



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO y POSTÍTULO

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES SNP (POLIMORFISMO
DE NUCLEÓTIDO ÚNICO) ASOCIADOS A LA RESISTENCIA
FRENTE AL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA
INFECCIOSA (IPN) EN TRUCHAS ARCOÍRIS (*Oncorhynchus
mykiss*)**

Francisco Halley Rodríguez Huanca

Proyecto de tesis para optar al
Título de Magíster en Ciencias
Animales y Veterinarias.
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

PROFESOR GUIA:

Dr. José Manuel Yáñez López

FINANCIAMIENTO: CORFO – INNOVA (12PIE – 17669)

SANTIAGO, CHILE

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS ESCUELA DE POSGRADO y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACION DE TESIS DE MAGISTER

SE INFORMA A LA DIRECCION DE POSTGRADO Y POSTITULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS QUE LA TESIS DE MAGISTER PRESENTADA POR EL CANDIDATO

FRANCISCO HALLEY RODRÍGUEZ HUANCA

HA SIDO APROVADA POR LA COMISION EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DIA 12 DE MARZO DE 2017

DIECTOR DE TESIS

Dr. José Manuel Yáñez López

COMISION EVALUADRORA E INFORMANTE DE TESIS

Dr. Pedro Smith Schuster

Dr. Cristian Araneda

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo el amor y admiración para mi esposa Sonia y mi hijo Joaquín, por ser ese pilar irremplazable e importante, la razón de esta continúa búsqueda, por el acompañamiento, los ánimos y el compartir diario durante la duración de mis estudios.

Halley Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Al estado Peruano por el financiamiento de mis estudios con la Beca Presidente de la República canalizada por PRONABEC. A la Universidad de Chile por ser esa alma formadora de conocimientos, en especial a la Facultad de veterinaria.

A la Corporación de Fomento de la Producción (CORFO) por el financiamiento del proyecto de investigación, la empresa Aguas Claras S.A., AquaChile S.A., AQUAINNOVO S.A.

Es difícil reunir en estos párrafos a todas las personas que durante el tiempo que duro este proyecto fueron parte muy importante y necesaria en el desarrollo del mismo, espero estas palabras sirvan como reconocimiento por su ayuda y así mostrar mi especial consideración hacia ellos.

Me gustaría expresar mis más sinceros agradecimientos al director de esta tesis, Dr. José Manuel Yáñez López; primero por aceptar ser mi tutor aun sin conocerme, por la confianza que desde el principio depositó en mí, por el estímulo, consejo, seguimiento y compromiso con el trabajo que concluyó de forma satisfactoria, ha sido mucho tiempo de formación, aprendizaje y amistad, de los cuales sin duda puedo afirmar que más allá de ser un excelente guía y docente, es aún mejor persona.

De manera muy especial agradezco a los miembros de la comisión de evaluación al Dr. Cristian Araneda Tolosa y Dr. Pedro Alejandro Smith Schuster por ser parte importante para la correcta ejecución de este trabajo.

A Ana Martine Jedlicki Corbeaux por su apoyo, confianza y sobre todo su consejo, pues ella es quien supo lo duro que fue esto, por mostrarme lo cálido que puede uno sentirse como forastero. El compromiso y perseverancia y sobre todo por ser tan maravillosa persona.

A mis compañeros de laboratorio investigación de la Unidad de genética y genómica acuícola del departamento de medicina preventiva, por la compañía, los buenos ratos, y la grandiosa amistad que cultivamos, Pablo, Agustín, Liane, Khatarina, Catalina, Carolina, María Eugenia, María Ignacia, Raúl, Giovanna, Dicran, Marcelo, Isadora y Grazyella.

A los integrantes del Coro de la Parroquia Nuestra Señora de Andacollo, por la amistad, acompañamiento y calidez durante la permanencia de mi familia en Santiago de Chile.

Finalmente las personas más importantes para las que no tengo palabras para agradecer el apoyo incondicional “Mi familia”: mis padres, suegros, hermanos(as), cuñado y cuñada, sobrinos, tíos, primos y familiares. Por el cariño, la comprensión, y el continuo apoyo que me brindaron.

Halley Rodríguez

INDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN:	1
II.	REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1.	Situación de la acuicultura en Chile	3
2.2.	IPN y su efecto en la acuicultura.....	3
2.3.	Variación genética y resistencia a enfermedades	4
2.4.	Marcadores moleculares.....	5
2.5.	Asociación genómica (GWAS) para resistencia a IPN en salmónidos	7
III.	OBJETIVOS	9
3.1.	Objetivo general.....	9
3.2.	Objetivos específicos	9
IV.	HIPÓTESIS	10
4.1.	Hipótesis general	10
4.2.	Hipótesis específicas	10
V.	MATERIAL Y METODOS	11
5.1.	Peces	11
5.2.	Desafío experimental.....	11
5.3.	Genotipado.....	11
5.4.	Definición de rasgos y análisis de asociación genómica (GWAS)...	12
5.5.	Genes candidatos.....	14
VI.	RESULTADOS.....	15
6.1.	Desafío experimental.....	15
6.2.	Estadísticas generales y heredabilidad para resistencia a IPNV	15
6.3.	Asociación genómica	17
6.4.	Genes asociados a resistencia a IPNV	21
VII.	DISCUSIÓN	24
VIII.	CONCLUSIONES.....	29
IX.	BIBLIOGRAFÍA	30

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadísticas generales para los rasgos utilizados en el estudio.	16
Tabla 2. Estimación de la Heredabilidad para resistencia a IPNV, entre paréntesis error estándar.....	17
Tabla 3. SNP significativos para resistencia a IPNV detectados para tiempo de muerte y supervivencia binaria	19
Tabla 4. Frecuencia de alelo menor de cada marcador y efecto de cada alelo para resistencia a IPNV.	20
Tabla 5. Proporción de la Heredabilidad y varianza fenotípica explicada por cada marcador para tiempo de muerte y supervivencia binaria.	21
Tabla 6. Marcadores asociados a la resistencia a IPNV ubicados en scaffold en el genoma de trucha arcoíris.....	22
Tabla 7. Resumen de la localización y función de genes candidatos que juegan un rol importante en la respuesta inmune a la infección frente al IPNV.....	23

INDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

Figura 1. Mortalidad acumulada por familia después de 63 días de desafío experimental contra el virus IPN en alevines de truchas arcoíris. 15

Figura 2. GWAS para resistencia a IPNV medido como tiempo de muerte, la línea roja indica el umbral de significancia (FDR). 18

Figura 3. GWAS para resistencia a IPNV medido como supervivencia binaria, la línea roja indica el umbral de significancia (FDR) 18

INDICE DE ABREVIATURAS

cM	: Centimorgan
<i>cdh1</i>	: Cadherina epitelial
DE	: Desviación estándar
DNA	: Ácido Desoxirribonucleico
FAO	: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDR	: False discovery rate
GWAS	: Análisis de asociación a genoma completo
h^2	: Heredabilidad
IP	: Intraperitoneal
IPN	: Necrosis pancreática infecciosa
IPNV	: Virus de la necrosis pancreática infecciosa
ISA	: Anemia infecciosa del salmón
MAF	: Frecuencia del alelo menor
MAS	: Selección asistida por marcadores
mL.	: Mililitros
PIT-Tag	: Passive integrated transpoder
QTL	: Loci de efecto cuantitativo
SA	: Sociedad Anónima
SB	: Supervivencia binaria
SNP	: Polimorfismo de nucleótido único
TCID50	: Dosis infectante de cultivo de tejidos
TM	: Tiempo de muerte
VEN	: Necrosis eritrocítica viral
°C	: Grados Celsius

RESUMEN

La necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una enfermedad viral con un impacto negativo considerable en la acuicultura de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). El objetivo del presente trabajo ha sido detectar las regiones genómicas que explican la resistencia al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en truchas arcoíris. Un total de 2.278 peces provenientes de 58 familias de medios hermanos y hermanos completos fueron desafiados con virus IPN para inducir la enfermedad. De estos fueron genotipados 768 peces: 488 resistentes y 280 susceptibles. Para el genotipado se utilizó un microarreglo Axiom[®], Affymetrix[®] de 57 mil marcadores de tipo polimorfismo de nucleótido único (SNP). Se realizó un análisis de asociación de genoma completo utilizando los datos fenotípicos y genotípicos de los peces desafiados. Se utilizaron modelos de regresión lineal y regresión logística. La heredabilidad para la resistencia al virus IPN calculada con información de pedigrí para el rasgo tiempo de muerte fue 0,39 y para el rasgo de supervivencia binaria fue 0,32, y usando información genómica fue de 0,46 y 0,45, respectivamente. El análisis de asociación indicó que la resistencia al virus IPN es un rasgo Oligogénico. Se detectó un SNP asociado de forma significativa al rasgo tiempo de muerte en el cromosoma 5. La proporción de la varianza fenotípica y heredabilidad explicada por este marcador fue de 0,035 y 0,076, respectivamente. El Sentrin-specific protease 5 (*SEN5*) podría ser un gen candidato implicado en la resistencia frente a este patógeno por encontrarse en las cercanías del SNP significativo. Debido a la reducida proporción de la varianza fenotípica explicada por el marcador detectado, concluimos que la incorporación de toda la información genómica, a través de la selección genómica, podría ser el enfoque más adecuado para acelerar el progreso genético en el mejoramiento de la resistencia frente al virus IPN en trucha arcoíris.

Palabras claves: Asociación genómica, resistencia a enfermedades, heredabilidad, genes candidatos

SUMMARY

Infectious pancreatic necrosis (IPN) is a viral disease with a considerable negative impact on rainbow trout aquaculture. The objective of the present work was to detect the genomic regions that explain the resistance to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A total of 2,278 fishes from 58 families of complete siblings were challenged with IPN virus to induce the disease. A total of 768 fishes, 488 resistant and 280 susceptible, were genotyped with an Axiom® microarray, Affymetrix® of 57,000 single nucleotide polymorphism (SNP) markers. A complete genome association analysis was performed using the phenotypic and genotypic data of the challenged fishes. Linear regression and logistic regression models were used. The heritability for IPN virus resistance calculated with pedigree information for time of death trait was 0.39 and for the binary survival trait was 0.32, and using genomic information was 0.46 and 0.45, respectively. Association analysis indicated that resistance to IPN virus is an oligogenic trait. A SNP was significantly associated with the day-of-death trait on chromosome 5. The proportion of the phenotypic variance and heritability explained by this marker was 0.035 and 0.076, respectively. Sentrin-specific protease 5 (*SEN5*) could be a candidate gene involved in resistance to this pathogen because it is found near to the significant SNP. Due to the reduced proportion of the phenotypic variance explained by the detected marker, we conclude that the incorporation of all genomic information, through genomic selection, could be the most appropriate approach to accelerate genetic progress in the improvement of resistance to IPN virus in rainbow trout.

Key words:, Genomic association, resistance to diseases, heritability, candidate genes

I. INTRODUCCIÓN:

Dentro de la acuicultura una de las principales actividades es la cría de salmónidos, la cual genera productos con elevado valor económico (FAO, 2014). El éxito de la acuicultura depende en gran medida del control de las enfermedades infecciosas. Un ejemplo claro del impacto que pueden ocasionar ciertas patologías en el cultivo del salmón es la crisis que afectó a la industria Chilena durante los años 2007 y 2009 como consecuencia de los brotes del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISA).

La necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una enfermedad ocasionada por un birnavirus RNA de doble cadena, del cual varios subtipos se han caracterizado (Roberts y Pearson, 2005). Este virus afecta a varios organismos acuáticos silvestres y de cultivo. Los salmónidos son principalmente afectados, razón por la que esta enfermedad tiene un gran impacto en el cultivo de estas especies. Los niveles de mortalidad durante un brote de IPN están influenciados por numerosos factores, entre los cuales se puede mencionar un componente genético que otorga resistencia al virus en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Guy *et al.*, 2006).

El mejoramiento genético apunta a incrementar la rentabilidad de los sistemas productivos, por lo que las características de importancia económica deberían estar incluidas en el objetivo de mejoramiento. Es por esta razón que en salmónes se incluyen caracteres relacionados con el crecimiento corporal, color y textura de la carne, y en las últimas décadas se ha incluido también la resistencia genética a enfermedades dentro del objetivo selección (Gjedrem, 2000; Gjedrem *et al.*, 2012).

El progreso genético realizado en rasgos que pueden ser fácilmente medibles en los candidatos a la selección (tales como el crecimiento o la maduración sexual) ha sido rápido y sustancial (Gjedrem, 2012), a diferencia de lo que se espera para los rasgos difíciles de medir (por

ejemplo, calidad de filete o resistencia a enfermedades). La selección asistida por marcadores (MAS) podría aumentar considerablemente la precisión de la selección para rasgos difíciles de fenotipificar en los programas de mejoramiento genético de salmón (Sonesson, 2005).

La resistencia a enfermedades se puede medir utilizando pruebas de campo o desafíos controlados, sin embargo, en cualquier caso, los peces desafiados no podrán ser usados como candidatos a la selección. Por lo tanto, los valores genéticos de los candidatos se basan exclusivamente en las tasas de supervivencia de los hermanos y otros parientes (Sonesson, 2005; Ødegård *et al.*, 2011, Yáñez *et al.*, 2014).

Con el desarrollo de las tecnologías genómicas, se puede disponer de mayor información sobre los genes o QTL (loci de efecto cuantitativo) involucrados en la variación de los caracteres cuantitativos (Goddard y Hayes, 2009). La detección de QTL es el punto de partida para la aplicación de MAS, y también la selección asistida por genes. Por otra parte, la identificación de los genes que subyacen a los QTLs puede conducir al conocimiento fundamental de la regulación genética de la resistencia a enfermedades y de las interacciones hospedero-virus en los peces (Moen *et al.*, 2009).

QTL para la resistencia contra diversas enfermedades, se han determinado en salmón del Atlántico y trucha arcoíris (Kjøglum *et al.*, 2006; Ozaki *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2016; Correa *et al.*, 2015; Moen *et al.*, 2015; Houston *et al.*, 2008; Houston *et al.*, 2010; Houston *et al.*, 2012). En el salmón del Atlántico existen algunos reportes de mapeo de QTL para la resistencia contra el virus IPN en post-smolts, basado en datos de un ensayo de campo (Houston *et al.*, 2008) y desafíos experimentales (Moen *et al.*, 2009). Sin embargo, en trucha arcoíris existe limitada información sobre la genética molecular de la resistencia al virus IPN. Esta información será de gran utilidad para determinar la factibilidad de implementar programas de selección asistida por marcadores moleculares para este carácter.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Situación de la acuicultura en Chile

Chile cuenta con condiciones favorables para el desarrollo de la acuicultura. El cultivo de salmones ha presentado un desarrollo notable y sostenido durante los últimos, dentro de estos la trucha arcoíris es la segunda especie de salmónidos con mayor producción, estimándose en el año 2012 una producción mundial de 855.982 t. con un valor de US\$ 3.631 millones (FAO, 2014). Chile es el primer productor mundial de trucha arcoíris alcanzando un volumen total de cosecha aproximado de 94.607 t. durante el año 2015 (Sernapesca, 2015). El estado sanitario de los peces es uno de los principales factores que afectan el retorno económico de la industria del salmón. Las enfermedades infecciosas (virales, bacterianas y parasitarias) son las patologías que generan las mayores pérdidas económicas en los sistemas de cultivo de salmónidos a nivel nacional (Sernapesca, 2015).
+56993644977

2.2. IPN y su efecto en la acuicultura.

Entre las enfermedades virales más relevantes que afectan al cultivo del salmón en Chile se encuentran el IPN, la necrosis eritrocítica viral (VEN) (Smith *et al.*, 2001) y el virus ISA (Sernapesca, 2015). El virus IPN puede afectar a la trucha arcoíris, al salvelino (*Salvelinus fontinalis*), a la trucha común (*Salmo trutta*), al salmón del Atlántico, salmones del Pacífico (*Oncorhynchus spp*) y otras especies. Esta enfermedad es altamente contagiosa y tiene la característica de afectar el salmón de cultivo durante la etapa de agua dulce y agua de mar (Roberts y Pearson, 2005). El primer signo de un brote de la enfermedad en los alevines salmónidos es a menudo un aumento progresivo en la mortalidad diaria. Los síntomas clínicos incluyen pigmentación oscura, abdomen abultado y prominente y natación gírica en espiral. Las mortalidades acumuladas pueden variar desde menos del 10% hasta más de un 90%, dependiendo de la combinación de varios factores tales como la cepa vírica, el hospedador y el ambiente

(Callister y Owens, 1995; Obos y Roberts, 1983). En la fase de agua dulce del ciclo de vida se reportan mortalidades de hasta 70%. Mientras que en ambientes marinos, la aparición de brotes de IPN alcanzan una mortalidad de hasta un 40%, (Roberts y Pearson, 2005).

Según el informe sanitario del 2012 del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA), del total de diagnósticos reportados, el virus IPN tuvo el segundo lugar de las enfermedades notificadas en Chile. Además, este virus no sólo es de importancia para Chile, sino que está ampliamente diseminado y es reconocido como uno de los agentes causales de las enfermedades más importantes por su impacto en la producción salmonídea en países de la Unión Europea y Noruega (Ariel y Olesen, 2002). El control de esta enfermedad se ha llevado a cabo principalmente con vacunas, medidas de bioseguridad y minimización del estrés. La vacunación puede proporcionar cierta protección contra la enfermedad de los peces juveniles (Ramstad y Midtlyng, 2008) pero esta protección en muchos casos es variable y no es completa (Mikalsen *et al.*, 2004).

2.3. Variación genética y resistencia a enfermedades

Un requisito para mejorar una característica mediante selección artificial es que ésta presente variación genética aditiva. La heredabilidad (h^2) expresa la proporción de la variación fenotípica total que es atribuible a la variación genética aditiva (Falconer y Mackay, 1996). Existen diversos trabajos en los cuales se han estimado valores de heredabilidad para resistencia a diversas enfermedades virales y bacterianas en salmónidos (Yáñez *et al.*, 2015). En enfermedades virales, por ejemplo, se ha determinado varianza genética aditiva significativa para resistencia a enfermedades virales tales como VHS, ISA e IPN en salmón del Atlántico (Gjedrem y Gjøen, 1995; Gjedrem *et al.*, 1991; Guy *et al.*, 2006). Sin embargo, en trucha, los reportes de heredabilidades para resistencia frente a enfermedades virales son más escasos.

La selección genética se basa en la obtención de los valores genéticos estimados de los animales a partir de los registros fenotípicos e información de la genealogía. Sin embargo, el progreso genético es lento si el rasgo sólo se puede medir en un sexo (por ejemplo, la producción de leche) o después de la muerte (por ejemplo, calidad de la carne), o si medir el rasgo es caro (por ejemplo, la producción de metano o resistencia a enfermedades). (Goddard y Hayes, 2009). La mayor parte de los caracteres de interés en producción son de naturaleza cuantitativa, es decir, muestran distribuciones fenotípicas continuas. Estos caracteres están controlados por una importante cantidad de genes sujetos, además a la influencia del ambiente (Martínez, 2012).

La resistencia a enfermedades se define como la capacidad del hospedero para iniciar y mantener respuestas dirigidas a prevenir el establecimiento de un agente infeccioso pudiendo también eliminarlo del organismo (Bishop y Woolliams, 2014). La resistencia a enfermedades se ha convertido en un rasgo importante y de interés en los programas genéticos en acuicultura. Esta se mide comúnmente utilizando información de supervivencia frente a la infección experimental de hermanos completos de los candidatos a la selección (Ødegård *et al.*, 2011; Yáñez *et al.*, 2014; Yáñez y Martínez, 2010). Los desafíos experimentales controlados son más apropiados que las pruebas de campo, ya que permiten manejar las condiciones ambientales y lograr obtener heredabilidades de mayor magnitud (Gjøen *et al.*, 1997; Ødegård *et al.*, 2011). En los desafíos experimentales, peces con genealogía conocida y marcados individualmente son expuestos al patógeno, con inóculos mediante inmersión, cohabitación o inyección intraperitoneal (IP), con el objetivo de registrar las curvas de mortalidades (Nordmo *et al.*, 1997).

2.4. Marcadores moleculares

En los últimos años, el desarrollo de nuevas estrategias genómicas junto con la progresiva disminución de los costos de secuenciación está propiciando un cambio de escenario en el campo de la mejora genética. Estos avances han permitido la identificación de múltiples genes o marcadores genéticos

asociados a los genes que afectan características de interés en especies domésticas. Consecuentemente, la identificación de estos marcadores ha proporcionado oportunidades para mejorar la respuesta a la selección para diversos rasgos de interés (Dekkers, 2004).

Dentro de los marcadores de DNA más ampliamente utilizados se encuentran los microsatélites y SNPs (Polimorfismos de nucleótido único) (Yáñez y Martínez, 2010). Los SNPs, corresponden a un polimorfismo causado por la mutación de un solo nucleótido en un locus específico en la secuencia de DNA. Este polimorfismo puede representar transiciones, transversiones, inserciones y deleciones de una sola base (Lander, 1996), y la frecuencia del alelo menor en la población debería ser 1% o mayor. En la actualidad, los marcadores SNP forman parte de los métodos de genotipado preferidos, ya que son abundantes en el genoma, genéticamente estables, y aptos para el análisis de alto rendimiento automatizado (Vignal *et al.*, 2002). Siendo así ideales para la construcción de mapas genéticos densos, los cuales pueden ser utilizados en el mapeo fino de QTL y así facilitar la identificación de genes causales de la variación genética para determinados caracteres (Hayes y Goddard, 2010).

En la acuicultura se han ido incorporando herramientas para el mapeo genómico mediante mapas genéticos, microarrays para el análisis de expresión masiva de genes y recientemente la utilización de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva que están incrementando los recursos genómicos de forma exponencial. Estos métodos de secuenciación masiva han facilitado el descubrimiento de marcadores genéticos abundantes, los cuales tienen múltiples aplicaciones potenciales para el desarrollo del cultivo de especies acuáticas (Yáñez *et al.*, 2014; Yáñez *et al.*, 2015). En la actualidad se cuenta con chips de genotipado de SNPs de alta densidad para especies salmonideas (Houston *et al.*, 2014; Palti *et al.*, 2015; Yáñez *et al.*, 2014), los cuales vienen siendo utilizados para la identificación de QTL y genes asociados a caracteres complejos en estas especies. Además, esta densidad de marcadores SNP pueden ser utilizados para predecir los

valores genéticos-genómicos para diversos rasgos de importancia económica en los programas de mejoramiento genético en estas especies (Ødegård *et al.*, 2014).

2.5. Asociación genómica (GWAS) para resistencia a IPN en salmónidos

Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han sido posibles gracias a la identificación y disponibilidad de miles de polimorfismos de nucleótido único (SNP) distribuidos a través del genoma en diversas especies terrestres y recientemente, especies acuícolas. La disponibilidad de paneles de SNPs de elevada densidad en las especies domésticas ha permitido la búsqueda de las mutaciones que subyacen a la variación en los rasgos complejos mediante el uso de estudios de asociación genómica (GWAS). Este tipo de estudios se han utilizado para analizar la arquitectura genética de los rasgos cuantitativos en animales de interés productivo (Goddard y Hayes, 2009). Es posible disectar la base genética de la resistencia a enfermedades a través del uso de estudios de asociación (GWAS), donde un grupo de individuos en los cuales se observa un fenotipo determinado para un rasgo se genotipa utilizando un panel denso de SNPs, para posteriormente determinar la asociación entre un marcador y el rasgo mediante análisis genético estadístico (Goddard y Hayes, 2009).

A la fecha se han realizado estudios de mapeo genómico para resistencia a diversas enfermedades en salmones. Por ejemplo, utilizando marcadores microsatélites se encontraron dos QTL significativos para la resistencia frente al virus IPN en salmón del Atlántico. El más significativo fue descrito en el cromosoma 21 (Houston *et al.*, 2008) siendo confirmado en un estudio posterior (Houston *et al.*, 2010). Posteriormente utilizando métodos de secuenciación masiva para el descubrimiento y genotipado de marcadores SNP se corroboró lo descrito anteriormente (Houston *et al.*, 2012). Además, para la misma enfermedad y especie se confirmó un QTL de efecto mayor que explica un 29% y 83% de la variación fenotípica y genética, respectivamente (Moen *et al.*, 2009). En el mismo estudio los autores reportan un QTL sugestivo en el grupo de ligamiento 4 (Moen *et al.*, 2009).

En un estudio reciente, se encontró una variante en el gen que codifica a la cadherina epitelial (*cdh1*) considerándose como la principal determinante de la resistencia a IPN por ser responsable de la internalización del virus (Moen *et al.*, 2015).

Dado los antecedentes mencionados esta tesis pretende detectar regiones genómicas que expliquen la resistencia al virus IPN en truchas arcoíris. Esta información será de gran utilidad para determinar la factibilidad de implementar programas de selección asistida por marcadores moleculares (MAS) para este carácter.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Detectar regiones genómicas que expliquen la resistencia al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando un chip de 57.000 SNPs.

3.2. Objetivos específicos

Determinar la heredabilidad para la resistencia al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) utilizando información genómica en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Identificar SNPs asociados a la resistencia frente al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Identificar genes asociados a resistencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

IV. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

Es posible detectar las regiones genómicas que explican la resistencia al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

4.2. Hipótesis específicas

La heredabilidad calculada con información genómica para la resistencia al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es superior a 0,39.

Existen SNPs asociados a la resistencia frente al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Existen genes asociados a la resistencia frente al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

V. MATERIAL Y METODOS

5.1. Peces

Para el presente estudio, se analizaron datos obtenidos desde el Centro de Investigación y Transferencia Acuícola de Aquainnovo (Puerto Montt, Chile), a partir de 20 machos y 58 hembras de la cepa NLA que formaron 58 familias de medios hermanos y hermanos completos de trucha arcoíris de la clase anual 2014 de la empresa Aguas Claras S.A. Los datos fenotípicos para resistencia al virus IPN fueron obtenidos en un total de 2287 peces. Los peces serán identificados con PIT-tag (*Passive Integrated Transponder*), para mantener la trazabilidad de las familias.

5.2. Desafío experimental

El desafío se realizó con un aislado de virus IPN, a una concentración de $10^{7.82}$ TCID₅₀/mL, determinada a través del método Karber-Spearman (Hamilton *et al.*, 1977). La aplicación del inoculo fue por vía intraperitoneal, a razón de 0.05 mL/pez. Los peces muertos fueron retirados del estanque en forma diaria y cada vez que se produzca. Se confirmó la causa de muerte mediante diagnosticos moleculares usando RT-PCR. Se tomaron muestras de aleta de todos los animales los cuales se conservaron en etanol al 98% a -80 ° C hasta proceder a la extracción de ADN.

5.3. Genotipado

DNA genómico fue extraído de muestras de aleta de 768 peces (estos fueron escogidos de forma que cada familia desafiada esté representada) utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los peces fueron genotipados usando el DNA previamente extraído, el cual fue hibridado en un microarreglo Axiom, Affymetrix de 57K SNPs, este se diseñó en colaboración The National Center for Cool and Cold Water Aquaculture, EE.UU., y AquaGen, Trondheim, Noruega. (Palti *et al.*, 2015).

Posterior al genotipado se usó el Software AXIOM Analysis Suite de Affymetrix, (parámetros por defecto) para hacer el control de calidad (QC), se elaboró una matriz seleccionando los SNP con el tipo de conversión “*Poly High Resolution*”, se asignó también el cromosoma y la distancia genética de cada SNP seleccionado.

El control de calidad se realizó para los genotipos utilizaron el software R y el paquete GenAbel (GenAbel, 2015). Usando los siguientes parámetros: Equilibrio de Hardy Weinberg ($p < 1 \times 10^{-10}$), frecuencia de alelo menor ($> 0,01$) y tasa de llamada para SNPs y muestras ($> 0,95$).

5.4. Definición de rasgos y análisis de asociación genómica (GWAS)

Los fenotipos de resistencia se definieron como el tiempo de muerte (TM), medido en días con valores que van de 1 a 63, dependiendo del tiempo de muerte; y como la supervivencia binaria (SB), registrado como 1 si el individuo murió durante el desafío y 0 si el individuo sobrevivió hasta el final del ensayo. Al final del experimento se registró el peso para ser incluido como covariable dentro del modelo. Para identificar la asociación entre SNPs y la resistencia a IPN, se utilizó un modelo de regresión lineal para TM y regresión logística para el rasgo de supervivencia binaria SB. Se construyó una matriz de parentesco genómico usando los datos de SNP para corregir por el efecto de tener individuos emparentados (Aulchenko *et al.*, 2007; GenAbel, 2015). Los valores de heredabilidad se estimaron a partir de datos de genotipos, usando un modelo lineal mixto implementado en la función “*polygenic*” (GenAbel, 2015).

El modelo de regresión lineal que se utilizó para analizar el tiempo de muerte **TM** el siguiente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 * SNP + \beta_2 * W + e_i$$

Dónde, Y_i : Es el fenotipo registrado **TM**, β_0 : Intercepto, β_1 : Efecto de cada **SNP**, β_2 : Efecto del peso (**W**), y e_i : el efecto residual.

Y la formula general para el modelo de la regresión logística para **SB**:

$$P(Y = 1) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 * SNP + \beta_2 * W}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 * SNP + \beta_2 * W}}$$

Donde, $P(Y = 1)$: es la probabilidad de la variable aleatoria de tomar un valor igual a 1, β_0 : Intercepto, β_1 : Efecto de cada **SNP**, y β_2 : Efecto del peso (**W**)

Se calculó el $-\log_{10}$ (p-valor) para cada SNP a través de todo el genoma para resumir los resultados GWAS. El umbral de significancia se determinó para genoma completo y a nivel de cromosoma a través de la corrección de False Discovery Rate (Benjamini y Hochberg, 1995). Esta corrección se hizo como sigue: (1) Se ordenarán los p-valores de $p_1 \leq p_2 \leq \dots \leq p_k$ donde, k es el número de marcadores de la prueba. (2) A partir del p valor mayor, encontramos el primer valor individual de p (p_i) que satisfaga: $p_i \leq i/k * 0.05$, donde i = observación i-ésima. (3) El p_i que satisface la condición anterior se convirtió en el valor crítico para la significancia a nivel genómico.

La proporción de la heredabilidad explicada por cada marcador significativo se obtuvo mediante la comparación de la heredabilidad estimada con la función poligénica y la heredabilidad estimada con la inclusión del genotipo SNP significativo como factor (Korte y Farlow, 2013). La proporción de la varianza fenotípica explicada por cada marcador para ambos caracteres se estimó multiplicando la heredabilidad por la proporción de la heredabilidad explicado por cada marcador. El efecto aproximado de cada marcador se

obtuvo utilizando el paquete estadístico GenABEL (Aulchenko *et al.*, 2013; GenABEL, 2015).

5.5. Genes candidatos

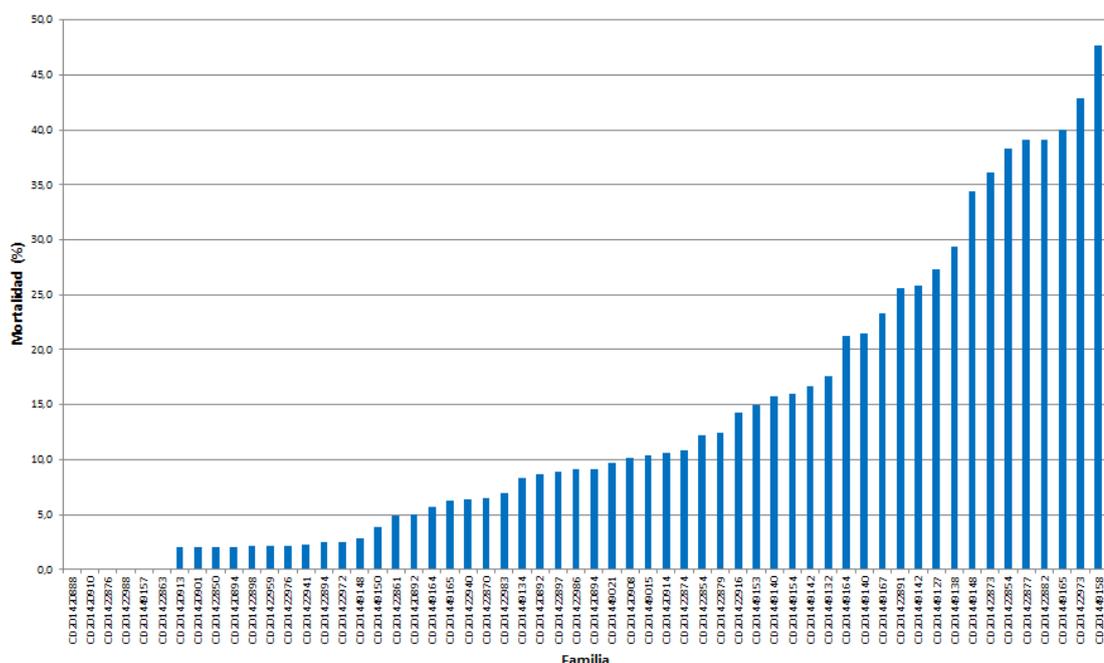
Las secuencias de nucleótidos circundantes a los SNPs que muestren una asociación significativa para la resistencia al virus IPN fueron interrogadas mediante BLASTx (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) para evaluar la presencia de genes anotados, utilizando la información disponible para trucha arcoíris y otras especies salmonídeas.

VI. RESULTADOS

6.1. Desafío experimental

Durante los 63 días de experimento se alcanzó un número máximo de 23 muertos/día y un promedio de 6 peces muertos por día (DE = 4). El porcentaje de mortalidad acumulado fue de 13.77%, el cual varió 0 a 47,6% entre las 58 familias.

Figura 1. Mortalidad acumulada por familia después de 63 días de desafío experimental contra el virus IPN en alevines de truchas arcoíris.



6.2. Estadísticas generales y heredabilidad para resistencia a IPNV

De los 2.278 peces desafiados, 768 peces fueron genotipados (488 peces eran resistentes y 280 susceptibles). Los peces genotipados se seleccionaron de forma que cada familia estuviera representada, teniendo así en promedio 13,2 (DE = 1,5), un máximo de 18 y mínimo de 12 peces por familia. La **Tabla 1** muestra estadísticas de resumen de los animales

seleccionados para el genotipado. En promedio hubo 5 individuos susceptibles por familia.

Tabla 1. Estadísticas generales de los peces genotipados para las variables utilizadas en el estudio.

Descripción	n	Media	Desviación estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
Peso al marcaje (g)	768	2,12	0,74	0,03	0,8	5,8
Supervivencia binaria	768	0,36	0,48	0,02	0	1
Tiempo de muerte	768	51,46	13,98	0,51	13	62,00

750 individuos y 40.150 SNP (70,4%) pasaron el control de calidad realizado con el software *AXIOM Analysis Suite de Affymetrix*, de los cuales un total de 38,296 marcadores y 721 individuos pasaron los criterios de control de calidad realizados mediante el paquete GenABEL. El número de marcadores SNP promedio por cromosoma fue de 1277 (DE = 384), y varió entre 594 y 1818.

Las heredabilidades estimadas utilizando la matriz de parentesco genómico y matriz de parentesco genético aditivo para los caracteres en estudio se muestran en la **Tabla 2.**

Tabla 2. Valores de heredabilidades para la resistencia a IPNV en truca arcoíris. Error estándar entre paréntesis.

	Heredabilidad	
	Tiempo de muerte	Supervivencia
Matriz G ¹	0,46	0,45
Matriz A ²	0,39 (0,08)	0,32(0,07)

¹Heredabilidad estimada usando matriz de parentesco genómico

²Heredabilidad estimada usando matriz de parentesco genético aditivo

6.3. Asociación genómica

El resultado del análisis de asociación genómica muestra un SNP (AX-89921775) significativo a nivel de genoma ($p\text{-value} = 1.99\text{e-}08$), ubicado en el cromosoma 5, y un SNP significativo a nivel de cromosoma para el fenotipo tiempo de muerte (**Figura 3**). No se detectó ningún SNP significativo a nivel de genoma completo para el rasgo de supervivencia binaria (**Figura 4**). Sin embargo, para este rasgo se detectaron, 8 SNP significativos a nivel de cromosoma (**Tabla 3**).

Figura 2. Manhattan plot del GWAS para resistencia a IPNV medido como tiempo de muerte, la línea roja indica el umbral de significancia a nivel genómico.

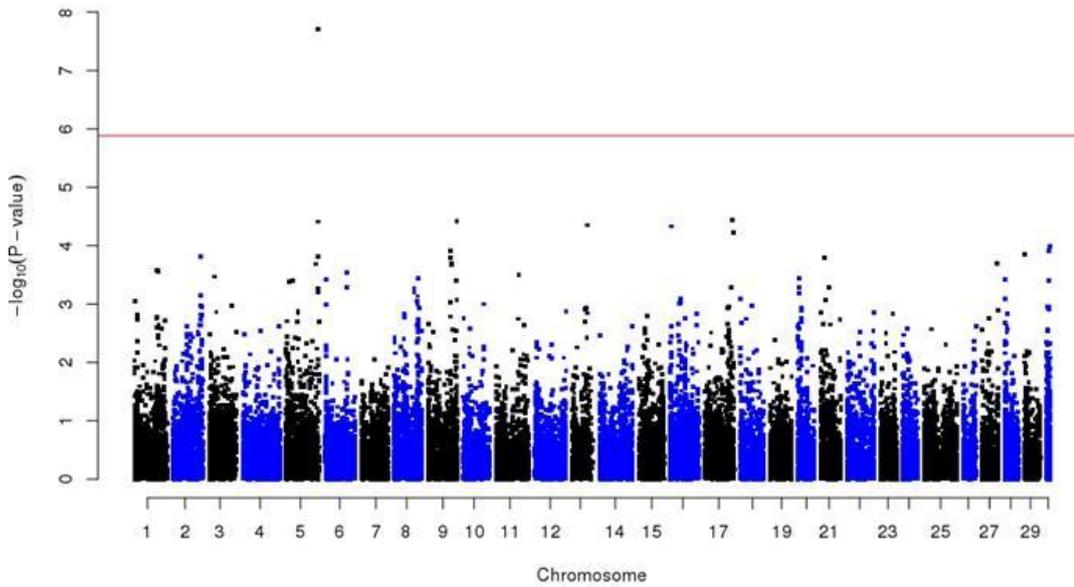
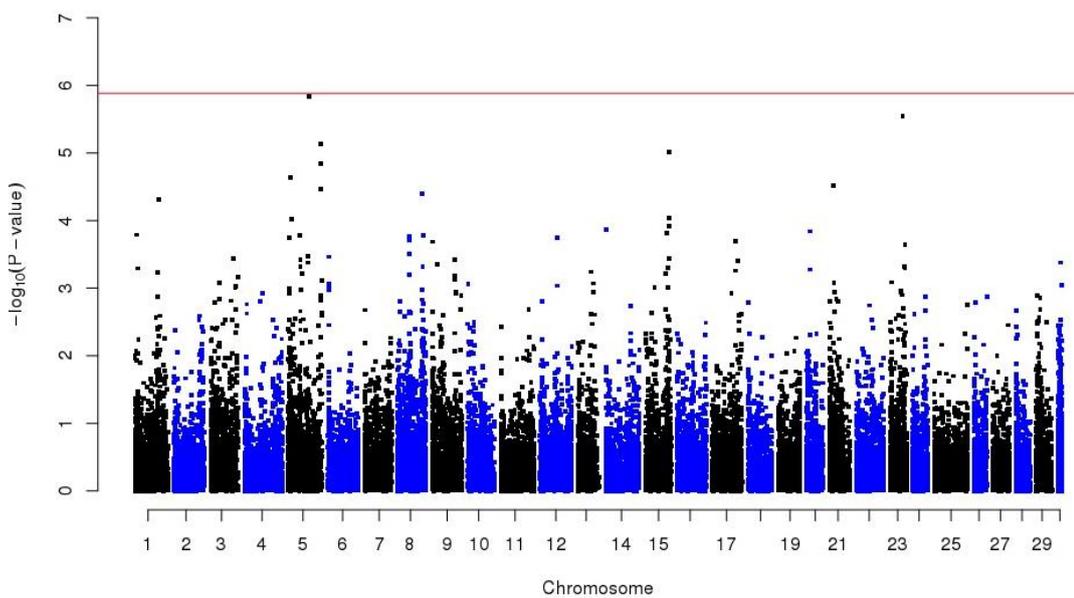


Figura 3. Manhattan plot para GWAS para resistencia a IPNV medido como supervivencia binaria, la línea roja indica el umbral de significancia a nivel genómico.



El SNP significativo para tiempo de muerte se encuentra ubicado en el cromosoma 5 (AX-89921775) en la posición 184,65 cM.. El mismo SNP es significativo a nivel de cromosoma para el rasgo de supervivencia binaria.

Tabla 3. SNP significativos para resistencia a IPNV detectados para tiempo de muerte y supervivencia binaria.

SNP_ID	Cromosoma	Posición (cM)	Scaffold	Tiempo de muerte	Supervivencia binaria
AX-89921775	5	184,65	34.359	1,99e-08^{ab}	4.54e-06 ^b
AX-89964133	13	86,66	374	4,45e-05 ^b	1.14e-04
AX-89949295	5	117,55	2,494	4,68e-03	1,44e-06 ^b
AX-89938762	23	70,46	35	1.48e-03	2,89e-06 ^b
AX-89946704	5	185,87	60,286	5.52e-04	7,32e-06 ^b
AX-89938909	15	136,44	-	2.64e-02	9,64e-06 ^b
AX-89960431	5	110,5	226	8.71e-03	3,01e-05 ^b
AX-89928391	21	24,61	4,103	1.60e-04	3,43e-05 ^b

^aSignificativo después de la corrección de FDR a nivel de genoma completo

^bSignificativo después de la corrección de FDR a nivel de cromosoma

La frecuencia de alelo menor y el efecto de cada SNP significativo a nivel de genoma y cromosoma se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Frecuencia de alelo menor de cada marcador y efecto de cada alelo para resistencia a IPNV para supervivencia binaria (SB) y tiempo de muerte (TM).

SNP_ID	A ₁	A ₂	MAF	Efecto (A ₂) SB	Efecto (A ₂) TM
AX-89921775	G	T	0,186	0,25	-2,09
AX-89964133	T	G	0,339	-0,15	1,23
AX-89949295	C	A	0,062	-0,46	1,76
AX-89938762	G	A	0,483	0,22	-0,97
AX-89946704	C	T	0,372	0,22	-1,10
AX-89938909	C	T	0,209	-0,25	0,81
AX-89960431	G	T	0,137	-0,28	1,14
AX-89928391	A	C	0,438	0,19	-1,11

A₁ y A₂ son alelo menor y mayor, respectivamente. MAF: Frecuencia del alelo menor.

La proporción de la varianza fenotípica y heredabilidad explicada por los SNP significativos a nivel de genoma y de cromosoma se muestran en la **Tabla 5**. La proporción de la varianza fenotípica explicada por el marcador significativo para tiempo de muerte fue de **0,035** mientras que la proporción de la heredabilidad fue de **0,076**.

Tabla 5. Proporción de la heredabilidad y varianza fenotípica explicada por cada marcador para tiempo de muerte y supervivencia binaria.

SNP_ID	Heredabilidad		Varianza Fenotípica	
	Tiempo de Muerte	Supervivencia	Tiempo de Muerte	Supervivencia
AX-89921775	0,076*	0,030	0,035*	0,014
AX-89964133	0,026	0,018	0,012	0,008
AX-89949295	0,012	0,036	0,006	0,017
AX-89938762	0,015	0,034	0,007	0,016
AX-89946704	0,018	0,031	0,008	0,014
AX-89938909	0,008	0,031	0,004	0,014
AX-89960431	0,010	0,028	0,005	0,013
AX-89928391	0,021	0,027	0,010	0,012

* SNP significativo a nivel de genoma

6.4. Genes asociados a resistencia a IPNV

En relación a los SNP asociados de forma significativa tanto para genoma completo y cromosoma se identificaron 8 scaffold. La Tabla 6 muestra los marcadores asociados a sus respectivos scaffolds. . El SNP AX-89938909 aún no cuenta con su posición en un determinado scaffold.

Tabla 6. Marcadores asociados a la resistencia a IPNV ubicados en scaffold en el genoma de trucha arcoíris.

SNP_ID	Cromosoma	Scaffold	Tamaño del scaffold (pb)	Posición en scaffold
AX-89921775	5	34.359	3.772	203
AX-89964133	13	374	901.544	782.041
AX-89949295	5	2494	97.962	7.003
AX-89938762	23	35	2.347.512	508.734
AX-89946704	5	60286	2.455	1.692
AX-89938909	15	--	--	--
AX-89960431	5	226	1.215.296	70.571
AX-89928391	21	4103	55.510	30.222

Al realizar la consulta de los scaffold con blastx se encontraron genes candidatos, los cuales podría jugar un papel importante en la resistencia frente a IPN. Estos genes se presentan con mayor detalle en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Resumen de la localización y función de genes candidatos asociados a scaffolds conteniendo SNPs significativos a nivel de genoma y cromosoma.

SNP_ID	Cromosoma	Gen	Función/descripción	Referencia
AX-89921775	5	Sentrin-specific protease 5	Participa en la ruta SUMO, involucrado en procesos apoptosis, ciclo celular y transcripción genética	(Di Bacco <i>et al.</i> , 2006) (Gong y Yeh, 2006) (Pinto <i>et al.</i> , 2012)
AX-89960431	5	Sphingosine 1-phosphate receptor 4	Pueden estar involucrados en procesos de migración celular específicos para los linfocitos.	(Lee <i>et al.</i> , 1998), (Yamazaki <i>et al.</i> , 2000)
AX-89964133	13	Secretory phospholipase A2 receptor-like (sPLA2-IB)	Puede estar implicado en respuestas en producciones de citoquinas proinflamatorias durante choque endotóxico.	(Granata <i>et al.</i> , 2005)
AX-89964133	13	Mucin-17-like isoform X2	Probablemente desempeña un papel en el mantenimiento de la homeostasis en las superficies mucosas	(Malmberg, <i>et al.</i> , 2008)
AX-89946704	5	Vesicle transport protein USE1	Involucrado en el transporte de vesículas, transporte retrógrado de retículo de Golgi-retículo endoplásmico.	(Dilcher <i>et al.</i> , 2003)
AX-89960431	5	Unconventional myosin-IXb-like	Involucrado en el transporte de vesículas, melanosomas, tendría implicancia en la formación de los Centros Melano Macrofagos.	(Post <i>et al.</i> , 1998) (Kong <i>et al.</i> , 2015)

VII. DISCUSIÓN

A nuestro entender, este es el primer trabajo donde se reporta la detección y posición de un QTL involucrado en la resistencia a IPNV en truchas arcoíris utilizando marcadores tipo SNP.

La mortalidad encontrada en ensayos de IPNV es muy variable dependiendo así de diversos factores, como la cepa del virus, las poblaciones evaluadas, el tamaño de los peces, las condiciones ambientales, entre otros. Por ejemplo de forma natural en zonas endémicas se han reportado mortalidades superiores a 40% (Robert y Pearson, 2005; Houston *et al.*, 2008). Otros autores para la misma enfermedad en salmón del Atlántico reportaron mortalidades de 70,5 y 77,8% (Moen *et al.*, 2009). Mientras que en truchas arcoíris se han reportado mortalidades entre 36 a 54% en diferentes familias (Ozaki *et al.*, 2007). Estudios previos han demostrado variación en la resistencia frente a IPN entre distintas variedades cultivadas de truchas arcoíris. También Okamoto *et al.* (1993) demostraron que la progenie de una población de cultivo de trucha arcoíris adquirió resistencia genética frente a IPN luego de un brote espontáneo, y cuya mortalidad promedio en la cepa resistente (YN-RT201) fue de 4,3% en comparación con el 96,1% de una cepa altamente sensible (YK-RT101). La mortalidad acumulada promedio reportada en el presente ensayo fue de 13,77%, la cual es considerada una mortalidad reducida en comparación con estudios previos.

Los primeros intentos de utilizar marcadores moleculares para la evaluación del parentesco y estimación de la heredabilidad de rasgos cuantitativos se originan en el análisis de ciertas poblaciones naturales hace más de medio siglo (Li y Horvitz, 1953; Toro *et al.*, 2002). Varios de estos estudios indicaron que, para parientes distantes, la proporción de alelos que comparten varía sustancialmente entre los segmentos cromosómicos y, en consecuencia, la precisión de los estimadores usando marcadores es baja si el número de marcadores es reducido, sin embargo estas estimaciones

incrementan si el número de marcadores es cada vez mayor (de los Campos *et al.*, 2015). Esto podría explicar la diferencia en el cálculo de la heredabilidad al usar información genómica en comparación al cálculo con información de pedigrí. Algunos trabajos mostraron poca diferencia en el cálculo de heredabilidad usando información genómica e información de pedigrí para peso y longitud en salmón del atlántico (Tsai *et al.*, 2015; 2016), para resistencia a *Piscirickettsia salmonis* (Correa *et al.*, 2015), *Caligus rogercresseyi* (Correa *et al.*, 2016) y *Lepeophtheirus salmonis* (Tsai *et al.*, 2016). La diferencia en la estimación de la heredabilidad usando información genómica y de pedigrí aumentará o disminuirá dependiendo de los rasgos en estudio y el tamaño de la población, dando una menor diferencia entre las estimaciones de los rasgos altamente heredables en poblaciones grandes (Loberg *et al.*, 2015). Los animales genotipados, corresponden a 768 y representan una población de tamaño moderado y las heredabilidades calculadas son moderadas a altas, lo que también se ha demostrado en un estudio previo que contribuye cambios leves en las estimaciones de heredabilidad (Forni *et al.*, 2011).

Algunos estudios han demostrado heredabilidades significativas para resistencia contra IPN en salmón del Atlántico (Guy *et al.*, 2006; Storset *et al.*, 2007), utilizando la definición para el carácter como tiempo de muerte y modelos de análisis genético con información de pedigrí. Los valores de heredabilidad reportados varían de 0,31 a 0,43 en salmón del Atlántico, siendo similares a los reportados en el presente trabajo al utilizar información de pedigrí. También se han reportado en esta misma especie valores de heredabilidad entre 0,26 a 0,55 para resistencia a IPN medida como supervivencia binaria y analizada mediante modelos umbrales (Wetten *et al.*, 2007; Kjøglum *et al.*, 2008; Guy *et al.*, 2009; Gheyas *et al.*, 2010; Houston *et al.*, 2010). La magnitud de los componentes genético aditivos y residual que explican la variación fenotípica total para algunos caracteres en una población particular puede variar según las condiciones ambientales, y en consecuencia la heredabilidad puede cambiar de una población a otra

(Falconer y Mackay, 1996). La heredabilidad calculada en esta investigación nos indica que la selección para mejorar la resistencia a IPN en trucha arcoíris es factible y permitirá generar progenies de animales intrínsecamente resistentes al virus.

Se encontraron marcadores asociados a la resistencia a IPNV con significancia a nivel de genoma y cromosoma, pero la proporción de la varianza y heredabilidad explicada por cada marcador es relativamente baja. Estudios anteriores en salmón del Atlántico han determinado dos QTL significativos para la resistencia frente al virus IPN en esta especie. El más significativo fue descrito en el grupo de ligamiento 21 (Houston *et al.*, 2008; 2010; 2012). Siendo confirmado el mismo QTL de efecto mayor que explica un 29% y 83% de la variación fenotípica y genética, respectivamente, en una población de peces provenientes de un núcleo genético en Noruega por Moen *et al.* (2009). En el mismo estudio los autores reportan un QTL sugestivo en el grupo de ligamiento 4 (Moen *et al.*, 2009). Sin embargo, en un estudio reciente se demostró que la resistencia a IPN en salmón del Atlántico se encuentra determinada por un locus de efecto mayor ubicado en el cromosoma 26, el cual esta probablemente influenciado por variaciones en un gen codificante para el gen de la caderina epitelial (Moen *et al.*, 2015). Además en truchas arcoíris usando el mapa de ligamiento elaborado por Sakamoto *et al.* (2000) y en base a marcadores tipo microsatélites Ozaki *et al.* (2001) encontró 2 QTL asociados con la resistencia al IPNV. El primero fue encontrado en el grupo de ligamiento 3 y el segundo en el grupo de ligamiento 22, cada uno de estos explica cerca del 17% de la varianza fenotípica. Los mismos QTLs fueron confirmados en otro estudio posterior (Ozaki *et al.*, 2007). En este último estudio encontraron otro QTL significativo ubicado en el grupo de ligamiento 12. Estos tres fueron considerados como los QTLs de mayor efecto. Usando el mapa de ligamiento elaborado por Palti *et al.*, (2012) estos marcadores significativos fueron ubicados en el cromosoma 14 y 16 respectivamente (Zhi-Liang *et al.*, 2016). Sin embargo, en el presente estudio no se encontró alguna región similar asociada a la

resistencia al IPNV en dichos cromosomas. Adicionalmente, el genoma de la trucha arcoíris muestra una gran homología con el salmón del Atlántico (Phillips *et al.*, 2009). Sin embargo, los QTLs reportados por Ozaki *et al.*, (2001; 2007) en trucha arcoíris no se encuentran en regiones homologas en salmon del Atlántico (Danzmann *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos de este estudio indican que los QTLs involucrados en la resistencia a IPN contribuyen en una baja proporción a la varianza de este carácter, por lo que la implementación de esta información en MAS probablemente no sea la aproximación más eficiente (Correa *et al.*, 2015). Sin embargo, la información molecular que resulta de un genotipado con paneles de alta densidad de SNPs puede ser incorporada de forma eficiente en programas de mejoramiento para acelerar el progreso genético de ciertos rasgos mediante la aplicación de selección genómica (Goddard y Hayes, 2007).

El SNP localizado en el cromosoma 5 que fue significativo a nivel de genoma está ubicado en una región que contiene un gen de importancia que codifica a Sentrin-specific protease 5. Esta proteína participa en la ruta SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) y principalmente su función está relacionada con la actividad de isopeptidasa (eliminación de las cadenas SUMO) (Pinto *et al.*, 2012). La modificación por SUMO está implicada en la regulación de procesos biológicos entre los que se incluyen la transcripción genética, el ciclo celular, la apoptosis, tráfico intracelular e intranuclear y estabilidad de las proteínas, mecanismos fundamentales para la replicación viral. Por otra parte, se identificaron scaffolds albergando SNPs que fueron significativos a nivel de cromosoma, en los cuales se identificaron genes involucrados en procesos de respuesta inmune u otros procesos celulares como los genes *Mucin-17-like isoform X2*, *Vesicle transport protein USE1* y miosinas no convencionales. Es interesante indicar que *Mucin 17 like* y las mucinas en general se encuentran en las superficies epiteliales donde son los componentes dominantes de la proteína del mucus, protegiendo la

superficie de los órganos luminales (Malmberg, *et al.*, 2008). No existe bibliografía referente a esta proteína en específico para especies salmonídeas, pero mantener la homeostasis de las mucosas se consideraría relevante en la transmisión de este y otros patógenos.

Por otro lado, dos genes implicados en la inmunidad propiamente tal del individuo, como son *Sphingosine 1-phosphate receptor 4 (S1P4)* y *Secretory phospholipase A2 receptor-like (sPLA2-IB)* se han identificado en scaffolds asociados a SNPs significativos a nivel de cromosoma. El primero se encuentra involucrado en los procesos de alteraciones rápidas y transitorias en la migración y el tráfico de linfocitos, migración de mastocitos y secreción de mediadores químicos (Lee *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 2000). Las fosfolipasas A2 (sPLA2) son enzimas liberadas en plasma y fluidos extracelulares durante enfermedades inflamatorias; El sPLA2-IB induce la liberación de TNF- α e IL-6 de una manera dependiente de la concentración de sPLA2 (Granata *et al.*, 2005), estas citoquinas participan en la diferenciación de linfocitos B y activan a los linfocitos T citotóxicos, además el TNF- α participa en reclutamiento de inmunoglobulinas de vital importancia en la acción de controlar la infección.

VIII. CONCLUSIONES

La heredabilidad calculada con información genómica fue ligeramente superior a la heredabilidad calculada con información de pedigrí, puesto que al utilizar información genómica este cálculo es más preciso al utilizar información de alta resolución. Los niveles de variación genética determinados para resistencia a IPN demuestran la factibilidad de mejorar este carácter mediante selección artificial en truchas arcoíris, lo cual constituye una alternativa para el control de la enfermedad viral y el incremento en la eficiencia productiva en los sistemas de cultivo.

La resistencia al IPNV se puede describir como un rasgo oligogénico, ya que existen varios loci involucrados, cada uno con un efecto pequeño o moderado. Por lo que el mejor enfoque sería utilizando los marcadores mediante selección genómica. Estos marcadores explicaron una proporción relativamente pequeña de la varianza y heredabilidad para el rasgo y se encuentran cercanos a genes que podrían estar potencialmente involucrados en los mecanismos de resistencia frente al patógeno.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. AND LIPMAN, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25 (17), 3389–3402.
- ARIEL, E. AND OLESEN, N. J. (2002).** Finfish in aquaculture and their diseases - A retrospective view on the European Community. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22 (2), 72–85.
- AULCHENKO, YS., RIPKE, S., ISAACS, A. AND VAN DUJIN, CM. (2007).** GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics*. 10, 1294–6.
- BENJAMINI, Y. AND Y. HOCHBERG (1995).** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. 57(1), 289–300.
- BISHOP, S. C., AND WOOLLIAMS, J. A. (2014).** Genomics and disease resistance studies in livestock. *Livestock Science*, 166, 190–198.
- CALLISTER, P.E. AND OWENS, W.J. (1995).** Assessment of the virulence of fish and molluscan isolates of infectious pancreatic necrosis virus for salmonid fish by challenge of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Journal of Fish Diseases*, 18(1), 97-103.
- CORREA, K., MAASS, A., LHORENTE, J. P., LÓPEZ, M. E., BASSINI, L., NASWA, S., DEEB, N., GENOVA, A. DI., MAASS, A., DAVIDSON, W. S. AND YÁÑEZ, J. M. (2015).** Genome-wide association analysis reveals loci associated with resistance against *Piscirickettsia salmonis* in two Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) chromosomes Genome-wide association analysis reveals loci associated with resistance against *Piscirickettsia*. *BMC Genomics*, 16:854.
- CORREA, K., LHORENTE, J. P., BASSINI, L., LÓPEZ, M. E., GENOVA, A. DI, MAASS, A., DAVIDSON, W. S. AND YÁÑEZ, J. M. (2016).** Genome wide association study for resistance to *Caligus rogercresseyi* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using a 50K SNP genotyping array. *Aquaculture*.

- DANZMANN, R. G., CAIRNEY, M., DAVIDSON, W. S., FERGUSON, M. M., GHARBI, K., GUYOMARD, R., HOLM, L. E., LEDER, E., OKAMOTO, N., OZAKI, A., REXROAD III, C. E., SAKAMOTO, T., TAGGART, J. B. AND WORAM, R. A. (2005).** A comparative analysis of the rainbow trout genome with 2 other species of fish (Arctic charr and Atlantic salmon) within the tetraploid derivative Salmonidae family (subfamily: Salmoninae). *Genome*, 48(6).
- DE LOS CAMPOS, G., SORENSEN, D. AND GIANOLA, D. (2015).** Genomic Heritability: What Is It?. *PLOS Genetics*, 11(5), e1005048.
- DEKKERS, JCM. (2004).** Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *Journal of Animal Science*. 82(13): 313-328.
- DI BACCO, A., OUYANG, J., LEE, H.-Y., CATIC, A., PLOEGH, H. AND GILL, G. (2006).** The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Molecular and Cellular Biology*, 26(12), 4489–4498.
- DILCHER, M., VEITH, B., CHIDAMBARAM, S., HARTMANN, E., SCHMITT, H. D. AND VON MOLLARD, G. F. (2003).** Use1p is a yeast SNARE protein required for retrograde traffic to the ER. *EMBO Journal*, 22(14), 3664–3674.
- FALCONER, DS. AND TFC. MACKAY. (1996).** Introduction to Quantitative Genetics. 4th ed. Essex, UK.
- FAO, (2014).** The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges, Roma.
- FORNI, S., AGUILAR, I., AND MISZTAL, I. (2011).** Different genomic relationship matrices for single-step analysis using phenotypic, pedigree and genomic information. *Genetics Selection Evolution*, 43 (1):1.
- GENABEL PROJECT DEVELOPERS. (2015).** GenABEL Tutorial. DOI 10.5281/zenodo.19738.
- GHEYAS, A.A., HALEY, C.S., GUY, D.R., HAMILTON, A., TINCH, A.E., MOTA-VELASCO, J.C. AND WOOLLIAMS, J.A. (2010).** Effect of a major QTL affecting IPN resistance on production traits in Atlantic salmon. *Animal genetics*, 41(6), 666-668.

- GJEDREM, T., R. SALTE AND HM. GJØEN. (1991).** Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture* 97, 1-6.
- GJEDREM, T. AND HM. GJØEN. (1995).** Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to furunculosis, BKD, and cold- water vibriosis. *Aquaculture Research*. 26, 129-134.
- GJEDREM, T. (2000).** Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research*. 31, 25-33.
- GJEDREM, T., ROBINSON, N., AND RYE, M. (2012).** The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture*. 350, 117-129.
- GJØEN, H. M., REFSTIE, T., ULLA, O., AND GJERDE, B. (1997).** Genetic correlations between survival of Atlantic salmon in challenge and field tests. *Aquaculture*, 158(3-4), 277–288.
- GODDARD, M. E., AND HAYES, B. J. (2009).** Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Reviews Genetics*, 10 (6), 381–391.
- GONG, L., AND YEH, E. T. H. (2006).** Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15869–15877.
- GRANATA, F., PETRAROLI, A., BOILARD, E., BEZZINE, S., BOLLINGER, J., DEL VECCHIO, L., GELB, M. H., LAMBEAU, G., MARONE, G., AND TRIGGIANI, M. (2005).** Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *Journal of Immunology*, 174(1), 464–474.
- GUY, D.R., S.C. BISHOP, S. BROTHERSTONE, A. HAMILTON, R.J. ROBERTS, B.J. MCANDREW AND J.A. WOOLLIAMS. (2006).** Analysis of the incidence of infectious pancreatic necrosis mortality in pedigreed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., populations. *Journal of Fish Diseases*. 29: 637–647.
- GUY, D.R., BISHOP, S.C., WOOLLIAMS, J.A. AND 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(3), 229-235.

- HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C. AND THURSTON, R.V., (1977).** Trimmed Spearman–Kärbermethod for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*. 11, 714–719.
- HAYES, B. AND GODDARD M. (2010).** Genome-wide association and genomic selection in animal breeding. *Genome*. 53:876–83.
- HOUSTON, R. D., HALEY, C. S., HAMILTON, A., GUY, D. R., TINCH, A. E., TAGGART, J. B. AND BISHOP, S. C. (2008).** Major Quantitative Trait Loci Affect Resistance to Infectious Pancreatic Necrosis in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Genetics* 178: 1109–1115.
- HOUSTON, R. D., HALEY, C. S., HAMILTON, A., GUY, D. R., MOTA-VELASCO, J. C., GHEYAS, A. A., AND BISHOP, S. C. (2010).** The susceptibility of Atlantic salmon fry to freshwater infectious pancreatic necrosis is largely explained by a major QTL. *Heredity*, 105 (3), 318–327.
- HOUSTON, R. D., DAVEY, J. W., BISHOP, S. C., LOWE, N. R., MOTA-VELASCO, J. C., HAMILTON, A., AND TAGGART, J. B. (2012).** Characterisation of QTL-linked and genome-wide restriction site-associated DNA (RAD) markers in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics*, 13 (1), 1.
- HOUSTON, R. D., TAGGART, J. B., CÉZARD, T., BEKAERT, M., LOWE, N. R., DOWNING, A. AND HAMILTON, A. (2014).** Development and validation of a high density SNP genotyping array for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 15, 90.
- KJØGLUM, S., LARSEN, S., BAKKE, HG., AND GRIMHOLT, U. (2006).** How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*, 21:431-441.
- KJØGLUM, S., HENRYON, M., AASMUNDSTAD, T. AND KORSGAARD, I. (2008).** Selective breeding can increase resistance of Atlantic salmon to furunculosis, infectious salmon anaemia and infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture Research*, 39(5), 498-505.

- KONG, R., YI, F., WEN, P., LIU, J., CHEN, X., REN, J., LI, X., SHANG, Y., NIE, Y., WU, K., FAN, D., ZHU, L., FENG, W., AND WU, J. Y. (2015).** Myo9b is a key player in SLIT / ROBO-mediated lung tumor suppression. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(12), 1–14.
- KORTE, A., AND FARLOW, A. (2013).** The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*. 9:29.
- MALMBERG, E. K., PELASEYED, T., SA, Å., AND PETERSSON. (2008).** The C-terminus of the transmembrane mucin MUC17 binds to the scaffold protein PDZK1 that stably localizes it to the enterocyte apical membrane in the small intestine. *Biochemistri Journal*, 410, 283–289.
- MARTINEZ, P. (2012).** Genómica y Acuicultura: aplicaciones para la mejora de la producción de rodaballo. *Revista AquaTIC*, nº 37, pp. 16-19.
- MIKALSEN, A. B., TORGERSEN, J., ALESTRÖM, P., HELLEMANN, A.-L., KOPPANG, E.-O. AND RIMSTAD, E. (2004).** Protection of atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60 (1), 11–20.
- MOEN, T., BARANSKI, M., SONESSON, A. K. AND KJØGLUM, S. (2009).** Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics*, 10, 368.
- MOEN, T., TORGERSEN, J., SANTI, N., DAVIDSON, W. S., BARANSKI, M., ØDEGÅRD, J. AND LIEN, S. (2015).** Epithelial cadherin determines resistance to infectious pancreatic necrosis virus in atlantic salmon. *Genetics*, 200 (4), 1313–26.
- NORDMO, R., SEVATDAL, S. AND RAMSTAD, A., (1997).** Experimental infection with *Vibrio salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar*): an evaluation of three different challenge methods. *Aquaculture*, 158, 23–32.
- LANDER, ES: (1996).** The new genomics: global views of biology. *Science* 274:536–539.

- LEE, M.-J., VAN BROCKLYN, J. R., THANGADA, S., LIU, C. H., HAND, A. R., MENZELEEV, R., SPIEGEL, S., AND HLA, T. (1998).** Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science*, 279(5356), 1552–1555.
- LI, C. C. AND HORVITZ, D. G. (1953).** Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*, 5(2): 107–117.
- LOBERG, A., DÜRR, J. W., FIKSE, W. F., JORJANI, H., AND CROOKS, L. (2015).** Estimates of genetic variance and variance of predicted genetic merits using pedigree or genomic relationship matrices in six Brown Swiss cattle populations for different traits. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 132(5), 376–385.
- OBOS, P. AND ROBERTS, T.E. (1983).** The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 29 (4): 377-384.
- OKAMOTO, N., TAYAMA, T., KAWANOBE, M., FUJIKI, N., YASUDA, Y. AND SANO, T. (1993).** Resistance of a rainbow trout strain to infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture*, 117(1), 71-76.
- OZAKI, A, SAKAMOTO, T., KHOO, S., NAKAMURA, K., COIMBRA, M. R., AKUTSU, T., AND OKAMOTO, N. (2001).** Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Genetics and Genomics*, 265(1), 23–31.
- OZAKI, A., KHOO, SK., YOSHIURA, Y., OTOTAKE, M., SAKAMOTO, T., DIJKSTRA, JM. AND OKAMOTO, N. (2007).** Identification of Additional Quantitative Trait Loci (QTL) Responsible for Susceptibility to Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Rainbow Trout. *Molecular Genet Genomics* 265: 23-31.
- ØDEGÅRD, J., BARANSKI, M., GJERDE, B. AND GJEDREM, T. (2011).** Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: Challenges and future prospects. *Aquaculture Research*, 42 (SUPPL. 1), 103–114.

- ØDEGÅRD, J., MOEN, T., SANTI, N., KORSVOLL, S. A., KJØGLUM, S. AND MEUWISSE, T. H. E. (2014).** Genomic prediction in an admixed population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Genetics*, 5, 1–8.
- PALTI, Y., GENET, C., GAO, G., HU, Y., YOU, F. M., BOUSSAHA, M., REXROAD III, C. E. AND LUO, M. C. (2012).** A Second Generation Integrated Map of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Genome: Analysis of Conserved Synteny with Model Fish Genomes. *Marine Biotechnology*, 14(3), 343–357.
- PALTI, Y., GAO, G., LIU, S., KENT, M. P., LIEN, S., MILLER, M. R. AND MOEN, T. (2015).** The development and characterization of a 57K single nucleotide polymorphism array for rainbow trout. *Molecular Ecology Resources*, 15 (3), 662–672.
- PINTO, M. P., CARVALHO, A. F., GROU, C. P., RODRÍGUEZ-BORGES, J. E., SÁ-MIRANDA, C., AND AZEVEDO, J. E. (2012).** Heat shock induces a massive but differential inactivation of SUMO-specific proteases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(10), 1958–1966.
- POST, P. L., BOKOCH, G. M., AND MOOSEKER, M. S. (1998).** Human myosin-IXb is a mechanochemically active motor and a GAP for rho, *Journal of Cell Science*. 111 (7): 941-50
- PHILLIPS, R. B., KEATLEY, K. A., MORASCH, M. R., VENTURA, A. B., LUBIENIECKI, K. P., KOOP, B. F., DANZMANN, R. G. AND DAVIDSON, W. S. (2009).** ASSIGNMENT OF ATLANTIC SALMON (**SALMO SALAR**). linkage groups to specific chromosomes: Conservation of large syntenic blocks corresponding to whole chromosome arms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genetics*, 11, 1–11.
- RAMSTAD, A. AND MIDTLYNG, P. J. (2008).** Strong genetic influence on IPN vaccination-and-challenge trials in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 31 (8), 567–578.
- ROBERTS, R.J. AND MD. PEARSON (2005).** Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*. 28: 383–390.

- SAKAMOTO, T., DANZMANN, R. G., GHARBI, K., HOWARD, P., OZAKI, A., SOKKERAN, K., WORAM, R. A., OKAMOTO, N., FERGUSON, M. M., IHSEN, P. E., HOLM, L. E., GUYAMARD, R. AND HOYHEIM, B. (2000).** A microsatellite linkage map of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex – specific differences in recombination rates. *Genetics*, 155(3):1331-45
- SERNAPESCA, (2015).** Informe Sanitario de Salmonicultura en Centros Marinos. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Departamento de sanidad pesquera. 1–36. Chile.
- SMITH, P., J. LARENAS, P. VERA, J. CONTRERAS, C. VENEGAS, ME. ROJAS, AND A. GUAJARDO. (2001).** Principales enfermedades de los peces salmonídeos cultivados en Chile. Monografías de Medicina Veterinaria 21, 3-19.
- SONESSON, A. K. (2005).** Possibilities for marker-assisted selection in aquaculture breeding schemes, pp 309–328 in Marker-Assisted Selection: Current Status and Future Application in Crops, Livestock, For- estry and Fish, edited by E. P. Guimara es, J. Ruane, B. D. Scherf, A. Sonnino and J. D. Dargie. FAO, Rome.
- STORSET, A., STRAND, C., WETTEN, M., KJØGLUM, S. AND RAMSTAD, A. (2007).** Response to selection for resistance against infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 272, S62-S68.
- TORO, M., BARRAGÁN, C., ÓVILO, C., RODRIGÁÑEZ, J., RODRIGUEZ, C. (2002).** Estimation of coancestry in Iberian pigs using molecular markers. *Conservation Genetics*, 3: 309–320.
- TSAI, H., HAMILTON, A., TINCH, A. E., GUY, D. R., GHARBI, K., STEAR, M. J., MATIKA, O., BISHOP, S. C. AND HOUSTON, R. D. (2015).** Genome wide association and genomic prediction for growth traits in juvenile farmed Atlantic salmon using a high density SNP array. *BMC Genomics*, 1–9.
- TSAI, H. Y., HAMILTON, A., TINCH, A. E., GUY, D. R., BRON, J. E., TAGGART, J. B., GHARBI, K., STEAR, M., MATIKA, O., PONG-**

- WONG, R., BISHOP, S. C. AND HOUSTON, R. D. (2016).** Genomic prediction of host resistance to sea lice in farmed Atlantic salmon populations. *Genetics Selection Evolution*, 1–11.
- VIGNAL, A., MILAN, D. AND SANCRISTOBAL, M. (2002).** A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics, selection, evolution*, 34:275–305.
- WETTEN, M., AASMUNDSTAD, T., KJØGLUM, S. AND STORSET, A. (2007).** Genetic analysis of resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 272(1), 111-117.
- YAMAZAKI, Y., KON, J., SATO, K., TOMURA, H., SATO, M., YONEYA, T., OKAZAKI, H., OKAJIMA, F., AND OHTA, H. (2000).** Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca(2+) signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(2), 583–589.
- YÁÑEZ, J. M. AND MARTÍNEZ, V. (2010).** Genetic factors involved in resistance to infectious diseases in salmonids and their application in breeding programmes. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42 (February 2016), 1–13.
- YÁÑEZ, J. M., NASWA, S., LÓPEZ, M. E., BASSINI, L., CABREJOS, M. E., GILBEY, J. AND DEEB, N. (2014).** Development of a 200K SNP Array for Atlantic Salmon : Exploiting across continents genetic variation. 10th world congress of genetics applied to livestock production development, (February 2016).
- YÁÑEZ, J. M., NEWMAN, S. AND HOUSTON, R. D. (2015).** Genomics in aquaculture to better understand species biology and accelerate genetic progress. *Frontiers in Genetics*, 6 (February 2016), 128.
- ZHI-LIANG, HU., CARISSA, A. PARK AND JAMES, M. R. (2016).** Developmental progress and current status of the Animal QTLdb. *Nucleic Acids Research*, 44 (D1): D827-D833.