus del Síndrome de la Mancha Blanca” (WSSV), en dos líneas distintas es de $-0,55 \pm 0,18$ y $-0,64 \pm 0,19$ (Gitterle *et al.*, 2005). Además, se ha determinado que la correlación entre peso y otra enfermedad viral en camarones, “Virus del Síndrome Taura” (TSV), alcanza un valor de $-0,46 \pm 0,18$ (Argue *et al.*, 2002).

2.6. Variación genética para resistencia a enfermedades en peces

Diversos experimentos han demostrado la existencia de varianza genética para resistencia a enfermedades infecciosas. Dentro de las enfermedades bacterianas a las que han sido desafiados experimentalmente los peces, se incluyen Furunculosis, Vibriosis, y Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD). Por otra parte, en relación a las enfermedades virales con las que se han hecho desafíos experimentales se incluyen septicemia viral hemorrágica (VHS) y Anemia Infecciosa del Salmón (ISA). En todos los casos, se ha determinado varianza genética aditiva significativa para resistencia, para cada una de estas enfermedades.

En los desafíos de peces frente a Furunculosis, se ha encontrado variación genética entre familias en cuanto a resistencia (Gjedrem y Gjøen, 1995; Gjedrem *et al.*, 1991). Además, existen poblaciones silvestres que presentan naturalmente mayor resistencia a la enfermedad (Beacham y Evelyn, 1992). Lo anterior indica que existe variación genética en la resistencia a Furunculosis dentro de la población de salmones, lo que es importante al momento de establecer un programa de mejoramiento genético donde se incluya la resistencia a esta enfermedad.

Se ha determinado una correlación genética positiva entre resistencias a diferentes enfermedades bacterianas (Gjedrem y Gjøen, 1995; Gjedrem *et al.*, 1991). Ello indicaría que la selección en favor de resistencia a una enfermedad en particular, entrega resultados

favorables para las otras en términos de resistencia, aunque en distinta medida. En general, no es posible lograr un avance tan eficiente por esta selección “indirecta”, en comparación a incluir las resistencias a varias enfermedades de interés dentro de los objetivos de selección en un programa de mejoramiento genético.

En relación a las enfermedades infecciosas de origen viral, en el caso del VHS, se determinó que existía una heredabilidad de 0,13 para la resistencia a la enfermedad (Henryon *et al.*, 2002); mientras que para la resistencia a ISA la heredabilidad fue de $0,32 \pm 0,02$ (Ødegard *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que la progenie de una cepa de trucha arco iris adquirió resistencia genética a IPN luego de un brote espontáneo (Okamoto *et al.*, 1993). Estos hallazgos indicarían que el mejoramiento genético de la resistencia a dichas enfermedades puede llevarse a cabo. Esto último resulta de gran interés, debido al escenario sanitario actual de Chile con respecto al ISA.

2.7. Anemia Infecciosa del Salmón

La Anemia Infecciosa del Salmón es producida por un virus del género Isavirus, perteneciente a la familia Orthomyxoviridae, existiendo dos subtipos: el americano y el europeo (Kibenge *et al.*, 2004). Las últimas investigaciones llevadas a cabo en base a aislados chilenos del virus, sugieren que los brotes observados en el país a mediados del año 2007 hasta finales del año 2008, habrían sido causados por una cepa del virus mutada que ya se encontraba presente en el país; un análisis filogenético indicaría que la cepa chilena diverge de la noruega el año 1996 y el año 2005 habría sufrido una inserción en el gen que codifica para la glicoproteína F, luego de lo cual se habría diseminado por distintos centros de cultivos antes del brote presentado en Junio del 2007 (Kibenge *et al.*, 2009).

Las células endoteliales son el principal blanco del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAv), aunque también ataca células como leucocitos polimorfonucleares. A partir del día 5 post-infección empieza a aumentar la carga viral, la que llega a su peak alrededor del día 15, y disminuye drásticamente hacia el día 25, hecho que estaría explicado por la reacción del sistema inmune del hospedero. Sin embargo, el virus no es eliminado, y luego del día

25 la carga se eleva nuevamente, presentándose la etapa terminal del ISA. Los principales síntomas observados son: anemia, con hematocrito bajo el 10%; ascitis; congestión del hígado y bazo; hemorragias petequiales en órganos peritoneales y en los ojos (Rimstad y Mjaaland, 2002).

Usualmente el hospedero que presenta el cuadro clínico es el salmón del Atlántico, siendo las otras especies de cultivo portadores asintomáticos, sin embargo se ha aislado el virus desde salmónes Coho que presentaban el cuadro clínico en Chile (Kibenge *et al.*, 2001).

Desde que se detectaron los primeros brotes en Chile, el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), ha dictado varias normas para hacer frente a la enfermedad, entre las que se cuentan la eliminación o cosecha de las jaulas con animales afectados por ISA, delimitación de zonas de cuarentena y vigilancia, restricción de movimientos de la zona afectada, medidas de bioseguridad estrictas, condiciones de cosecha y proceso especiales para centros ubicados en las zonas bajo cuarentena y vigilancia, establecimiento de barrera sanitaria para las regiones XI y XII, monitoreo y vigilancia permanente de los centros de las zonas afectadas y otros relacionados con el brote. Además, los laboratorios de diagnóstico y empresas de cultivo deberán realizar reportes inmediatos de los resultados y cambios clínicos sugerentes de la enfermedad. Estas medidas se complementan con otras que afectan el movimiento de alimentos, redes, mortalidades, equipos y personas dentro de las áreas en cuarentena y vigilancia (SERNAPESCA, 2007).

El ISA es una enfermedad grave diseminada ampliamente por distintos países que en un brote puede llegar a presentar mortalidades superiores al 90% (Kibenge *et al.*, 2001). Las pérdidas económicas, en general, se asocian a la pérdida operacional por cosecha anticipada y mortalidades; eliminación de centros de agua mar y eliminación de existencias de agua dulce por ajuste del plan de producción. Dentro de este contexto, se puede citar las pérdidas económicas de la empresa Multiexport que realiza cultivos en Chile, cuyo monto alcanzó a US\$ 114,6 millones por causa del ISAv durante el año 2008 (Aqua.cl, 2009).

2.8. Pancreatitis Necrótica Infecciosa

El virus del IPN (IPNv) es un birnavirus pequeño, sin envoltura, y con una doble hebra de RNA, que es capaz de desarrollar la enfermedad en peces en aguas dulces, saladas y estuarinas. Es un virus que puede causar hasta un 70% de mortalidades en alevines de variadas especies salmonídeas. Mientras más jóvenes, más severos y explosivos serán los signos y mortalidades, viéndose al examen postmortem focos necróticos en el páncreas exocrino e hígado, además de estar amarillento y friable. El abdomen se observa abultado, y el intestino repleto de un exudado blanco amarillento. Estos son los principales entre otros, tanto macro como microscópicos (Roberts y Pearson, 2005).

El virus del IPN está ampliamente difundido en distintos huéspedes, entre los que se encuentran el salmón del Pacífico, la trucha de arroyo, y el salmón del Atlántico, siendo los dos últimos los más susceptibles. Además, pueden ser huéspedes de este virus moluscos y crustáceos que, siendo asintomáticos, podrían influir en la diseminación de la enfermedad, así como también aves silvestres que se alimentan de peces (McAllister y Owens, 1992).

La transmisión del IPNv puede ser tanto vertical como horizontal. Para evitar mayores pérdidas en alevines de primera alimentación, infectados vía vertical a través de las ovas, es que los reproductores son chequeados en forma rutinaria por muestras de riñón o fluidos gonadales (OIE, 2000), técnica considerada de rutina en Chile.

El IPN es una enfermedad no sólo de importancia para Chile, sino que está ampliamente diseminada y es reconocida como la enfermedad mas importante por su impacto en la producción salmonídea en países de la Unión Europea y Noruega (Ariel y Olesen, 2002).

Debido a la importancia de la enfermedad, ya se han empezado a generar programas de mejoramiento que incluyen entre otras características, la resistencia a IPN. Producto de estos programas, se han obtenido estimaciones de heredabilidades para resistencia a IPN en salmón del Atlántico en Noruega. Así, se han informado heredabilidades encontradas para esta característica con valores desde 0,17 a 0,45 (Wetten *et al.*, 2007). En otro estudio Guy

et al. (2009) determinaron heredabilidades para mortalidad por IPN, cuyos valores variaron entre 0,07 y 0,56.

Noruega lidera los programas de mejoramiento genético en salmones a través de empresas como Aqua Gen y SalmoBreed. Aqua Gen es la principal productora de huevos fertilizados, exportando sus productos a varios países incluido Chile. En la actualidad, Aqua Gen incluye 22 características en su programa de mejoramiento para salmón del Atlántico; mientras que SalmoBreed, realiza sus investigaciones con el prestigioso centro de investigaciones genéticas Akvaforsk. El objetivo para ambas empresas es maximizar la eficacia de la selección, manteniendo la consanguinidad lo más bajo posible.

Actualmente, los programas de mejoramiento apuntan no solo a aumentar la resistencia a una determinada enfermedad y el tamaño de los peces. El objetivo es obtener peces más “robustos”, para lo cual deben medirse nuevas características, como capacidad del corazón y sistema circulatorio, y efectos colaterales de vacunas, entre otras. Ello se explica porque en la práctica no se requiere sólo un pez más resistente a una enfermedad bacteriana o viral, sino que sea resistente a un abanico de enfermedades, y esté mejor preparado al momento de enfrentarse a cualquiera de ellas.

2.9. Asociación entre producción y resistencia a enfermedades

Los antecedentes bibliográficos que se presentan a continuación, sugieren que la relación entre producción y resistencia variaría según el tipo de enfermedades infecciosas. En el caso de las enfermedades bacterianas, parece haber una correlación positiva entre crecimiento y resistencia; mientras que para las enfermedades virales dicha relación sería negativa.

Así, se ha descrito que entre la tasa de crecimiento y la mortalidad debido a furunculosis, existe una correlación genética de -0,30 (Gjedrem *et al.*, 1991). Por otra parte, se ha establecido una correlación genética positiva de $0,15 \pm 0,06$ entre peso corporal y resistencia a esta enfermedad en trucha de arroyo, lo que indicaría que al seleccionar peces

por tamaño corporal, se ha estado seleccionando indirectamente también por una mayor sobrevivencia a furunculosis (Perry *et al.*, 2004).

En relación a las enfermedades virales, se puede tomar como referencia la septicemia viral hemorrágica (VHS), para la cual a diferencia de lo descrito en el caso de la furunculosis, se ha encontrado que la resistencia a VHS tiene correlaciones genéticas negativas con diferentes características de interés productivo (longitud y peso corporal a diferentes edades, y eficiencia de conversión alimenticia en diferentes períodos). Los valores de estas correlaciones varían desde -0,01 hasta -0,33 (Henryon *et al.*, 2002). Por lo tanto, es posible concluir que seleccionar peces para un mayor peso corporal y mayor tasa de crecimiento, lleva a obtener resultados desfavorables en el plano de la resistencia a esta enfermedad en particular.

La distinta asociación entre características productivas con resistencia a las enfermedades bacterianas y virales se explicaría en primer lugar por el efecto pleiotrópico de determinados genes, tales como el gen de la hormona del crecimiento, debido a su efecto inmuno-modulador, especialmente de los fagocitos, principales responsables de la respuesta inmune en contra de agentes bacterianos (Pérez-Sánchez, 2000). Por otra parte, la distinta relación de la resistencia con cierto tipo de enfermedad, se explicaría también por la función del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Así, el MHC clase 1, encargado de presentar péptidos virales a las células del sistema inmune, y el MHC clase 2, encargado de presentar antígenos bacterianos, tienen localizados sus genes en diferentes cromosomas, por lo que al segregar independientemente explicaría correlaciones negativas entre resistencias a enfermedades bacterianas y virales (Van Muiswinkel *et al.*, 1999).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se puede deducir que el *fitness*, o valor adaptativo de un pez es influenciado por la selección artificial. En la salmonicultura, hasta hace poco tiempo, lo único que era relevante para el productor era aumentar el peso final de los peces. Por lo tanto, al seleccionar los peces con mayores pesos, indirectamente se estaba seleccionando todos los genes o características responsables de un mayor peso corporal, como el gen de la hormona del crecimiento.

Esta selección artificial, desarrollada por décadas, explica en parte, junto a las vacunas y tratamientos farmacológicos, medidas que son más eficaces para las enfermedades bacterianas que las virales, que a través del tiempo se hayan estabilizado las mortalidades producto de enfermedades bacterianas, reportándose un aumento en la frecuencia de las virales. Ello se debería a que al seleccionar los peces con mayores pesos, se seleccionan a su vez los que producen más hormona del crecimiento, y que al mismo tiempo están mejor protegidos en contra de enfermedades bacterianas. Dichos peces, además de tener mayor número de fagocitos, requieren a la molécula presentadora MHC 2, cuyo gen segrega independientemente al de la MHC 1. Lo importante, es que se estaría aplicando una especie de selección por los peces que expresan más la MHC 2, al seleccionar aquellos más pesados que presentan mayor resistencia a enfermedades bacterianas, con lo que se estaría desfavoreciendo los peces que expresan más al MHC 1, que es necesaria para la presentación de péptidos virales. De esta forma es como los peces con mayores pesos, que a su vez tienen más hormona del crecimiento y mayor resistencia a enfermedades bacterianas, son los que han presentado un mejor *fitness* en relación a los peces más resistentes a enfermedades virales.

2.10. Desafíos experimentales vs. brotes de campo

La mayoría de los antecedentes recolectados hasta el momento provienen de desafíos experimentales, efectuados específicamente con el fin de determinar los componentes de varianza para resistencia a distintas enfermedades. Sin embargo, es necesario estimar la utilidad práctica de la selección con datos obtenidos a partir de condiciones experimentales o dicho de otra forma, si las condiciones experimentales reflejan lo que sucede en la realidad. Frente a esta inquietud, resulta satisfactorio contar con evidencia que apoya la teoría de seleccionar para resistencia a una enfermedad utilizando datos de sobrevivencia en desafíos experimentales, dado que se han determinado correlaciones genéticas de 0,95 (Gjøen *et al.*, 1997); 0,78 y 0,83 (Wetten *et al.*, 2007), entre los resultados obtenidos del desafío experimental y del brote de campo, lo que indicaría que los desafíos experimentales pueden ser usados como buenos predictores de lo que sucederá en el campo.

Más aún, se ha probado la efectividad de la selección llevada a cabo como parte de programas de mejoramiento, demostrándose que las diferencias entre líneas seleccionadas para alta y baja resistencia a IPN son concluyentes; las líneas con baja resistencia entregaron más del doble de mortalidad en su progenie, comparado con las líneas de alta resistencia (Wetten *et al.*, 2007).

Por último, se puede concluir que los programas de mejoramiento genético en base a datos de desafíos experimentales serían más exactos que con datos obtenidos de brotes de campo, ya que los brotes de campos están más influenciados por factores ambientales (Wetten *et al.*, 2007).

2.11. Modelos estadísticos utilizados en el mejoramiento de la resistencia a enfermedades

Existen diversos estudios que utilizan diferentes mediciones como predictores de la resistencia a enfermedades. Por ejemplo, la resistencia se puede medir como una característica longitudinal en el tiempo, y así, determinar los días de sobrevivencia desde la exposición al agente infeccioso hasta la muerte del animal. Otra alternativa es tomar la sobrevivencia como un carácter binario, lo que a su vez puede ser como mediciones repetidas a diario, o una sola medición en el período total del experimento. Esta última alternativa corresponde a considerar la sobrevivencia como un carácter umbral, con dos clases (vivo o muerto) y un umbral, donde a cada medición se le asigna un valor 1 ó 0 según corresponda a cada clase, asumiéndose que el carácter posee una continuidad subyacente con un umbral que impone una discontinuidad en su expresión visible (vivo o muerto). Sin embargo, se ha concluido que de ser posible es mejor utilizar un carácter con variación continua que uno umbral. Por lo tanto, para este tema en particular sería preferible utilizar el concepto de días de sobrevivencia *vs.* el de de vivo-muerto, o resistente-susceptible (Falconer y Mackay, 1996).

En cuanto a los modelos estadísticos en sí, se ha determinado que todos son buenos predictores de lo que ocurriría en brotes de campo, obteniéndose correlaciones de 0,71 a

0,75. Además, se han calculado coeficientes entre los valores de mejoramiento predicho entre los diferentes modelos que corroboran su potencia como predictores (Ødegard *et al.*, 2006).

Como se desprende de esta revisión, existe variabilidad genética para resistencia a enfermedades virales y bacterianas. Además, se conocen las correlaciones entre esas resistencias y otros caracteres productivos, que varían en magnitud y sentido según cada caso. Al igual que para las enfermedades descritas, es importante el determinar la variabilidad genética de la resistencia a IPN en Chile, así como las correlaciones de la resistencia a esta enfermedad con otros caracteres productivos, ya que ello permitiría incluir adecuadamente la resistencia a IPN en los objetivos de selección. De esta manera, los resultados de los estudios genéticos de resistencia a esta enfermedad, dentro de los cuales se enmarca esta memoria, podría contribuir a reducir las elevadas pérdidas económicas que provoca la Pancreatitis Necrótica Infecciosa en Chile.

2.12. Genética del parecido entre parientes

El grado de parecido entre parientes proporciona el medio para estimar la magnitud de la varianza aditiva (VA), la cual al ser expresada como proporción (h_2), es el determinante principal del mejor método reproductivo que puede utilizarse en la mejora (Falconer y Mackay, 1996).

El parecido entre hermanos puede concebirse como la similitud entre los individuos de un mismo grupo de hermanos, o como la diferencia entre individuos de distintos grupos. Cuanto mayor sea la similitud dentro de grupos, mayor será la diferencia entre grupos. Por lo tanto, el grado de parecido entre parientes puede representarse por el componente entre grupos expresado como proporción de la varianza total. Este es igual al coeficiente de correlación intraclase, que está dado por:

$$t = \frac{\sigma_B^2}{\sigma_B^2 + \sigma_W^2}$$

Donde σ^2_B es la varianza entre grupos y σ^2_w es el componente dentro de grupos. El componente entre grupos expresa la cantidad de variación que es común a los miembros del mismo grupo, y puede también considerarse como la varianza entre los miembros de los grupos (Falconer y Mackay, 1996).

Al determinar la covarianza entre hermanos, es importante destacar que no sólo contribuye a ella la varianza aditiva, sino que también la varianza dominante. Los hermanos tienen ambos padres en común y, por tanto, el valor genotípico medio de un grupo de hermanos es igual al valor mejorante medio de los dos padres. Por lo tanto, la covarianza debida a la varianza aditiva es igual a $\frac{1}{2}$ VA. Esto se debe a que como son familias de propios hermanos, la varianza entre familias determina $\frac{1}{2}$ de la varianza aditiva (Falconer y Mackay, 1996).

Aún se debe calcular el aporte de la varianza dominante, para lo cual se considerará la cruce de padres portadores cada uno de un par de alelos diferentes, con lo que se producirán 4 genotipos distintos entre los hijos, por lo que cada genotipo tendrá una frecuencia de $\frac{1}{4}$. El primer hijo tendrá cualquiera de estos genotipos, entonces el segundo hermano tendrá una probabilidad de $\frac{1}{4}$ de tener el mismo genotipo. De esta forma, una cuarta parte del total de hermanos tienen el mismo genotipo, y por consiguiente la misma desviación dominante. Entonces hay que sumar $\frac{1}{4}$ de la varianza de dominancia (VD). Esta es la covarianza producto de las desviaciones dominantes que debe añadirse a la covarianza debida a los valores mejorantes, por lo tanto la covarianza genética de hermanos queda:

$$\text{Cov}_{(H)} = \frac{1}{2} \text{VA} + \frac{1}{4} \text{VD}$$

Entonces la correlación entre hermanos es:

$$t = \frac{\frac{1}{2} \text{VA} + \frac{1}{4} \text{VD}}{\text{VP}}$$

De lo anterior, se desprende que la VA corresponde al doble de la covarianza entre hermanos.

3. OBJETIVO GENERAL

- Determinar las fuentes de (co) variación genética, ambiental y fenotípica entre el peso de alevín y la resistencia a IPN.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar (co) varianza genética para la resistencia a IPN y el peso corporal.
- Determinar la respuesta correlacionada en resistencia debida a la selección directa por peso corporal de alevín.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Desafío experimental

Fue realizado en el Laboratorio de Virología, en la Universidad de Santiago de Chile (Sandino y Jashes, 2008) a inicios del año 2008, como parte del proyecto Innova_corfo (05CT6 pp-10). En este desafío experimental se incluyó un total de 4.310 alevines pertenecientes a 29 familias de propios hermanos de salmón del Atlántico, con un peso promedio de 1g. Los alevines fueron enviados desde la Piscicultura Experimental de la Universidad de Chile en Castro, X región, donde habían sido mantenidos en estanques agrupados por familia desde la eclosión.

El transporte desde la Piscicultura se llevó a cabo en bolsas plásticas oscuras con agua, oxígeno a presión, y por vía terrestre. Durante el tiempo de duración del estudio, diariamente se retiraron las mortalidades, registrando las características de interés para su posterior análisis.

Para el desafío se obtuvieron inóculos virales con títulos conocidos de 10^8 pfu/ml y 10^7 pfu/ml. Propagándose el inóculo con título de 10^8 pfu/ml para realizar las infecciones, que fueron llevadas a cabo mediante inmersión.

En un primer envío realizado el 3 de Enero, llegaron 15 familias (2.383 alevines), que se distribuyeron en las incubadoras 2 y 3, y se les dieron 10 días de aclimatación. El 14 de Enero se infectaron por inmersión con una dosis de 10^5 pfu/ml de virus de IPN. 50 días post-infección se realizó una segunda infección con 10^6 pfu/ml de virus de IPN. Finalmente se llevó a cabo una reinfección con la misma dosis de virus utilizada en la última ocasión el 10 de Marzo.

El 10 de Enero se recibió un segundo envío con 13 familias más (1.927 alevines), los cuales se distribuyeron en las incubadoras 1 y 4, dándoles también 10 días de aclimatación. El 20 de Enero se realizó la primera infección, con una dosis de 10^5 pfu/ml de virus de IPN.

Se realizó una segunda infección el 20 de Febrero, y utilizándose 10^6 pfu/ml de virus de IPN.

Los alevines se distribuyeron en 4 cámaras (vitriñas refrigeradas), con capacidad de 250 l, que a su vez contenían 8 acuarios cada una. En el caso de la cámara 1 se ocuparon sólo 5 acuarios para el desafío experimental. Los acuarios estaban preparados para mantener condiciones óptimas, que simularan las condiciones naturales de los alevines en agua dulce en la piscicultura. Diariamente se evaluó el estado de los peces y se verificó los siguientes parámetros: temperatura de trabajo (entre 10°C y 12°C), PH promedio (7,72), oxígeno promedio (7,23 mg/l), amonio promedio (7,66 mg/l).

A diario los peces eran alimentados con una cantidad de alimento equivalente al 1% de su peso corporal, realizándose con una frecuencia diaria el recambio de agua de los acuarios a través de sifonado, lo que permitió además eliminar excrementos y el alimento no consumido por los peces.

5.2. Medición de características

Para lograr los objetivos planteados, se procedió a realizar y analizar las siguientes mediciones:

Peso corporal: Se midió en gramos, y fue cuantificado el día de la muerte de los peces.

Resistencia a IPN: Se definió como el tiempo transcurrido hasta la muerte de los peces desde la fecha de infección, cuantificado en días.

Mortalidad: Se registró diariamente, agrupándose según el envío de origen para su presentación; se expresó en porcentajes.

5.3. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa ASReml (Gilmour *et al.* 2002), mediante un análisis bivariado que incluye al peso corporal y la resistencia a IPN, medida como una variable lineal (días hasta la muerte). La ecuación general del modelo lineal en forma matricial es:

$$y = Xb + Zu + e$$

Donde y es el vector de observaciones para los días de sobrevivencia y peso; b es el vector de efectos fijos; u es el vector de efectos aleatorios; e es el vector de efectos residuales aleatorios. X es la matriz de incidencia para los efectos fijos y Z la matriz de incidencia para los efectos aleatorios, definida por Henderson (1984).

Para determinar la varianza genética del peso y la resistencia, se plantean las siguientes hipótesis:

1. Ambas varianzas son distintas de cero.
2. Al menos una de las dos es igual a cero.

Bajo esta situación, se debe destacar que sólo en el primer caso existirá covarianza entre peso y resistencia, ya que si una de las características no presenta varianza genética significativa resulta imposible estimar una varianza conjunta entre ambas.

Con el fin de lograr el segundo objetivo específico, los valores genéticos de cada familia para ambas características, fueron predichos utilizando el modelo bivariado presentado anteriormente. Con esta información se determinó cómo se vería afectada la resistencia frente a IPN, al seleccionar por peso corporal los mejores individuos de cada familia, considerando distintas intensidades de selección.

5.4. Cálculo de parámetros genéticos

A continuación, se presentan como se obtuvieron los parámetros genéticos más adelante expuestos.

El cálculo de la Varianza Aditiva (VA) se logro multiplicando por dos el componente familiar de varianza de cada característica.

La Varianza Fenotípica (VP) se calculó sumando los componentes de varianza de familia, de cámara, y del error residual para cada característica.

La heredabilidad se estimó dividiendo la varianza aditiva por la varianza fenotípica para cada característica.

Se calculó la correlación genética entre las características dividiendo el componente familiar de covarianza por la raíz cuadrada de los componentes familiares de varianzas multiplicadas entre sí. Para el cálculo de la correlación fenotípica se utilizó el mismo procedimiento, pero usando las varianzas y covarianzas fenotípicas.

El cálculo de la respuesta correlacionada a la selección se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$CR_y = i \cdot h_x \cdot h_y \cdot r_A \cdot \delta P_y$$

Donde CR_y es la respuesta correlacionada para el carácter y ; i es la intensidad de selección; h_x es la heredabilidad del carácter x ; h_y es la heredabilidad del carácter y ; r_A es la correlación genética entre ambos caracteres; δP_y es la desviación estándar fenotípica del carácter y (Falconer y Mackay, 1996).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Descripción estadística de las variables

Las tablas 1 a 4 muestran los promedios de peso y días de sobrevivencia por acuario, y los promedios generales por cámara.

Tabla 1.

Promedios de peso (g) y días de sobrevivencia de los alevines de los acuarios de la cámara 1, y promedio total de cada característica para la cámara 1.

	Cámara 1	
	promedio peso	promedio días de sobrevivencia
acuario 4	0,98 A	20,94 A
acuario 5	0,86 A	22,92 A
acuario 6	1,47 C	25 BC
acuario 7	1,25 B	23,14 AB
acuario 8	0,94 A	28,31 C
Todos	1,10	24,06

Tabla 2.

Promedios de peso (g) y días de sobrevivencia de los alevines de los acuarios de la cámara 1, y promedio total de cada característica para la cámara 1.

	Cámara 2	
	promedio peso	promedio días de sobrevivencia
acuario 1	0,76 A	59,32 BC
acuario 2	0,87 AB	60,92 C
acuario 3	0,70 A	65,43 D
acuario 4	1,00 B	60,50 C
acuario 5	1,09 B	58,21 ABC
acuario 6	1,17 C	56,47 A
acuario 7	0,90 A	60,55 C
acuario 8	0,85 AB	57,50 AB
Todos	0,92	59,86

Tabla 3.

Promedios de peso (g) y días de sobrevivencia de los alevines de los acuarios de la cámara 3, y promedio total de cada característica para la cámara 3.

	Cámara 3	
	promedio peso	promedio días de sobrevivencia
acuario 1	1,18 C	19,45 B
acuario 2	0,72 A	54,35 C
acuario 3	0,82 AB	59,93 D
acuario 4	0,92 B	61,18 D
acuario 5	0,78 A	60,22 D
acuario 6	1,22 C	9,38 A
acuario 7	0,71 A	61,19 D
acuario 8	0,75 A	59,59 D
Todos	0,89	48,16

Tabla 4.

Promedios de peso (g) y días de sobrevivencia de los alevines de los acuarios de la cámara 4, y promedio total de cada característica para la cámara 4.

	Cámara 4	
	promedio peso	promedio días de sobrevivencia
acuario 1	1,23 D	7,13 A
acuario 2	1,28 DE	14,83 B
acuario 3	1,33 E	22,52 C
acuario 4	1,07 C	29,66 D
acuario 5	0,94 B	21,81C
acuario 6	0,78 A	27,68 D
acuario 7	0,80 A	24,26 C
acuario 8	1,03 BC	31,56 D
Todos	1,06	22,43

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Coincidentemente las cámaras que presentaron menores pesos, fueron las que llegaron en el primer envío (cámaras 2 y 3). Esto reflejaría solamente un menor peso inicial de los alevines del primer envío, debido que eran un poco más jóvenes que los del segundo al momento del desafío experimental.

En cuanto a los días de sobrevivencia, los peces del segundo envío tuvieron los menores promedios. Esto se debió a que los peces del segundo envío llegaron en malas condiciones (estresados y con el agua turbia) debido al retraso en su llegada. Además, los peces del primer envío fueron infectados en primera instancia con una dosis insuficiente para causar los brotes de mortalidades esperados. Así, fue necesario realizar una doble infección, por lo que transcurrió más tiempo hasta que se presentaron brotes de mortalidad.

Al segundo día post-infección se registró una gran mortalidad en el acuario 6 de la cámara 3, la que se determinó que venía infectada con el virus antes de la exposición. La gran mayoría de los peces de este acuario murió al momento de alimentarlos. Estas altas

mortalidades al inicio del experimento, se ven reflejadas en la tabla 3, donde la media observada de días de sobrevivencia del acuario 6, fue significativamente menor al resto de los acuarios de la cámara. El acuario 1 presentó la segunda media más baja de la cámara, y también se demostró que venía infectado con anterioridad.

En la tabla 2 se observa que la media de los días de sobrevivencia del acuario 6 de la cámara 2 fue menor al resto de los acuarios de la cámara, a excepción de los acuarios 5 y 8; esto es porque empezó con sintomatología poco antes de la reinfección a los 50 días. Si no se hubiese realizado esa reinfección, hubiese sido aún mayor la diferencia con los otros acuarios de la cámara.

Salvo los acuarios 1 y 6 de la cámara 3 que presentaron mortalidades tempranas por haber estado infectados con anterioridad, y el acuario 6 de la cámara 2 que mostró mortalidades antes de la reinfección, los acuarios del primer envío tuvieron un promedio de aproximadamente 60 días. Hecho que concordó con un par de días luego de la segunda infección que se realizó el 10 de Marzo, lo que se puede apreciar en la fig. 1.

En la tabla 4 se observa que el acuario 1 de la cámara 4, seguido por el 2, presentó la menor media de la cámara. Este hecho se explica porque estos acuarios empezaron a registrar grandes mortalidades entre el 3° y 4° día. El resto de los acuarios comenzaron a mostrar mortalidades importantes desde el 15° a 20° día (fig.2), por lo que de los promedios observados en la tabla 4, ninguno es menor a 20 días (acuarios 3 a 8).

En los acuarios de la cámara 1, las mortalidades recién se empiezan a observar el día 23 post-infección, razón que explica lo observado en la tabla 1, donde a excepción del acuario 4, ninguno presentó promedios de días de sobrevivencia inferiores a 22. Además, el promedio de esta cámara es estadísticamente mayor (alrededor de 24, respecto al de la cámara 4 (alrededor de 22, correspondientes ambos al mismo envío).

En general, un análisis descriptivo de los resultados de las tablas 1 a 4, indicaría una relación inversa entre los promedios de peso y los días de sobrevivencia.

Las tablas 5 a 8 muestran las varianzas del peso y de los días de sobrevivencia por acuario, y las varianzas generales por cámara.

Tabla 5.

Varianzas de peso (g) y días de sobrevivencia de los alevines de los acuarios de la cámara 1, y varianza total de cada característica para la cámara 1.

	Cámara 1	
	varianza peso	varianza días de sobrevivencia
acuario 4	0,06	38,18
acuario 5	0,09	50,71
acuario 6	0,06	36,00
acuario 7	0,11	41,33
acuario 8	0,08	45,31
Todos	0,11	52,40

Tabla 6.

Varianzas de peso (g) y días de sobrevivencia de los alevines de los acuarios de la cámara 2, y varianza total de cada característica para la cámara 2.

	Cámara 2	
	varianza peso	varianza días de sobrevivencia
acuario 1	0,01	91,76
acuario 2	0,02	13,49
acuario 3	0,01	51,71
acuario 4	0,02	40,04
acuario 5	0,05	57,83
acuario 6	0,02	79,70
acuario 7	0,02	14,17
acuario 8	0,01	59,49
Todos	0,03	42,55

Tabla 7.

Varianzas de peso (g) y días de sobrevivencia de los alevines de los acuarios de la cámara 3, y varianza total de cada característica para la cámara 3.

	Cámara 3	
	varianza peso	varianza días de sobrevivencia
acuario 1	0,12	219,51
acuario 2	0,02	165,94
acuario 3	0,02	31,75
acuario 4	0,03	10,32
acuario 5	0,02	48,79
acuario 6	0,14	178,68
acuario 7	0,01	14,09
acuario 8	0,03	72,23
Todos	0,08	490,30

Tabla 8.

Varianzas de peso (g) y días de sobrevivencia de los alevines de los acuarios de la cámara 4, y varianza total de cada característica para la cámara 4.

	Cámara 4	
	varianza peso	varianza días de sobrevivencia
acuario 1	0,13	36,21
acuario 2	0,06	85,37
acuario 3	0,12	78,99
acuario 4	0,04	56,04
acuario 5	0,02	84,04
acuario 6	0,04	115,65
acuario 7	0,03	111,59
acuario 8	0,04	51,59
Todos	0,09	129,94

En general, los resultados presentados en las tablas 5 a 8 demuestran una alta variabilidad en los días de sobrevivencia en los acuarios, tanto dentro como entre cámaras. Sin embargo, sólo mediante el análisis realizado más adelante con el programa ASreml, podrá establecerse cuáles componentes de varianza son estadísticamente significativos.

La elevada variabilidad observada en la resistencia, se debería a que algunos acuarios presentaron mortalidades más espaciadas y no como brote. Otros, presentaron brotes a diferente tiempo del resto. También, en algunos acuarios ocurrió más de un brote. Esto, en conjunto o por separado, provocaría un aumento en la varianza de esta característica.

En las figs. 1 y 2 se grafican los porcentajes de mortalidades diarias para las cámaras del primer (2 y 3) y segundo envío (1 y 4), respectivamente.

Fig. 1.

Porcentajes de mortalidades por día de las cámaras 2 y 3.

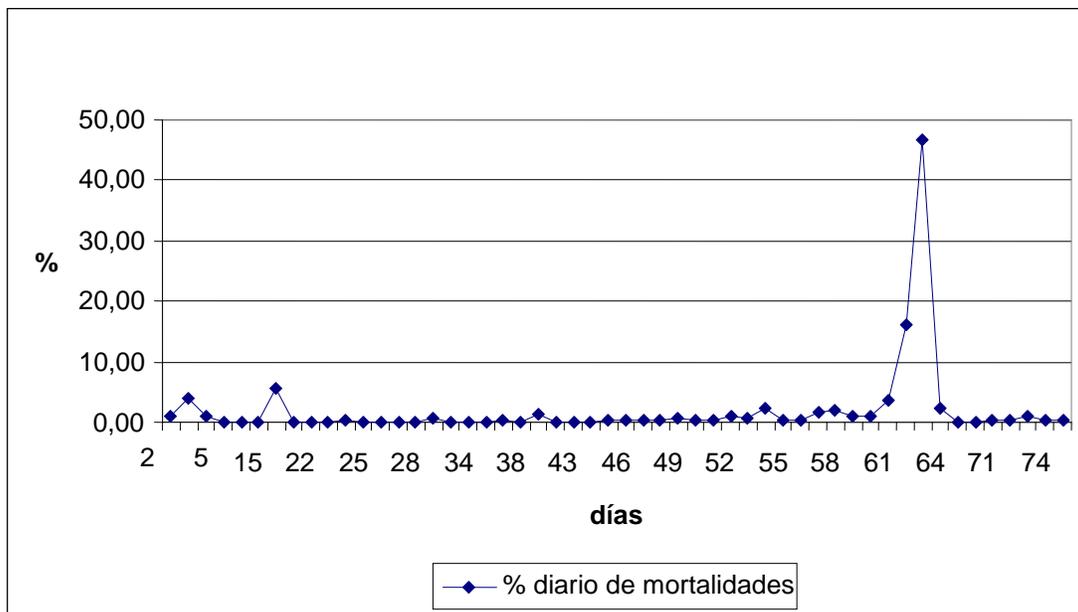
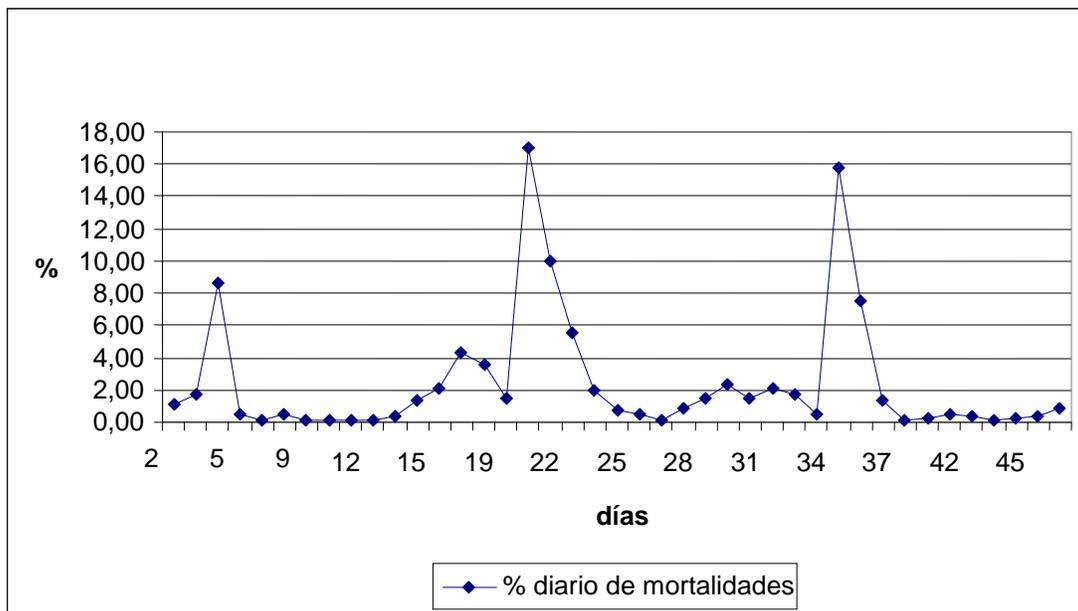


Fig. 2.

Porcentajes de mortalidades por día de las cámaras 1 y 4.



Como se analizó al describir la tabla 3, salvo los acuarios 6 y 1 de la cámara 3 que venían infectados y presentaron mortalidades tempranas, ningún acuario mostró los brotes de la enfermedad esperados. Esto explica la necesidad de realizar una tercera infección experimental. Como consecuencia, son los bajos porcentajes de mortalidades observados en la fig. 1 hasta aproximadamente el día 60; 5 a 6 días después de esta última infección se registraron brotes en las cámaras 2 y 3.

En la fig. 2 se observan 3 puntos de aumento en las mortalidades. El primero refleja a las mortalidades tempranas que presentaron los acuarios 1 y 2 de la cámara 4. El último peak se debe a mortalidades tardías del acuario 8 de la cámara 4. El brote que se encuentra al centro, corresponde a las mortalidades del resto de los acuarios que se presentaron en forma conjunta, en las cámaras 1 y 4.

6.2. Análisis genético.

6.2.1. Estimación de componentes de varianza explicado como parte del modelo.

Para determinar los componentes de varianza tanto para peso corporal como para los días de sobrevivencia, se utilizó un modelo bivariado. Las familias se mantuvieron en acuarios separados dentro de cada cámara y no hubo réplicas de los acuarios. Este hecho es de gran relevancia y será discutido más adelante.

De esta forma, se encontró que las diferencias observadas entre cámaras no eran significativas, tanto para peso como días de sobrevivencia. Por el contrario, las diferencias observadas entre familias sí lo fueron, y son las que explican en mayor parte la varianza total de ambas características.

6.2.2. Estimación de parámetros genéticos: heredabilidades y correlaciones.

En este estudio se definió resistencia como los días de sobrevivencia post-infección para los cálculos de heredabilidad (h^2), por lo que hasta ahora se han considerado como los peces

más resistentes aquellos que más han tardado en morir. Sin embargo, los peces que no murieron durante el período de experimentación no fueron considerados para el análisis. Estos peces, tienen dos opciones: la primera es que nunca desarrollaron la infección, y la segunda es que sí enfermaron y murieron después de acabado el estudio. En ambos casos, serían más tolerantes a la enfermedad. A los peces muertos durante el experimento se les realizó una necropsia para su observación y análisis, corroborándose que su muerte fue efectivamente por IPN. Sin embargo, no se determinó si el resto de los peces tenían la infección, dado que como lo señala Gjølven *et al.* (1997) habría sido poco práctico y costoso.

La covarianza genética calculada alcanza un valor de -1,60, las correlaciones fenotípica y genéticas entre ambas variables, con sus errores estándar, fueron $-0,60 \pm 0,11$ y $-0,68 \pm 0,11$; respectivamente. Estos resultados concordarían con lo obtenido por Henryon *et al.* (2002), quienes encontraron correlaciones negativas entre peso corporal y resistencia a otra enfermedad viral (VHS), cuyos valores fluctuaron entre -0,14 y -0,33.

Tabla 9

Varianzas aditivas (VA) y fenotípicas (VP), y heredabilidades (h^2) para peso y resistencia a IPN con sus respectivos errores estándar.

	VA	VP	h^2
Resistencia	$297,71 \pm 84,71$	$531,44 \pm 282,8$	$0,56 \pm 0,32$
Peso	$0,07 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,19$

Los valores que se aprecian en la tabla 9 son concordantes con estudios previos, donde ya se había podido determinar varianza genética significativa para peso en salmónidos (Henryon *et al.*, 2002; Perry *et al.*, 2004); y también para resistencia a otras enfermedades virales como el ISA (Ødegard *et al.*, 2007), y el VHS (Henryon *et al.*, 2002). Además de la varianza genética encontrada para resistencia a IPN (Wetten *et al.*, 2007; Guy *et al.*, 2009).

Sin embargo, es necesario discutir algunos aspectos de gran importancia respecto a los parámetros genéticos estimados, relacionados con el desafío experimental utilizado en este

estudio. En primer lugar, el diseño implementado implica que es imposible distinguir la varianza familiar de la varianza de acuario. Por lo tanto, para los cálculos de heredabilidad habría una sobreestimación de la misma. Además, como las estimaciones se hicieron sobre familias de propios hermanos, la covarianza genética no está determinada sólo por la VA, como ya se mencionó, sino que también por un componente de la VD. Entonces, al duplicar el valor de la covarianza, no sólo se calcula la varianza aditiva, sino que además está incluida $\frac{1}{2}$ de la VD. Como la estimación de la h^2 incluye en el numerador a la VA, también se verá sobreestimada por este concepto. Estos antecedentes dan cuenta del por qué se ha obtenido una heredabilidad de 0,56 para resistencia a IPN; en comparación a las heredabilidades estimadas por Wetten *et al.* (2007) que varían entre 0,17 a 0,45, y las estimadas por Guy *et al.* (2009) para mortalidad por IPN que fluctúan entre 0,07 y 0,56. Así, sucede lo mismo con las heredabilidades para peso; Henryon *et al.* (2002) obtuvieron un valor de 0,35 para la heredabilidad de peso corporal a los 215 días, y Perry *et al.* (2004) obtuvieron una heredabilidad de 0,57; esto, en comparación a la heredabilidad de 0,66 obtenida en este estudio.

Por otra parte, el error estándar de la heredabilidad para resistencia a IPN que se muestra en la tabla 9, indicaría que la heredabilidad no es estadísticamente distinta de cero. Debido a que este experimento se basó en un desafío frente a una enfermedad y los cálculos se hicieron considerando los días de sobrevivencia, determinados por las mortalidades causadas por el desafío, la alta variabilidad del número de individuos muertos por familia produciría un aumento del error estándar de las estimaciones. Esto explica porque la heredabilidad para resistencia a IPN tiene un error estándar tan alto, no así la heredabilidad para peso; sin embargo, la Varianza Aditiva para resistencia a IPN es significativa, lo que significa que hay varianza genética para el carácter dentro de la población.

Para evitar las consecuencias asociadas al primer problema, hubiese sido necesario implementar un diseño con réplicas por familia, pero dificultaría el experimento desde el punto de vista práctico y económico. Otra alternativa hubiese sido utilizar familias de medios hermanos, en vez de hermanos completos, ya que de esta forma es posible separar la varianza debida al acuario de los efectos genéticos aditivos. Por otra parte, existe la

alternativa del marcaje físico de los peces mediante PIT tags (de su sigla en inglés Passive Integrated Transponder); de esta forma, los peces se pueden mantener juntos sin crear un efecto de ambiente común por cámara, para luego identificar la familia a la que pertenecen al momento de muerte (Martínez, 2007). Por último, está la opción de utilizar marcadores moleculares para establecer el origen familiar de un pez, cuya exactitud depende en gran medida del número de loci, y de alelos por loci disponibles para reconstruir el pedigree (Villanueva *et al.*, 2002a).

Si bien es cierto, estas alternativas son útiles para eliminar la sobreestimación de la heredabilidad por el efecto de ambiente común de cámara, al mantener como base el desafío experimental, se siguen obteniendo un número de mortalidades diferente por familia, por lo que continuará existiendo un alto error en la estimación de la heredabilidad. Más adelante, se comentará una metodología que no trabaja en base a desafíos experimentales para seleccionar individuos.

Un punto clave a tener en cuenta en un estudio de este tipo, es no dar ventajas o desventajas a ninguna familia, de tal manera de que las variaciones observadas en la resistencia y el peso de los peces sean atribuibles exclusivamente a un origen genético.

Sin embargo, de acuerdo al diseño utilizado en el desafío experimental de los peces, se introdujeron variables no deseadas al experimento, tales como, infección de algunos peces con el virus, previo al desafío experimental; desafío experimental distinto entre los peces del primer y segundo envío; y distintas edades y condición física de los peces. Además de no controlarse la posible existencia de anticuerpos contra el virus en algunos peces, que también pueden haber introducido variaciones en las observaciones realizadas.

Por lo tanto, en una futura determinación de parámetros genéticos, es importante tener en consideración lo anterior, controlando que el estado físico, sanidad e inmunidad de los peces de las distintas familias sea igual entre ellos y que el desafío experimental sea bajo las mismas condiciones.

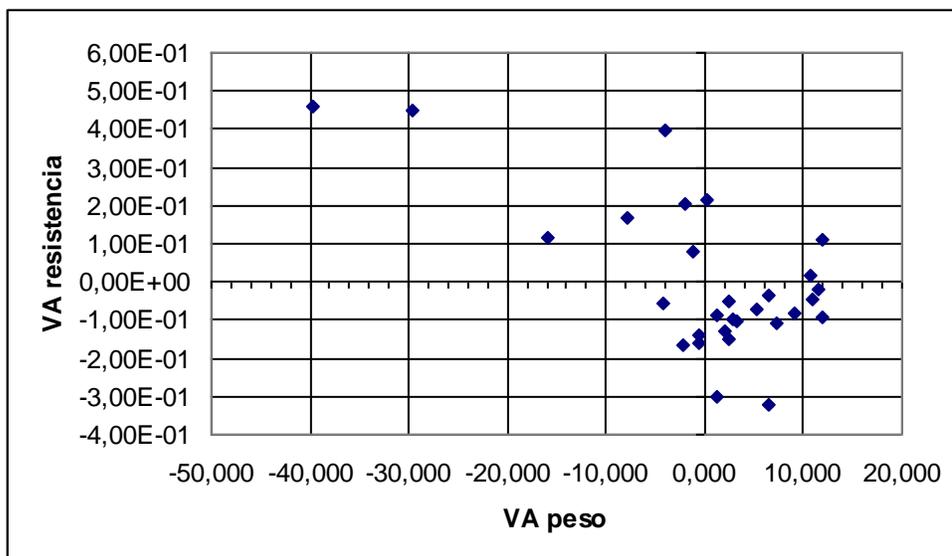
6.2.3. Estimación de respuesta a la selección

El valor aditivo es una propiedad del individuo así como de la población, y se mide como desviación de la media poblacional. Al conformar estos peces la población base (no hay generaciones previas), la suma de sus valores aditivos es igual a cero.

Mediante los valores aditivos estimados en este estudio se puede hacer un ranking de las mejores familias, tanto para peso corporal como para resistencia a IPN. De esta forma, pudo identificarse que las familias a seleccionar para obtener descendencia con pesos corporales más altos fueron (cámara, acuario) 3,4; 3,1 y 3,2. En cambio, las familias a seleccionar para obtener mayor resistencia a IPN fueron 3,3; 3,6 y 1,6.

Fig. 10.

Valores aditivos para peso y resistencia a IPN de cada familia



En la fig. 3 es posible observar la relación que existe entre ambas características, y se evidencia que las familias con mayores valores aditivos para peso, son las que en general tienen menores valores aditivos para resistencia a IPN. Lo anterior es consistente con la correlación genética de -0,68 obtenida entre ambas variables.

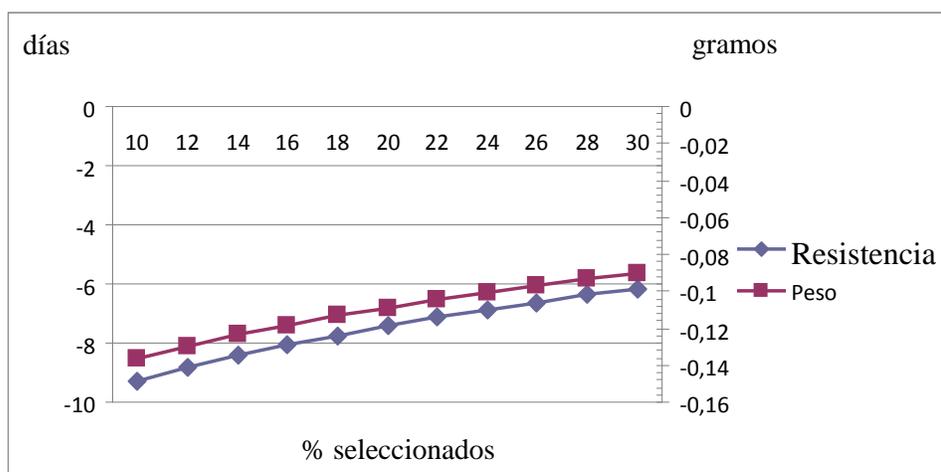
6.2.4. Respuestas correlacionadas

Habiendo calculado de antemano las heredabilidades de los caracteres en cuestión, las varianzas fenotípicas y la correlación entre ambos, es posible calcular la respuesta correlacionada a la selección. Esto significa que se puede predecir el efecto que tendrá sobre un carácter “y”, el seleccionar un determinado porcentaje de animales según sus valores adaptativos por un carácter correlacionado “x”.

La fig. 4 muestra en el eje primario la respuesta correlacionada para resistencia a IPN, y en el secundario la respuesta correlacionada para peso. En la parte superior se indican distintos porcentajes de selección, que determinarán el índice de selección para los cálculos. Cada línea grafica la selección correlacionada de un carácter a distintos porcentajes de selección.

Fig. 4.

Respuestas correlacionadas entre peso y resistencia a IPN a diferentes porcentajes de selección.



En la fig. 4 se puede ver la tendencia de la curva, como es de esperar, de ambas respuestas correlacionadas moviéndose a la par. Las curvas indican que a medida que se selecciona un porcentaje mayor de la población por un carácter, el otro se ve menos afectado. Por el contrario, mientras se hace más intensiva la selección por uno de los caracteres, el otro

disminuirá en mayor cantidad su promedio. Este hecho se debe, en primer lugar, a que ambos caracteres presentan variabilidad genética, y en segundo, a la alta correlación genética negativa entre ambos caracteres.

Por ejemplo, si se decide seleccionar el 20% de las familias de este estudio que presentaron los mejores valores aditivos para peso, su descendencia en promedio vivirá 7,4 días menos que sus progenitores. En el caso opuesto, al seleccionar el 20% de las familias con los mejores valores adaptativos para días de sobrevivencia, su descendencia pesaría en promedio 0,108 gr. menos que sus progenitores.

6.2.5. Efecto de la selección natural

Donde mas rápido actúa la selección natural es en un brote de campo de alguna enfermedad. Como se ha mencionado anteriormente, las mortalidades por IPN en alevines pueden alcanzar hasta un 70 % de la población. Basado en este supuesto, es posible afirmar que morirían el 70 % de los peces más susceptibles a IPN; desde otra perspectiva, quedaría vivo el 30 % de los peces más resistentes. Con estos antecedentes se puede estimar la respuesta correlacionada utilizando la correlación genética de -0.68 estimada en este estudio.

Si se reemplaza los valores en la ecuación, entonces queda:

$$CRy = 1,159 * 0,56 * 0,66 * -0,68 * 0,31210207$$

$$\text{Entonces } CRy = -0,09$$

Dicho resultado quiere decir que producto de un brote de campo, donde hubo un 70 % de mortalidad a causa de IPN, el promedio de peso de los peces disminuirá en 0,09 gramos. Este resultado también es apreciable en la figura 4.

6.2.6. Selección directa por resistencia.

Es importante destacar que si bien los resultados obtenidos indican el efecto negativo de la selección por tamaño corporal sobre la resistencia a IPN, el diseño experimental planteado no sería aplicable completamente a programas de mejoramiento genético comerciales. Lo anterior se debe a que en este estudio se han determinado los valores aditivos por familia, los que se deben rankear para su posterior selección. Entonces, lo que se seleccionaría son familias completas de peces. El inconveniente radica en que al seleccionar familias completas, la consanguinidad se elevaría en forma exponencial, y no más allá de un par de generaciones empezaría a generar problemas. La consanguinidad es el resultado del apareamiento entre individuos que están emparentados entre sí por descendencia. Mientras más intensa sea la selección, la consanguinidad se elevará más rápido, ya que se partiría con una población base mucho más pequeña, y que además ya está emparentada (Falconer y Mackay, 1996).

Al aumentar la consanguinidad, hay un incremento del número de homocigotos por descendencia en la población, y una consiguiente disminución de los heterocigotos. Este fenómeno produciría una mayor expresión fenotípica de genes deletéreos recesivos en la población. Los caracteres que más se ven afectados por la consanguinidad son los relacionados con la eficacia del individuo, en otras palabras, están relacionados con la fertilidad o sobrevivencia. Por lo tanto, la consanguinidad podría afectar directamente la medición de uno de los caracteres de interés al disminuir la sobrevivencia de los peces. Más aún, no se ha descrito el efecto directo que podría tener la consanguinidad sobre la resistencia a la enfermedad en sí.

Lo más apropiado sería seleccionar individuos, no familias. Aún así, se debe tener presente que los individuos a seleccionar no pueden formar parte de los desafíos. En primer lugar, porque muchos de ellos mueren durante el desafío, y en segundo lugar, porque los que permanecen vivos tienen un alto riesgo de ingresar la enfermedad al sistema productivo. Entonces, dadas las condiciones expuestas, los valores genéticos de los candidatos deben

ser predichos por medio de datos obtenidos de sus parientes, y así, mediante un modelo animal poder rankear los peces a seleccionar (Sonesson, 2007).

La selección por truncación de individuos con los mayores VA determinados por el “mejor predictor lineal insesgado” (BLUP) es un método eficiente desde el punto de vista de la ganancia genética. Sin embargo, este método no tiene en consideración la consanguinidad. Se han desarrollado herramientas dinámicas para maximizar el progreso genético, limitando la tasa de consanguinidad. Estas herramientas optimizan el número de padres y sus contribuciones a la siguiente generación, para maximizar la ganancia genética a una tasa fija de consanguinidad. Estudios de simulación muestran avances en la ganancia genética mayores a un 20% sobre selección por truncación utilizando solamente BLUP (Villanueva *et al.*, 2002b).

El seleccionar individuos por datos de parientes no resulta tan eficiente como el hacerlo por datos del mismo individuo. Aquí se abre un nuevo campo para la genética molecular, que mediante la selección asistida por marcadores (MAS) o genes (GAS), en combinación con el BLUP, constituiría el método mas eficiente de selección (Villanueva *et al.*, 2002b). Sin embargo, para la utilización de GAS o MAS en programas de mejoramiento de rutina, aún es necesario determinar un mayor número de marcadores genéticos que permitan la generación de mapas de ligamiento de alta resolución, y así identificar un mayor número de loci de efecto cuantitativo (QTL), que influyeran una característica cuantitativa compleja como lo es la resistencia a una enfermedad (Martínez, 2007).

7. CONCLUSIONES

La varianza genética significativa, tanto para peso de alevín como para resistencia a IPN en la población estudiada, permitiría observar cambios genéticos producto de la selección natural y artificial.

La heredabilidad estimada para ambos caracteres presentaría un sesgo producto de la imposibilidad de realizar los desafíos experimentales en forma comunal para todas las familias.

Aunque significativa la heredabilidad para resistencia a IPN, presentó un gran error de estimación producto de la desigual distribución de las observaciones familiares debido al desafío con IPN.

La correlación genética negativa obtenida entre peso corporal y resistencia a IPN; indicaría que al seleccionar alevines por un mayor peso corporal, se obtendría una descendencia menos resistente a IPN.

8. BIBLIOGRAFÍA

- **ARGUE, B. J.; ARCE, S. M.; LOTZ, J. M.; MOSS, S. M.** 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture*. 204 (3): 447-460.

- **ARIEL, E.; OLESEN, N. J.** 2002. Finfish in aquaculture and their diseases – a retrospective view in the European Community. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 22: 72-85.

- **AQUA.CL.** 2009. Gutiérrez habla de Multiexport y detalla plan para salir de la crisis. [en línea]. <<http://www.aqua.cl/noticias/index.php?doc=29567>>. [consulta : 30-03- 2009].

- **BEACHAM, T. D.; EVELYN, T. P. T.** 1992. Population and genetic variation in resistance of Chinook salmon to Vibriosis, Furunculosis, and Bacterial Kidney Disease. *J. Aquat. Anim. Health.* 4 (3): 153-167.

- **BISSET S. A.; MORRIS C. A.** 1996. Feasibility and implications of breeding sheep for resilience to nematode Challenge. *Int. J. Parasitol.* 26: 857-868.

- **CHRISTIE K. E.** 1997. Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis. *Dev. Biol. Stand.* 90: 191-200.

- **FALCONER, D. S.; MACKAY T. F. C.** 1996. Introducción a la genética cuantitativa. 4ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España. p. 469.

- **FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS).** 2008. Perfil de pesca y acuicultura por país, Chile. [en línea]. <http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_CL/es>. [consulta : 20-05- 2008]

- **FJALESTAD, K.; MOEN, T; GOMEZ-ARAYA, L.** 2003. Prospects for genetic technology in salmon breeding programmes. *Aquac. Res.* 34: 397-406.

- **GILMOUR, A.R., GOGEL, B.J., CULLIS, B.R., AND THOMPSON, R.** 2006. ASReml User Guide Release 2.0. VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK.

- **GITTERLE, T.; SALTE, R.; GJERDE, B.; COCK, J.; JOHANSEN, H.; SALAZAR, M.; LOZANO, C.; RYE, M.** 2005. Genetic (co) variation in resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. *Aquaculture*. 264 (4): 139-149.

- **GJEDREM, T.; SALTE, R.; GJØEN, H. M.** 1991. Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture*. 97: 1-6.

- **GJEDREM, T.; GJØEN, H. M.** 1995. Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to furunculosis, BKD, and cold water disease. *Aquac. Res.* 26: 129-134.

- **GJEDREM, T.** 1997. Selective breeding to improve aquaculture production. *World Aquaculture*. 28: 33-45.

- **GJEDREM, T.** 1998. Selective breeding in aquaculture. *Aquaculture*. 3: 44-48.

- **GJØEN, H. M.; REFSTIE, T.; ULLA, O.; GJERDE, B.** 1997. Genetic correlations between survival of Atlantic salmon in challenge and field tests. *Aquaculture*. 158: 277-288.

- **GROSS, W. B.; SIEGEL, P. B.; PIERSON, F. W.** 2002. Effects of Genetic Selection for High or Low Antibody Response on Resistance to a Variety of Disease Challenges and the Relationship of Resource Allocation. *Avian Dis.* 46 (4): 1007–1010.

- **GUY, D. R.; BISHOP, S. C.; WOOLLIAMS, J. A.; BROTHERSTONE, S.** 2009. Genetic parameters for resistance to Infectious Pancreatic Necrosis in pedigreed Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts using a reduced animal model. *Aquaculture*. 290: 229-235.

- **HENDERSON, C. R.** 1984. Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph. Ontario, Canada. p. 462.

- **HENRYON, M.; JOKUMSEN, A.; BERG, P.; LUND, I.; PEDERSEN, P. B.; OLESEN, N. J.; SLIERENDRECHT W. J.** 2002. Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture*. 209: 59-76.

- **KIBENGE, F. S. B.; GÁRATE, O. N.; JOHNSON, G.; ARRIAGADA, R.; KIBENGE, M.; WADOWSKA, D.** 2001. Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Dis. Aquat. Org.* 45: 9-18.

- **KIBENGE, F. S. B.; MUNIR, K.; KIBENGE, M. J. T.; JOSEPH, T.; MONEKE, E.** 2004. Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. *Anim. Health. Res. Rev.* 5: 65-78.

- **KIBENGE, F. S. B.; GODOY, M. G.; WANG, Y.; KIBENGE, M. J. T.; GHERARDELLI, V.; MANSILLA, S.; LISPERGER, A.; JARPA, M.; LARROQUETE, G.; AVENDAÑO, F.; LARA, M.; GALLARDO, A.** 2009. Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolated from the ISA disease outbreaks in Chile diverged from ISAV isolates from Norway around 1996 and was disseminated around 2005, based on surface glycoprotein gene sequences. *Virolog. J.* 6: 88-94.

- **MARTÍNEZ, V.** 2007. Marker-assisted selection in fish and shellfish breeding schemes. **In:** Guimarães, E. P.; Ruane, J.; Scherf, B.; Sonnino, A.; Dargie, J. D. (Eds.). *Marker-assisted selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish.* Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma, Italia. p. 329-362.

- **McALLISTER, P. E.; OWENS, W. J.** 1992. Recovery of IPN virus from the faeces of wild piscivorous birds. *Aquaculture.* 106: 222-232.

- **NATH, M.; WOOLLIAMS J. A.; BISHOP, S. C.** 2004. Identifying critical parameters in the dynamics and control of microparasite infection using a stochastic epidemiological model. *J. Anim. Sci.* 82: 384-396.

- **ØDEGARD, J.; OLESEN, I.; GJERDE, B.; KLEMETSDAL, G.** 2006. Evaluation of statistical models for genetic analysis of challenge test data on furunculosis resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Prediction of field survival. *Aquaculture.* 259: 116-123.

- **ØDEGARD, J.; OLESEN, I.; GJERDE, B.; KLEMETSDAL, G.** 2007. Positive genetic correlation between resistance to bacterial (furunculosis) and viral (infectious salmon anemia) diseases in farmed Atlantic salmon. *Aquaculture.* 271: 173-177.

- **OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH).** 2000. *Diagnostic manual for Aquatic Diseases.* World Organization for animal health. Paris, Francia. p. 237.

- **OKAMOTO, N.; TAYAMA, T.; KAWANOBE, M.; FUJIKI, N.; YASUDA, Y.; SANO, T.** 1993. Resistance of a rainbow trout strain to infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture*. 117 (1-2): 71-76.

- **PÉREZ-SÁNCHEZ, J.** 2000. The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immune function in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a short review. *Fish Physiol. Biochem.* 22: 135-144.

- **PERRY, G. M. L.; TARTE, P; CROISETIÈRE, S.; BELHUMEUR, P.; BERNATCHEZ, L.** 2004. Genetic variance and covariance for 0+ brook charr (*Salvelinus fontinalis*) weight and survival time of furunculosis (*Aeromonas salmonicida*) exposure. *Aquaculture*. 235: 263-271.

- **ROBERTS, R. J.; PEARSON, M. D.** 2005. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 28: 383-390.

- **RIMSTAD, E.; MJAALAND, S.** 2002. Infectious salmon anaemia virus. An orthomyxovirus causing an emerging infection in Atlantic salmon. *APMIS*. 110: 273-282.

- **SANDINO, A.; JASHES, M.** 2008. Tercer informe de avance del proyecto “Utilización de genómica funcional para el mejoramiento de la resistencia genética a la enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) y Piscirickettsiosis en salmónidos”. Corfo_ Innova (05CT6 pp-10). p. 250.

- **SAIF, Y. M.; NESTOR, K. E.** 2001. Increased Mortality in Turkeys Selected for Increased Body Weight Following Vaccination with a Live Newcastle Disease Virus Vaccine. *Avian Dis.* 46 (2): 505-508.

- **SERNAPESCA (SERVICIO NACIONAL DE PESCA).** 2007. Anemia Infecciosa del Salmón (ISA). [en línea]. <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&task=view&id=588&Itemid=695>. [Consulta : 30-03- 2009].

- **SONESSON, A. K.** 2007. Possibilities for marker-assisted selection in aquaculture breeding schemes. **In:** Guimarães, E. P.; Ruane, J.; Scherf, B.; Sonnino, A.; Dargie, J. D. (Eds.). Marker-assisted selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO). Roma, Italia. p. 309-328.

- **VAN MUISWINKEL, W. B.; WIEGERTJES, G. F.; STET, R. J. M.** 1999. The influence of environmental and genetic factors on the disease resistance of fish. *Aquaculture*. 172: 103-110.

- **VILLANUEVA, B.; VERSPOOR, E.; VISSCHER, P.M.** 2002a. Parental assignment in fish using microsatellite genetic markers with finite numbers of parents and offspring. *Anim. Genet.* 33: 33–41.

- **VILLANUEVA, B., PONG-WONG, R.; WOOLLIAMS, J.A.** 2002b. Marker assisted selection with optimised contributions of the candidates to selection. *Genet. Sel. Evol.* 34: 679–703.

- **WETTEN, M.; AASMUNDSTAD, T.; KJØGLUM, S.; STORSET, A.** 2007. Genetic analysis of resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 272: 111-117.