

UNIVERSIDAD DE CHILE



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POST TÍTULO**

**DETERMINACIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA
RESISTENCIA AL PIOJO DE MAR (*CALIGUS
ROGERCRESSEY*) UTILIZANDO GENÓMICA
COMPARATIVA EN SALMÓN DE ATLÁNTICO (*SALMO
SALAR*) Y TRUCHA ARCOÍRIS (*ONCORHYNCHUS
MYKISS*).**

PABLO ANDRÉS CÁCERES REFUSTA

**Tesis para optar al
Grado de Magíster en
Ciencias Animales y Veterinarias**

SANTIAGO, CHILE

2019

UNIVERSIDAD DE CHILE



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POST TÍTULO**

**DETERMINACIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA
RESISTENCIA AL PIOJO DE MAR (*CALIGUS
ROGERCRESSEYI*) UTILIZANDO GENÓMICA
COMPARATIVA EN SALMÓN DE ATLÁNTICO (*SALMO
SALAR*) Y TRUCHA ARCOÍRIS (*ONCORHYNCHUS
MYKISS*).**

PABLO ANDRÉS CÁCERES REFUSTA

**Tesis para optar al
Grado de Magíster en
Ciencias Animales y Veterinarias**

PROFESOR GUÍA: DR. JOSÉ MANUEL YÁÑEZ

SANTIAGO, CHILE

2019

Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Genética y Genómica Acuícola, del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y contó con financiamiento **Research Council UK- CONICYT, Research Partnership Call.**
(MR/N026144/1)

Agradecimientos

Primero que todo quisiera agradecer a mis padres, Carolina y Carlos, quienes en todo momento me apoyaron y fueron fundamentales en cada etapa de mi crecimiento. A mis hermanos Carlos y Carolina, quienes me acompañaron en esta aventura. A mi Tío Pato, quien ha sido fundamental para lograr mis metas y me ha incentivado a continuar este camino.

Un especial agradecimiento a Andrea, mi pareja, compañera, amiga y gran amor. Has vivido conmigo todo el proceso, con sus altos y bajos. Has trasnochado conmigo, como también me aguantaste el trabajar hasta tarde en la casa. Sin ti no habría avanzado cómo lo hice y lograr este magister hubiese sido aún más complicado. Eres fundamental en mi vida y este logro es para ti también. Quiero agradecer a Juan Pony, quien viene en camino, pero no menos importante, que se ha convertido en un motor para seguir avanzando y me impulsa a apuntar hacia lo más alto. A mis amigos, Andrés (ambos), Carlos, Juanjo, Diego, quienes desde de sus maneras, han estado presentes en cada locura que se me ocurre realizar.

Un gran agradecimiento al Dr. José Manuel Yáñez, por creer en mí y presionar para que este proyecto se concretara y sea una plataforma para el futuro. Para Agustín, que me enseñó todo lo necesario y mucho más, para realizar los análisis y escribir esta tesis. Para mis compañeros del Laboratorio de Genética Acuícola, en especial a Carolina, con quien entramos juntos al programa y hemos estado apoyando al otro en cada etapa.

Gracias a la Facultad, que me entregó las herramientas y conocimientos, han sido muchos años que me he desarrollado acá con lo cual he sido formado como profesional y persona.

A todos,

¡MUCHAS GRACIAS!

Pablo Cáceres Refusta

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	Introducción	1
2.	Revisión Bibliográfica.....	2
2.1	Situación de la acuicultura en Chile	2
2.2	El piojo de mar y su impacto en la acuicultura	2
2.3	Mejoramiento Genético de la resistencia al piojo de mar	4
2.4	Marcadores moleculares (SNPS).....	5
2.5	Genómica comparativa	6
2.6	Estudios de Asociación de genoma completo (GWAS) para resistencia a piojo de mar	6
3.	Objetivos.....	9
3.1	Objetivo General	9
3.2	Objetivos específicos	9
4.	Hipótesis de trabajo	9
5.	Materiales y Métodos.....	10
5.1	Trucha Arcoíris	10
5.2	Salmón del Atlántico	10
5.3	Definición de rasgos y análisis de asociación genómica (GWAS)	12
5.4	Genotipado	13
5.5	BLUP Genómico	13
5.6	Genes Candidatos	14
5.7	Genómica comparativa	15
5.8	Aprobación ética y consentimiento para participar	16
6.	Resultados.....	17
6.1	Fenotipos y control de calidad de genotipos	17
6.2	Estudio de genoma completo (GWAS).....	18
6.3	Genes candidatos	21
6.4	Genómica comparativa	23
7.	Discusión	25
7.1	Desafío experimental	25
7.2	Estudio de Asociación de Genoma Completo (GWAS)	26
7.3	Genómica comparativa	26
7.4	Genes candidatos	27
8.	Conclusión.....	30

9. Anexos	32
10. Bibliografía.....	35

Índice de Tablas

Tabla 1. Resumen de estadísticas para peso corporal (BW) y conteo de parásito (LC) en ambas especies.....	17
Tabla 2. Estimaciones de varianza genética aditiva, varianza residual y heredabilidad (h^2) para el rasgo de LogLD en ambas especies.....	18
Tabla 3. Ventanas de 20 SNP adyacentes explicando más de un 1% de la varianza genética para la resistencia a <i>Caligus rogercresseyi</i> en salmón del Atlántico y trucha arcoíris.....	20
Tabla 4. Genes identificados como candidatos explicando la resistencia a <i>Caligus rogercresseyi</i> en salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>).....	21
Tabla 5. Genes identificados como candidatos explicando la resistencia a <i>Caligus rogercresseyi</i> en trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	22

Índice de ayuda ilustrativa

Figura 1. Diagrama de proceso de desafío de peces frente al parásito, para la genotipificación y fenotipificación.....	11
Figura 2. Histograma para Log densidad de caligus (LogLD) para <i>S. salar</i> (verde) y <i>O. mykiss</i> (naranja).....	12
Figura 3. Manhattan <i>plot</i> de GBLUP ponderado de un solo paso (wssGBLUP) para el rasgo de resistencia a <i>Caligus rogercresseyi</i> dado como logaritmo de densidad de parásito en salmón del Atlántico (A) y trucha arcoíris (B). La línea azul indica el umbral definido por el 1% de la varianza genética explicada por los marcadores.....	19
Figura 4. Circos <i>plot</i> de sintenia para los cromosomas albergando regiones explicando sobre un 1% de la resistencia al piojo de mar en salmón del Atlántico y trucha arcoíris.....	24

Índice de abreviaturas

QTL: Loci de rasgos cuantitativos

MAS: Selección asistida por marcador

h^2 : Heredabilidad

SNP: Polimorfismo de nucleótido único.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

GWAS: Estudio de análisis de genoma completo

NGS: Secuenciación de próxima generación

PIT-tag: Transpondedor Integrado Pasivo

LC: Conteo de piojo de mar

LD: Densidad de piojo de mar

BW: Peso corporal

LogLD: Logaritmo de densidad de piojo de mar

GBLUP: Mejor predicción lineal genómica no sesgada

ssGBLUP: Mejor predicción lineal genómica no sesgada de un solo paso

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local

USDA: Departamento de agricultura de Estados Unidos

Ssa: Cromosoma de *Salmo salar*

Omy: Cromosoma de *Oncorhynchus mykiss*

GO: Ontología Genómica

Resumen

Los piojos de mar (*Caligus rogercresseyi*) son los ectoparásitos que causan las mayores pérdidas productivas en la industria de la acuicultura, especialmente en Chile. El salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) son las especies de salmónidos más susceptibles a su infestación, una situación que ha promovido la búsqueda de estrategias para resolver el problema. Este estudio tiene como objetivo determinar genes candidatos en el salmón del Atlántico y la trucha arcoíris que pueden participar en el mecanismo de resistencia contra el piojo de mar, y determinar la ortología entre los genes obtenidos en ambas especies. Para esto, 2.626 individuos de salmón del Atlántico y 2.643 de trucha arcoíris de poblaciones comerciales fueron desafiados con piojos de mar y se les realizó un genotipado con un panel de SNP 50k. Se obtuvieron heredabilidades moderadas a bajas con valores de 0,19 para *S. salar* y 0,08 para *O. mykiss* para el logaritmo de la densidad del caligus (como medida de resistencia del huésped). Mediante un estudio de asociación genómica identificamos una serie de genes presentes en las regiones genómicas asociadas al carácter en ambas especies, tales como *Serine/threonine kinase* y *Tripartite motif-containing protein 16-like*. El análisis de ortología nos permitió identificar *dust8* y *dust10* como genes que participan en la respuesta inmune activando los leucocitos, favoreciendo la migración, como también al receptor de ácido lisofosfatídico junto a un receptor acoplado a proteína G los cuales pertenecen a regiones sinténicas asociadas al carácter en ambas especies. Este es un primer enfoque para comprender los genes involucrados en la resistencia contra el piojo de mar utilizando genómica comparativa en salmónidos. Sin embargo, se necesitan investigaciones adicionales en ambas especies para validar los genes identificados como candidatos.

Palabras clave: *Caligus rogercresseyi*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, Acuicultura, GWAS, Genes candidatos, Genómica comparativa.

Abstract

Sea lice (*Caligus rogercresseyi*) are the ectoparasites that cause the greatest productive losses in the aquaculture industry, especially in Chile. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are the salmonid species most susceptible to their infestation, a situation that has promoted the search for strategies to solve the problem. This study aims to determine candidate genes in Atlantic salmon and rainbow trout that can participate in the mechanism of resistance against sea lice, and determine the orthology between the genes obtained in both species. For this, 2,626 individuals of Atlantic salmon and 2,643 of rainbow trout from commercial populations were challenged with sea lice and genotyped with a SNP 50k panel. Moderate to low heritabilities were obtained with values of 0.19 for *S. salar* and 0.08 for *O. mykiss* for the logarithm of sea lice density (as a measure of host resistance). By means of a study of genomic association we identified a series of genes present in the genomic regions associated with the character in both species, such as Serine / threonine kinase and Tripartite motif-containing protein 16-like. The orthology analysis allowed us to identify *dust8* and *dust10* as genes that participate in the immune response activating the leukocytes, favoring migration, as well as the lysophosphatidic acid receptor together with a G protein-coupled receptor which belong to syntenic regions associated with the character in both species. This is a first approach to understand the genes involved in resistance against sea lice using comparative genomics in salmonids. However, additional research is needed in both species to validate the genes identified as candidates.

Keywords: *Caligus rogercresseyi*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*,

Aquaculture, GWAS, Candidate Gene, Comparative Genomics.

1. Introducción

La acuicultura es la industria primaria de más rápido crecimiento para la producción de proteína animal, con una tasa de crecimiento del 6% al 7% por año (FAO, 2016). Dentro de la acuicultura mundial, una de las principales actividades es la producción de salmónidos, la cual genera un elevado retorno económico además de ser de gran foco de importancia para la seguridad alimentaria (FAO, 2016). En esa línea, la producción a gran escala se ve afectada por diversos factores que pueden impactar la rentabilidad de los sistemas acuícolas, tales como agentes infecciosos, así como también parasitarios, siendo uno de los más relevantes en Chile el piojo de mar (*Caligus rogercresseyi*) (Bravo *et al.*, 20014).

En relación a ello, se han buscado métodos que apunten a disminuir las pérdidas en la industria. Uno de ellos ha sido el mejoramiento genético, el cual ha sido ampliamente aplicado a especies de ganadería y acuicultura, buscando incrementar la rentabilidad de los sistemas productivos, por lo que las características de importancia económica son elementos que están incluidos en el objetivo de mejoramiento. Es por esto que se consideran caracteres relacionados con el crecimiento corporal, color y textura de la carne, siendo incorporado en las últimas décadas, dentro del objetivo de selección, la resistencia genética a enfermedades infecciosas y parasitarias (Gjedrem, 2015).

En relación a lo anterior, estudios recientes han permitido estimar heredabilidades significativas frente al rasgo de resistencia a piojo de mar en *Salmo salar* (Correa *et al.*, 2015; Ødegård *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2016), y en trucha arcoíris (Bassini *et al.*, 2017). Sin embargo, las variantes genéticas y genes que explican la variación en la resistencia frente a piojo de mar en salmónidos, permanecen relativamente desconocidas hasta ahora.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Situación de la acuicultura en Chile

En los últimos años la acuicultura ha desempeñado un papel cada vez más importante en la producción mundial de alimentos y se espera que esta tendencia continúe (Chavanne *et al.*, 2016; FAO, 2016). En el caso de Chile, la industria del salmón comenzó a establecerse a principios de 1980, creciendo rápidamente y transformando al país en uno de los principales productores de salmón del mundo. A mediados del 2018, la cosecha de salmón del Atlántico alcanzó las 424 mil toneladas, mientras que para trucha arcoíris alcanzó un estimado de 50 mil toneladas (Sernapesca, 2018).

Constantemente se ha buscado mejorar la eficiencia económica en la industria de la salmonicultura, la cual depende en gran medida de la prevención y control de enfermedades infecciosas y parasitarias (Asche & Roll, 2013), por lo que es imprescindible desarrollar estrategias eficaces y sostenibles para enfrentar estas patologías en el tiempo (Yáñez *et al.*, 2014).

Actualmente, los programas de mejoramiento genético en Chile buscan realizar selección por rasgos de ganancia de peso, color de la carne y resistencia a enfermedades, lo que indica que existe interés de la industria en avanzar en esta área (Barría *et al.*, 2018).

2.2 El piojo de mar y su impacto en la acuicultura

Lepeophtheirus salmonis y *Caligus rogercresseyi* son las dos especies de parásitos más perjudiciales para la cría de salmón a nivel mundial (Costello, 2009). En Chile, la especie *Caligus rogercresseyi*, fue descrita en 1997 por Boxshall & Bravo (2000), y es el principal parásito que afecta a salmónidos en el país. Las pérdidas económicas son el resultado de la reducción de la conversión alimenticia, el

crecimiento de los peces, la mortalidad indirecta, pérdida de valor del producto y los costos de tratamiento. El costo mundial del control de este parásito en la industria salmonera se estimó en US \$ 178 millones (Costello, 2009).

En consideración de lo anterior, es importante tener presente el ciclo de vida del piojo de mar, el cual está constituido por ocho etapas de desarrollo (Carvajal, Gonzalez, & George-nascimento, 1998), dos estados de nauplios, un estado copépodo, cuatro estados chalimus y el estado adulto. Las etapas de nauplio (n1-2) y la etapa de copépodos (etapa infecciosa) son etapas planctónicas. Por su parte, las cuatro etapas de chalimus (1-4) son etapas sésiles, dando paso, finalmente, al estado adulto, la cual corresponde a una etapa móvil (Lhorente *et al.*, 2012). Tanto las etapas fijas de chalimus como los piojos adultos causan daños graves en la piel del huésped, y constituyen una amenaza para la salud del salmón criado en agua de mar en Chile (Bravo *et al.*, 2014; Carvajal *et al.*, 1998). Se ha observado que el piojo de mar afecta primariamente al salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), mientras que el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) presenta resistencia a este parásito (Hamilton-West *et al.*, 2012).

Los piojos de mar pueden causar lesiones en la piel, desequilibrio osmótico y mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas y virales a través de la supresión de las respuestas inmunitarias por el daño a la piel del huésped (Correa *et al.*, 2017). Además, Lhorente *et al.*,(2012) demostró que el piojo de mar reduce significativamente la resistencia del salmón del Atlántico ante la infección por parte de la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. Esto explica la frecuente asociación entre ambos patógenos, los cuales constituyen los dos principales agentes patogénicos para el salmón cultivado en Chile (Bravo *et al.*, 2014; Sernapesca, 2018).

Tradicionalmente, la investigación sobre el piojo de mar se ha centrado en la comprensión de la biología y la efectividad de los agentes quimioterapéuticos utilizados para su control (Bravo *et al.*, 2014); incluyendo variadas alternativas farmacológicas para controlar este parásito, como la emamectina benzoato (EMB), deltametrina, cipermetrina, diflubenzuron y azamethiphos, que son los productos químicos autorizados para su uso en Chile (Sernapesca, 2018). Sin embargo, la

falta de especificidad y efectividad de estos es una preocupación para la sostenibilidad de la acuicultura (Weis *et al.*, 2010), la cual busca disminuir la cantidad de antiparasitarios utilizados.

Entre 1999 y 2007, el piojo de mar fue controlado exclusivamente con EMB en Chile. Sin embargo, después de 8 años de tratamientos químicos, se determinó la pérdida de eficacia de EMB (Bravo *et al.*, 2013), dado que el parásito desarrolló mecanismos de resistencia contra este fármaco (Valenzuela *et al.*, 2016), significando el fracaso de los tratamientos con EMB asociados a la pérdida de sensibilidad para *C. rogercresseyi*, registrado desde 2005 (Bravo *et al.*, 2013).

2.3 Mejoramiento Genético de la resistencia al piojo de mar

Debido a lo planteado anteriormente, es necesario buscar alternativas para controlar al piojo de mar. La selección a la resistencia a enfermedades es una estrategia utilizada para mejorar la salud, la productividad y la sostenibilidad en la producción acuícola (Bishop *et al.*, 2014; Yáñez, *et al.*, 2014).

La resistencia a enfermedades puede ser definida como la habilidad de un huésped a limitar una infección mediante la reducción de la replicación del patógeno (Yáñez *et al.*, 2014), por lo que el seleccionar animales con mayor resistencia a patógenos puede significar en un incremento en la productividad y bienestar animal, cómo también ofrecer ventajas sobre otros métodos usados para combatir enfermedades (Bishop & Woolliams, 2014).

De acuerdo a ello, el mejoramiento genético se ha propuesto como una opción factible para potenciar la resistencia a enfermedades en varias especies de interés para la acuicultura (Barría *et al.*, 2018; Correa *et al.*, 2017). Asimismo, es de gran interés en el ámbito científico el conocer los genes involucrados con alguna característica de interés, tal como la resistencia a enfermedades.

Para este estudio, es necesario delimitar el término “gen”, ya que existe una variedad de definiciones en torno a este concepto, por lo que para efectos de esta investigación se utilizará la siguiente definición: “Un gen es una secuencia de ADN (cuyos segmentos componentes no necesariamente tienen que ser físicamente contiguos) que especifica uno o más ARN relacionados con la secuencia” (Portin & Wilkins, 2017), lo cual se puede o no traducir en proteínas. Por lo que un “gen” podría estar vinculado con el rasgo buscado, puede o no ser codificante y a su vez puede pertenecer al mismo espacio físico en un cromosoma, como necesitar de secuencias de ADN que estén dispuestas en sectores distantes entre ellos.

2.4 Marcadores moleculares (SNPS)

Los SNP (polimorfismos de nucleótidos único) corresponden a variantes causadas por la mutación de un solo nucleótido en un locus específico en la secuencia de DNA. Los SNP son marcadores moleculares muy abundantes que se distribuyen uniformemente en los genomas de todas las especies. La naturaleza bialélica de los marcadores SNP los hace menos informativos que los microsatélites, pero esta desventaja se supera por su gran abundancia, la robustez y automatización de los ensayos de genotipificación de SNP de alto rendimiento (Palti *et al.*, 2015).

Dado el desarrollo de la investigación en genómica de salmónidos, recientemente se ha producido un rápido aumento en los SNP disponibles para estas especies, principalmente para el salmón del Atlántico y la trucha arcoíris (Goddard & Hayes, 2007; Hohenlohe *et al.*, 2011; Houston *et al.*, 2014; Yáñez *et al.*, 2014; Lien *et al.*, 2011; Palti *et al.*, 2015). Recientemente, se han publicado las secuencias de referencia del genoma de trucha arcoíris (Berthelot *et al.*, 2014) y salmón del Atlántico (Liu *et al.*, 2017). Además, se han desarrollado paneles de genotipado SNP de alta densidad para ambas especies (Houston *et al.*, 2014; Yáñez *et al.* 2014; Palti *et al.*, 2015). Estos paneles de SNPs permitirán la realización de estudios de análisis de genoma completo (GWAS) y mejoramiento genético basado en la selección genómica en estas especies salmónidas (Abdelrahman *et al.*, 2017).

2.5 Genómica comparativa

El enfoque genómico comparativo (Hardisson, 2013) permite identificar similitudes genómicas entre especies evolutivamente distantes, como genes conservados entre ellas, los rastros de duplicación del genoma o comparar la funcionalidad de los genes en diferentes especies (Fang *et al.*, 2010). Una aproximación, mediante estudio de asociación de genoma completo (GWAS) en especies relacionadas, permitiría identificar marcadores moleculares que pueden estar relacionados con la característica de interés ambas especies. Los marcadores asociados se podrían evaluar desde el punto de vista de la sintenia y ortología de los genes cercanos. Los estudios que han comparado estas salmón del Atlántico y trucha arcoíris se han centrado principalmente en encontrar similitudes evolutivas, el crecimiento relacionado con QTL o la diferenciación sexual (Moghadam *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2005; Woram *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta la fecha, no hay estudios dirigidos a comparar las regiones genómicas asociadas con la resistencia a enfermedades parasitarias en salmónidos.

2.6 Estudios de Asociación de genoma completo (GWAS) para resistencia a piojo de mar

La asociación entre un genotipo específico y el fenotipo de resistencia puede permitir la identificación de genes asociados con un carácter en específico e identificar las proteínas codificadas por estos (Liu *et al.*, 2017). Avances recientes en técnicas de biología molecular, como la secuenciación de próxima generación (NGS) y los métodos de genotipado de alto rendimiento, han ayudado a identificar variantes genéticas que influyen en la variación fenotípica de diferentes rasgos en una amplia gama de organismos (Goddard & Hayes, 2009).

De esta forma, sería posible identificar la base genética de la resistencia a piojo de mar mediante el uso de estudios de asociación de genoma completo (GWAS), donde un grupo de individuos son fenotipados para la característica de interés, como, por ejemplo, cantidad de parásitos adheridos. A su vez, los peces son genotipados utilizando un panel denso de SNP, con lo cual se puede analizar la asociación entre los marcadores y el rasgo de interés por medio de herramientas bioinformáticas (Goddard & Hayes, 2009).

Debido al aumento de la disponibilidad de paneles densos de SNP para especies salmónidas, se han realizado diversos estudios relacionados con rasgos productivos, incluyendo la resistencia a agentes patógenos (Barría *et al.*, 2018; Correa *et al.*, 2017; Tsai *et al.*, 2016), así como también como para rasgos de color y calidad de carcasa (Gonzalez-Pena *et al.*, 2016).

También, se han realizado GWAS para determinar las regiones genómicas involucradas con características de crecimiento en especies acuícolas, incluido el salmón del Atlántico (Gutiérrez *et al.*, 2015; Tsai *et al.*, 2015; Yoshida *et al.*, 2017), la trucha arcoíris (González-Pena *et al.*, 2016) y el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Li *et al.*, 2018), respectivamente.

Existen estudios previos en los cuales se utiliza GWAS para evaluar rasgos de resistencia, como por ejemplo, el realizado por Ødegård *et al.*,(2014), donde analizan por medio de GWAS utilizando como rasgo de resistencia el logaritmo de la densidad de la carga de *C. rogercresseyi* en salmón del Atlántico, se obtuvo h^2 de 0.13, mientras que Tsai *et al.*,(2016) utilizando los mismos rasgos de resistencia, obtuvo h^2 de 0.22 y 0.33, en una población de salmón del Atlántico. A su vez, Correa *et al.*,(2015), realizando un estudio de asociación genómica con un panel de 50.000 SNP, describe la presencia de un marcador asociado a resistencia a *C. rogercresseyi* en el cromosoma 21 en salmón del Atlántico.

El presente estudio tiene como objetivo determinar genes candidatos relacionados con la resistencia al parásito *Caligus rogercresseyi*, tanto en trucha arcoíris como en salmón del Atlántico, mediante un enfoque de genómica comparativa en tres

niveles: GWAS para determinar genes candidatos ambas especies, identificar sintenia entre las regiones asociadas en ambas especies y determinación genes que codifiquen a proteínas ortólogas que puedan participar en la resistencia a *C. rogercresseyi* en ambas especies.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar genes candidatos para resistencia a *Caligus rogercresseyi* utilizando GWAS y genómica comparativa en salmón de Atlántico y trucha arcoíris.

3.2 Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Identificar regiones genómicas asociadas a la resistencia a *Caligus rogercresseyi* en trucha arcoíris y salmón del Atlántico.

Objetivo específico 2: Determinar genes ortólogos relacionados con resistencia a *Caligus rogercresseyi* presentes entre salmón del Atlántico y trucha arcoíris.

4. Hipótesis de trabajo

Existen regiones genómicas asociadas a resistencia contra *Caligus rogercresseyi* en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) las cuales contienen genes ortólogos entre ambas especies.

5. Materiales y Métodos

5.1 Trucha Arcoíris

Para este estudio se utilizó un total de 2.643 truchas arcoíris correspondiente a 105 familias de hermanos completos del año 2012, pertenecientes a una población de reproductores de la empresa Aguas Claras S.A. Los peces fueron marcados con PIT-tags (Transpondedor Integrado Pasivo) y separados en tres estanques distintos con 14 ppt de salinidad, de manera que cada familia esté igualmente representada. La infestación se realizó con un total de 105.600 copepoditos, considerando una presión de infestación de 40 copépodos/pez, los cuales fueron producidos *in vitro*, a partir de hembras ovígeras libres de patógenos, pertenecientes a la empresa Aquainnovo S.A, en la Décima Región de Chile. La infestación consistió en depositar los copepoditos en cada estanque, manteniendo un flujo de agua retenido y oscuridad por un período de 6 horas, a una temperatura constante de 13°C durante todo el desafío. Al día seis post infestación se procedió al conteo de parásitos y a la toma de muestras desde la aleta caudal. El conteo se realizó bajo lupa estereoscópica, en cada una de las aletas de todos los animales de estudio. Se registró el peso corporal para cada animal al final del desafío.

5.2 Salmón del Atlántico

Un total de 2.628 smolts de salmón del Atlántico pertenecientes a 118 familias de hermanos completos de la población reproductora del año 2010 de Salmones Chaicas, Décima Región, Chile, fueron desafiados con *C. rogercresseyi*. Los peces fueron etiquetados con PIT-tags, aclimatados y distribuidos en tres estanques con igual representación de cada familia en cada estanque, como se describió en estudios anteriores (Lhorente *et al.*, 2012; Yáñez *et al.*, 2014). La infestación con el parásito se llevó a cabo utilizando de 13 a 24 copépodos por pez, deteniendo el flujo de agua durante 6 horas después de la infestación. El desafío duró 6 días, después de este período, los peces fueron sacrificados y se procedió a contar los piojos en

las aletas, luego se tomó una muestra de aleta caudal y se midió el peso corporal de cada pez. El estanque y el peso corporal final se registraron para cada pez. En **Figura 1** están representadas las etapas realizadas en el desafío en ambas especies.

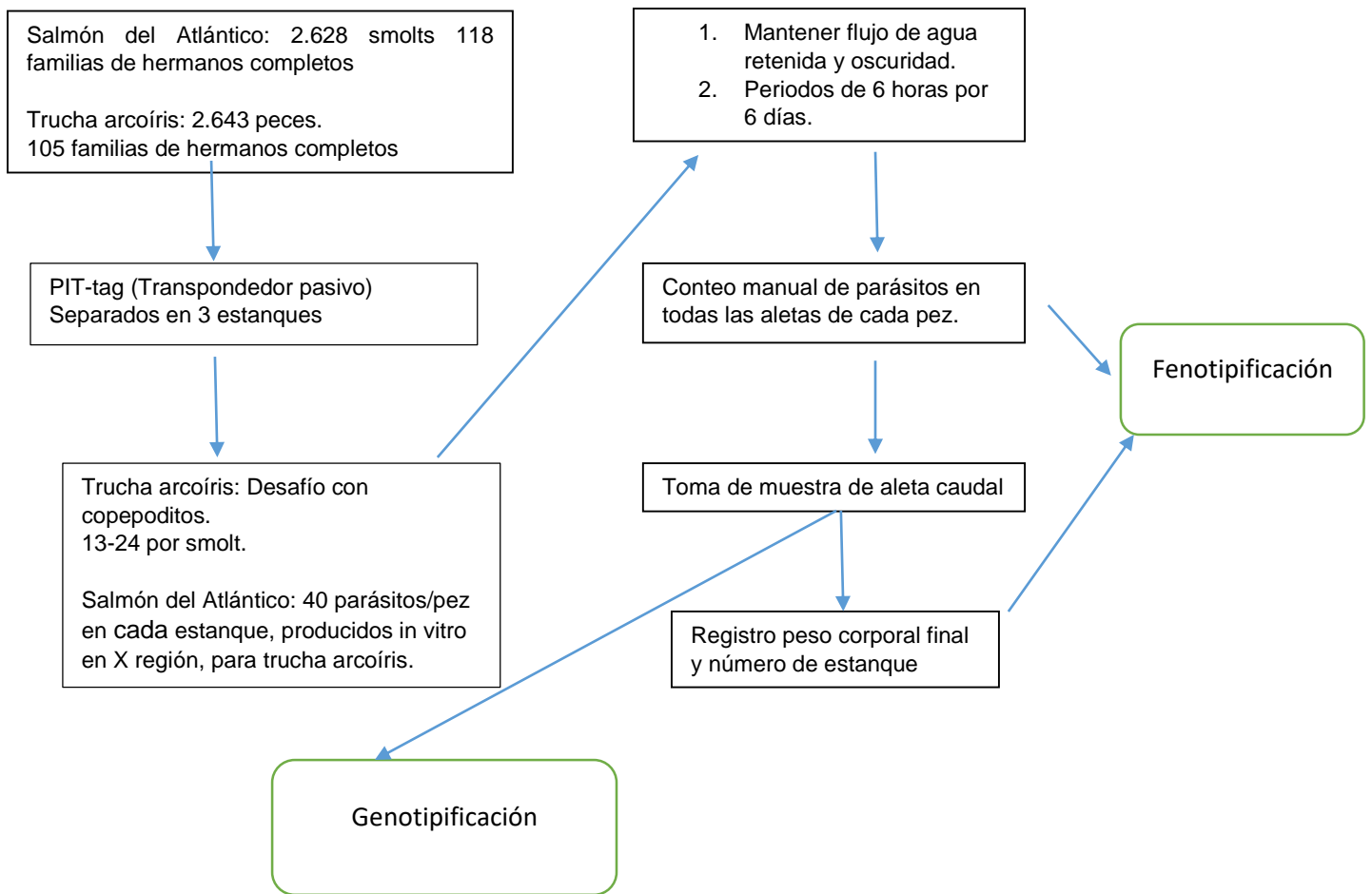


Figura 1. Diagrama de etapas para obtención de muestras para genotipificación y fenotipificación en salmón del Atlántico y trucha arcoíris.

5.3 Definición de rasgos y análisis de asociación genómica (GWAS)

La resistencia a *C. rogercresseyi* fue definida de la siguiente manera, según ha sido propuesto por Ødegård *et al.*,(2014):

$$\text{LogLD} = \text{Log}_e \left(\frac{LC + 1}{\sqrt[3]{BW^2}} \right)$$

Donde “LD” corresponde a densidad de piojo de mar, la cual está definida como el conteo de *Caligus rogercresseyi* en cada pez al final del ensayo (LC) dividido por la raíz cubica del peso corporal al fin del ensayo (BW) al cuadrado. Se utilizará el logaritmo de LD para aproximar a una distribución normal (**Figura 2**). Se agregó un valor constante 1 para evitar error en la transformación en caso de valor de conteo igual a cero. La distribución del LogLD se puede apreciar en la **Figura 2**, donde se observa que la curva adquiere una distribución normal aproximada en ambas especies.

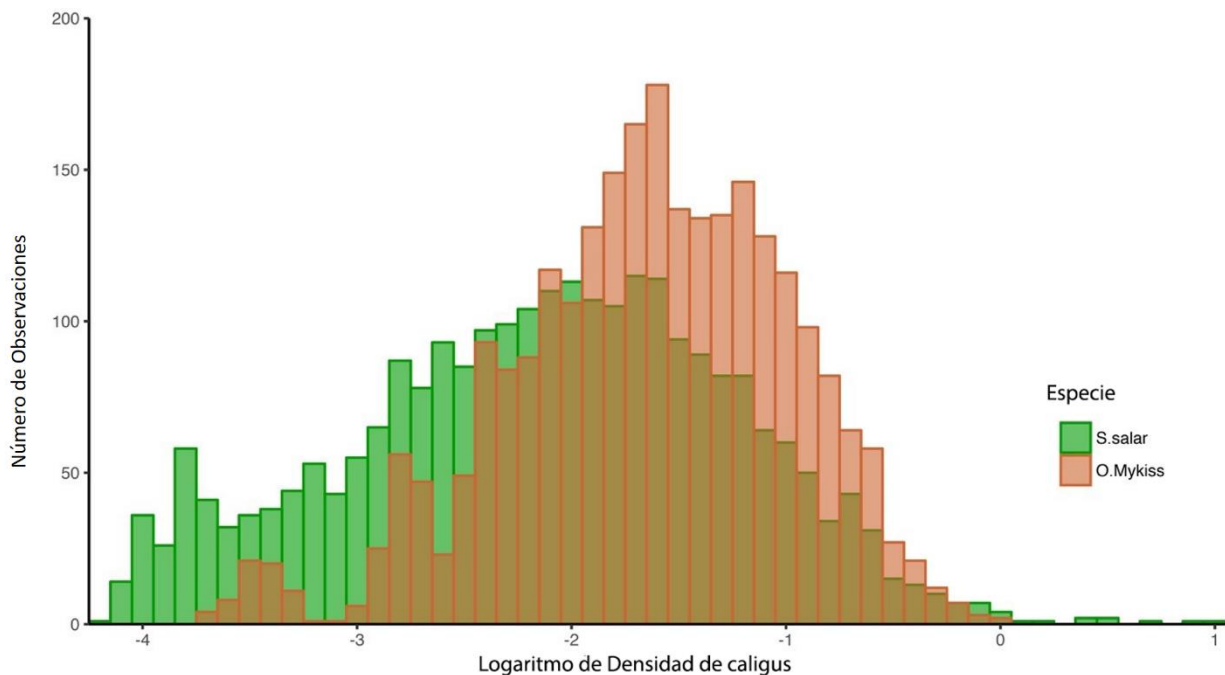


Figura 2. Histograma para la densidad de piojo de mar (LogLD) para *S. salar* y *O. mykiss*.

5.4 Genotipado

El ADN genómico se extrajo a partir de la aleta caudal de cada pez desafiado usando el kit comercial DNeasy Blood & Kit de tejido (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los salmones del Atlántico fueron genotipados usando un Affymetrix® de 50 K Axiom® myDesign™ SNP *Genotyping Array* diseñado por Aqualnovo y la Universidad de Chile (Yáñez *et al.*, 2016), mientras que para trucha arcoíris se utilizó una matriz de 57k SNPs desarrollado por el USDA (Palti *et al.*, 2015).

El control de calidad de los genotipos se realizó con el programa PLINK (Purcell *et al.*, 2007). Se utilizó filtro para individuos y SNP (*call rate* ≤ 0,95), frecuencia de alelo menor (MAF) ≤ 0,05 y equilibrio de Hardy-Weinberg. Tanto los animales como los SNPs que pasaron el control de calidad para cada una de las especies, serán utilizados para los siguientes análisis.

5.5 BLUP Genómico

Para identificar la asociación entre SNP y resistencia a *Caligus rogercresseyi* se utilizó la metodología *Single Step Genomic Best Linear Unbiased Prediction* (ssGBLUP) y *Weighted Single Step Genomic Linear Unbiased Prediction* (wssGBLUP) (Legarra *et al.*, 2014) utilizando programas de la familia BLUPF90 (Misztal *et al.*, 2013).

Para la primera iteración (ssGBLUP) los valores para cada SNP utilizados fueron igual a 1. En la segunda iteración (wssGBLUP), se utilizaron los valores estimados en el paso anterior para cada SNP (Aguilar *et al.*, 2014; Gonzalez-Pena *et al.*, 2016).

La conexión entre la información fenotípica y genotípica en wssGBLUP se realiza mediante la matriz H, que combina la matriz de relación genómica (G) con la matriz de relación de pedigrí (A) (Aguilar *et al.*, 2010) de la siguiente manera:

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G^{-1} - A_{22}^{-1} \end{bmatrix}$$

Donde A^{-1} es la matriz de relación inversa para todos los animales construida a partir del pedigrí, A_{22}^{-1} es el inverso de la matriz de pedigrí solo para animales genotipados y G^{-1} es la matriz inversa de relación genómica.

El análisis de asociación para ambos rasgos se llevará a cabo utilizando el siguiente modelo lineal mixto $y = Xb + Za + e$, donde y es el vector de valores fenotípicos (LogLD); b es el vector de efectos fijos (Estanque); a es el vector para efectos aleatorios considerando la estructura de covarianza entre individuos establecida por la matriz H ; y e es el vector para el error residual; X y Z son las matrices de incidencia para efectos fijos y aleatorios, respectivamente.

Para identificar las regiones del genoma asociadas con los rasgos analizados, se consideraron ventanas de 20 SNP adyacentes explicando sobre el 1% de varianza explicada, la cual se determinará de acuerdo a la metodología aplicada por (Gonzalez-Pena *et al.*, 2016). El porcentaje de varianza explicado por cada SNP se graficará mediante *manhattan plots*, utilizando códigos desarrollados para el programa R (R Core Team, 2018).

5.6 Genes Candidatos

La secuencia de nucleótidos correspondiente a la ventana principal de las regiones asociadas para cada rasgo se identificó mediante BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando la sonda de cada SNP de 71 pares de bases, la cual fue alineada contra la secuencia del genoma de referencia de la trucha arcoíris y salmón del Atlántico, utilizando la última versión del genoma de referencia de *Oncorhynchus mykiss*, que está disponible públicamente en NCBI (*GenBank Assembly Accession* GCA_002163495.1) y el genoma de referencia para *Salmo salar* (*GenBank Assembly Accession* GCA_000233375.4), respectivamente. A partir de este análisis se obtuvo las secuencias de nucleótidos en formato FASTA de cada gen presente en la región delimitada por la ventana de 20 SNP. Posteriormente, se realizó BLASTx con las secuencias FASTA de nucleótidos para obtener la secuencia aminoacídica de los genes contenidos en cada una de las

ventanas de 20 SNP asociadas en ambas especies. Se utilizó paralelamente el programa Blast2Go (Conesa *et al.*, 2005) con las secuencias FASTA para identificar genes y clasificarlos según su funcionalidad.

Para ambas especies se incluyó, al realizar BLASTx, el genoma de referencia de *Dario renio* (GenBank Assembly Accession GCA_000002035.4) para la identificación de proteínas no caracterizadas.

5.7 Genómica comparativa

Se descargaron los genomas de trucha arcoíris (GCF_002163495.1) (Pearse *et al.*, 2018) y salmón del Atlántico (GCF_000233375.4) (Lien *et al.*, 2016) del NCBI. La sintenia entre los cromosomas se identificó alineando las secuencias utilizando el programa Symap v3.469 (Soderlund *et al.*, 2006, Soderlund *et al.*, 2011). Para visualizar las regiones sinténicas, se construyó un *Circos plot* (Connors *et al.*, 2009) el cual permite visualizar las relaciones de homología entre los cromosomas de la trucha arcoíris y del salmón del Atlántico, permitiendo trazar la similitud entre las regiones asociadas a la resistencia al piojo de mar en ambas especies.

Para la determinación genes que codifican a proteínas ortólogas entre las ventanas de 20 SNP asociadas a la resistencia entre ambas especies, se utilizó el programa OrthoFinder (Emms & Kelly, 2015), utilizando las secuencias FASTA obtenidas por BLASTx.

5.8 Aprobación ética y consentimiento para participar

Para ambos estudios los desafíos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (Certificado N 17,041-VET-UCH).

6. Resultados

6.1 Fenotipos y control de calidad de genotipos

Al sexto día posterior al inicio del desafío experimental, se realizó el conteo de parásitos y toma de muestras desde la aleta caudal de los peces en ambas especies. Las estadísticas de resumen del conteo de parásitos para cada uno de los animales desafiados en ambas especies se muestran en la **Tabla 1**. Se estimó un promedio de $5,9 \pm 6,6$, y $6,1 \pm 4,2$ parásitos en salmón del Atlántico y trucha arcoíris, respectivamente. Sin embargo, en términos de número máximo de parásitos este alcanzó a 106 parásitos en salmón del Atlántico y 28 en el caso de trucha arcoíris. Para ambas especies, hubo animales que no presentaron ningún parásito adherido. El peso promedio al final del desafío fue de experimental fue de $278,1 \pm 90,3$ g (variando desde 104 g hasta 569 g) y de $173,1 \pm 31,4$ (con un mínimo y máximo de 86 g y 265 g), para salmón del Atlántico y trucha arcoíris respectivamente.

Especie	Promedio BW (g)	SD ¹ BW (g)	Min.BW (g)	Máx.BW (g)	LC promedio	LC SD ¹	LC min.	LC máx.
<i>S. salar</i>	278.1	90.3	104.0	569.0	5.9	6.61	0	106
<i>O. mykiss</i>	173.1	31.4	86.0	265	6.1	4.22	0	28

Tabla 1. Resumen de estadísticas para peso corporal (BW) y conteo de parásito (LC) en ambas especies.

¹ SD (Desviación estándar)

En salmón del Atlántico, un total de 2.040 individuos y 45.117 SNP pasaron el control de calidad, representando un 77,6% y un 96,7% respectivamente. Mientras que, en trucha arcoíris, un total de 2.466 individuos y 27.146 SNP fueron seleccionados luego de aplicar filtros de calidad, representando un 93,3% y 67,4% respectivamente.

6.2 Estudio de genoma completo (GWAS)

En salmón del Atlántico se estimó una variación genética significativa para resistencia a *C. rogercresseyi*, siendo la estimación de heredabilidad de $0,19 \pm 0,03$, mientras que en Trucha Arcoíris la h^2 obtenida para el rasgo fue $0,08 \pm 0,01$ (**Tabla 2**).

Especie	Varianza aditiva	Varianza residual	h^2
<i>Salmón del Atlántico</i>	0,09	0,41	$0,19 \pm 0,03$
<i>Trucha Arcoíris</i>	0,02	0,27	$0,08 \pm 0,01$

Tabla 2. Estimaciones de varianza genética aditiva, varianza residual y heredabilidad (h^2) para el rasgo de LogLD en ambas especies.

El resultado del GWAS utilizando el rasgo de logaritmo de la densidad del conteo de caligus (LogLD) en salmón del Atlántico se muestra en la **Figura 3**. Fue posible identificar 7 regiones genómicas asociadas al rasgo de resistencia. En general, estas regiones asociadas explican un bajo porcentaje de la variación genética total (menos del 3%). Es así como dos ventanas de SNP en el Ssa3 explican 1% a 1,4% de la varianza genética. También en Ssa6 hubo una ventana que alcanzó el 1,9% de la varianza, mientras en el Ssa9 los resultados muestran dos ventanas que explican el 1,7% y 3% respectivamente. Igualmente, en el Ssa20 se obtuvo una ventana que explica el 1,05% y en el Ssa25 1,33%.

A su vez el GWAS realizado en trucha arcoíris para el rasgo LogLD, evidenció 13 regiones que superan el 1% de la varianza explicada, cómo se puede observar en la **Figura 3**. En general, de forma similar a lo representado en *S. salar*, se obtienen ventanas que entregan un bajo porcentaje de varianza explicada (bajo 2,7%) pero con una gran variedad de cromosomas asociados que explican parte del rasgo (**Tabla 3**). En el *Omy2* se obtuvo una ventana la varianza explicada de 1,6%, en *Omy3* de 1,7%, *Omy4* de 1,03%, en *Omy7* de 1,17%, en *Omy9* 1,6%, *Omy10* de 1,2%, en *Omy14* alcanzó una varianza de 1,4%, mientras el máximo se obtuvo en

el *Omy15* con un 2,7%. Luego, en el *Omy16* se obtuvo 1,07% y en el *Omy21* 1,3%. En el *Omy26* se obtuvo una varianza de 2,3% y en el *Omy28* de 1,7% y en el *Omy29* de 1,2 %.

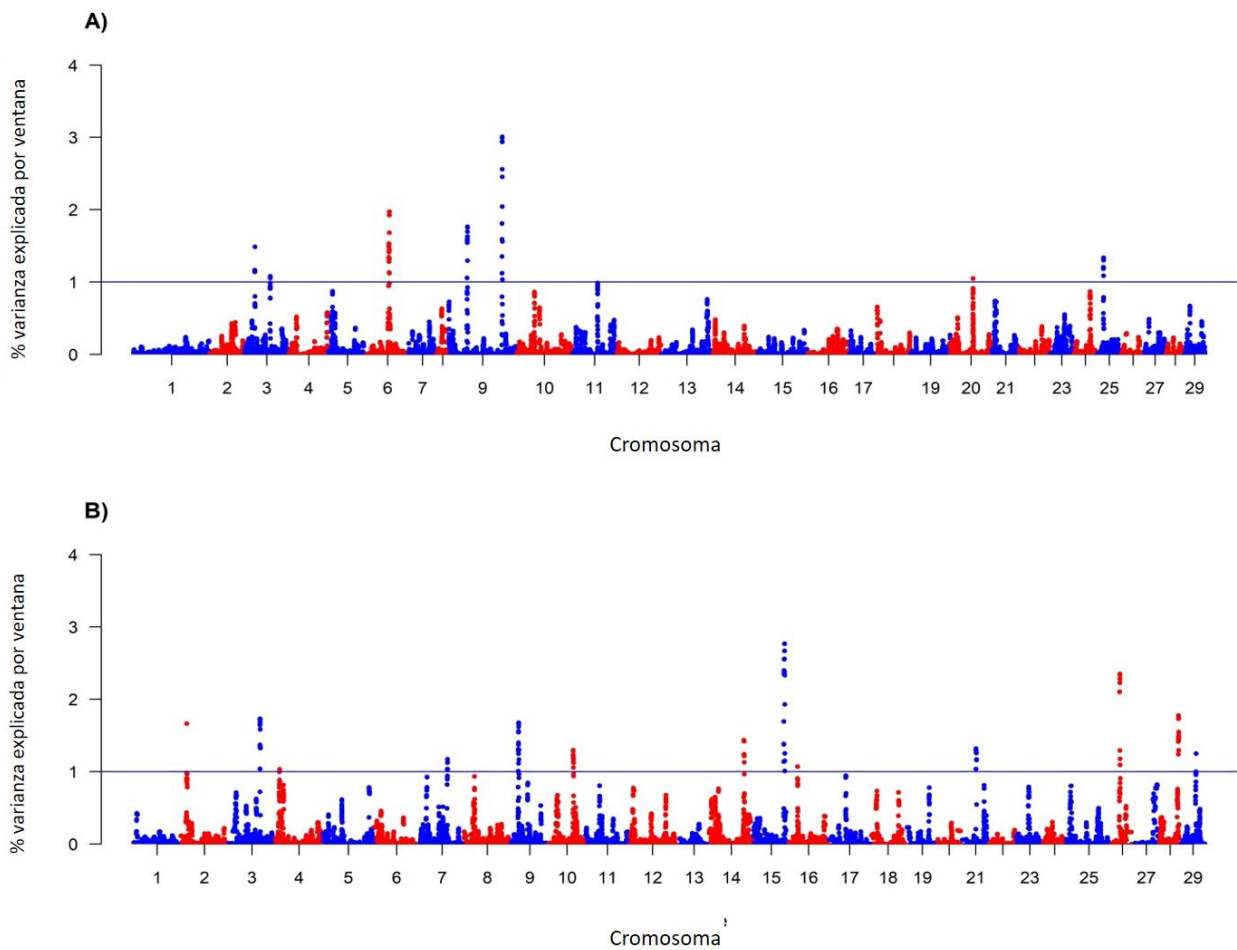


Figura 3. Manhattan *plot* de GBLUP ponderado de un solo paso (wssGBLUP) para el rasgo de resistencia a *Caligus rogercresseyi* dado como logaritmo de densidad de parásitos en salmón del Atlántico (A) y trucha arcoíris (B). La línea azul indica más del 1% de la varianza explicada.

Posición de ventana (bp) ¹	Chr ²	Primer y último SNP de la ventana	Var (%) ³
Salmon del Atlántico			
111398941-112068765	9	Affx-93376378-Affx-93407247	3,00
46812870-48951308	6	Affx-93402585-Affx-93349216	1,97
38862311-39791664	9	Affx-93301094-Affx-93369286	1,76
21387020-22266613	3	Affx-93351937-Affx-93441285	1,48
13302321-13992142	25	Affx-93449253-Affx-93379811	1,33
53395987-54096750	3	Affx-93397375-Affx-93327854	1,08
47471286-48390124	20	Affx-93269128-Affx-93365186	1,05
Trucha Arcoíris			
55155679-55750071	15	Affx-88957834-Affx-88937607	2,77
14742278- 15862261	26	Affx-88926342-Affx-88913419	2,35
35337013- 36760480	28	Affx-88961757-Affx-88909402	1,77
57059237- 57975684	3	Affx-88911532-Affx-88917594	1,73
14313209- 15091943	9	Affx-88944322-Affx-88927798	1,67
10428810- 11808090	2	Affx-88922063-Affx-88937734	1,66
62615440- 63610148	14	Affx-88942436-Affx-88960365	1,43
27521395-28664751	21	Affx-88932888-Affx-88952962	1,31
43708499-44788897	10	Affx-88912735-Affx-88908041	1,29
26370287-27397531	29	Affx-88925775-Affx-88920967	1,25
50072755-50809742	7	Affx-88956194-Affx-88906442	1,17
15571716-16056405	16	Affx-88940047-Affx-88947010	1,07
7055909-8035171	4	Affx-88935786-Affx-88957720	1,03

Tabla 3. Ventanas de 20 SNP adyacentes explicando más de un 1% de la varianza genética para la resistencia a *Caligus rogercresseyi* en salmón del Atlántico y trucha arcoíris.

¹Posición de la ventana en pares de bases(BP).

²Cromosoma(Chr).

³ Porcentaje de Varianza explicada (Var)

6.3 Genes candidatos

El análisis de los genes presentes en ventanas de 20 SNP adyacentes que explican sobre el 1% de la varianza genética para la resistencia a piojo de mar permitió identificar una serie de posibles candidatos, los cuales fueron clasificados en tres grupos: genes relacionados con respuesta inmune, citoesqueleto y metaloproteasas (**Tabla 4 y Tabla 5**).

Proteína	Id Gen ¹	Localización (Bp) ²	Chr ³	Función
Tenascin R	<i>tnr</i>	22.113,558 22.312,716	- 3	Respuesta inmune
T-Cell Activation Rho Gtpase-Activating Protein	<i>tagap</i>	47.344,667 47.350,357	- 6	Respuesta inmune
Forkhead Box Protein N1-Like Isoform X1	LOC106612922	111.631,268 111.668,978	- 9	Respuesta inmune
Immunoglobulin Superfamily Member 11-Like	<i>igsf11</i>	47.453,435 47.570,948	- 20	Respuesta inmune
Tripartite Motif-Containing 45	<i>trim45</i>	31.699,662 31.705,320	- 25	Respuesta inmune
Pre-B-Cell Leukemia Transcription Factor 1-Like	LOC106607421	43.977,204 44.037,235	- 6	Respuesta inmune
Bromodomain-Containing Protein 4-Like Isoform	LOC106600922	53.482,098 53.526,053	- 3	Respuesta inmune
Pappalysin-2	<i>pappa2</i>	21.972,287 22.050,408	- 3	Metaloproteasa
Carboxypeptidase D	<i>cdpa</i>	111.778,091 111.828,613	- 9	Metaloproteasa
Gem-Interacting Protein-Like Isoform X3	LOC106600913	53.672,635 53.709,985	- 3	Metaloproteasa
Epidermal Growth Factor	<i>egf</i>	55.552,926 55.584,698	- 9	Citoesqueleto
Procollagen Galactosyltransferase 1	LOC106607427	43.820,342 43.851,337	- 6	Citoesqueleto
Heat Shock Protein Hsp 90-Beta	<i>hs90b</i>	48.362,362 48.374,359	- 6	Citoesqueleto
Collagen Alpha-1(Xxviii) Chain-Like	<i>col28a1</i> (LOC106586207)	13.872,240 13.923,778	- 25	Citoesqueleto
Gap Junction Alpha-4 Protein-Like	LOC106611294	39.373,024 39.373,931	- 9	Citoesqueleto
Pleckstrin Homology Domain-Containing Family H Member 1-Like	LOC106611291	39.101,628 39.165,084	- 9	Citoesqueleto
Rho-Related Gtp-Binding Protein Rhob-Like	LOC106607565	46.401,032 46.403,034	- 6	Citoesqueleto
Pleckstrin Homology And Rhogef Domain Containing G1	<i>plekhg1</i>	64.024,693 64.178,709	- 6	Citoesqueleto

Tabla 4. Genes identificados como candidatos explicando la resistencia a *Caligus rogercresseyi* en salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

¹Identificación del Gen (Gene ID) en base de datos de NCBI *GenBank assembly accession*: GCA_000233375.4.

²Localización en pares de base (BP).

³Cromosoma (Chr).

Proteína	Id Gen ¹	Localización (Bp) ²	Chr ³	Función
Nuclear Factor Of Activated T-Cells,Cytoplasmic 1-Like	<i>LOC110518416</i>	35.501,191 - 35.592,262	3	Respuesta inmune
Thymocyte Selection-Associated Family Member 2	<i>themist2</i>	33.704,133 - 33.726,370	4	Respuesta inmune
C-C Motif Chemokine Receptor 10	<i>ccr10</i>	21.961,454 - 21.965,777	16	Respuesta inmune
T-Box 21	<i>tbx21</i>	15.560,804 - 15.578,932	16	Respuesta inmune
Leucine-Rich Repeat-Containing Protein 15-Like	<i>LOC110539182</i>	11.715,000 - 11.717,281	2	Respuesta inmune
Toll-Like Receptor 13	<i>LOC110490289</i>	48.117,536 - 48.120,927	15	Respuesta inmune
Adhesion G Protein-Coupled Receptor L3	<i>LOC110531730</i>	14.279,162 - 14.524,070	9	Respuesta inmune
Inhibin Beta A Chain	<i>inhba</i>	36.734,061 - 36.745,506	28	Respuesta inmune
Interferon Gamma2	<i>ifng2</i>	153,268 - 183,367		Respuesta inmune
Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 8	<i>hspa8</i>	17.691,060 - 17.715,579	10	Respuesta inmune
Serine/Threonine-Protein Phosphatase 2a 56 Kda	<i>LOC110500325</i>	28.440,738 - 28.486,597	21	
Tripartite Motif-Containing Protein 16-Like	<i>LOC110489932</i>	24,715,812 - 24,721,400	15	
Fibroblast Growth Factor	<i>fgf13</i>	26.660,561 - 26.715,195	29	Citoesqueleto
Fibroblast Growth Factor	<i>fgf11</i>	38.417,625 - 38.489,806	10	Citoesqueleto
Alpha-Actinin-3	<i>3a, 3b</i>	43.817,039 - 43.841,681	10	Citoesqueleto
Dipeptidyl Peptidase 3	<i>ddp3</i>	33.026,452 - 33.044,218	29	Citoesqueleto
Elmo/Ced-12 Domain-Containing 1	<i>elmod1</i>	16.419,827 - 16.441,415	10	Citoesqueleto

Cysteine-Rich Protein 2-Like	<i>LOC106611283</i>	38.639,636 - 38.675,313	9	Citoesqueleto
Coagulation Factor Ix-Like	<i>LOC110534144</i>	43.984,179 - 43.991,091	10	Citoesqueleto
Lysyl Oxidase Homolog 1 Isoform X2	<i>LOC110526332</i>	59.312,382 - 59.352,343	26	Citoesqueleto
Afg3 Like Matrix Aaa Peptidase Subunit 2	<i>afg3l2</i>	35.488,672 - 35.515,514	28	Metaloproteasa
Afg3-Like Protein 1	<i>LOC110506600</i>	19.946,590 - 19.959,716	26	Metaloproteasa

Tabla 5. Genes identificados como candidatos explicando la resistencia a *Caligus rogercresseyi* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

¹Identificación de gen (Gene ID) en base de datos de NCBI *GenBank assembly accession*: GCA_002163495.1.

²Localización en pares de base (BP).

³Cromosoma (Chr).

6.4 Genómica comparativa

El análisis de ortología de genes en regiones asociadas a la resistencia a piojo de mar en salmón del Atlántico y trucha arcoíris, realizado por el programa Orthofinder (Emms & Kelly, 2015), determinó la presencia de 23 ortogrupos, de los cuales en 15 están presentes ambas especies. Por medio de la plataforma Uniprot (Bateman *et al.*, 2017) se determinó la clasificación por ontología génica (GO) de todos los ortogrupos que contenían al menos un gen ortólogo entre las dos especies (**Tabla Suplementaria 1**). La sintenia entre las especies es visualizada en *circos plot* (**Figura 4**), donde las mayores similitudes se observan entre *Omy28* y *Ssa03*, *Omy4* y *Ssa06*, *Omy3* y *Ssa25*, y *Omy14* y *Ssa09*.

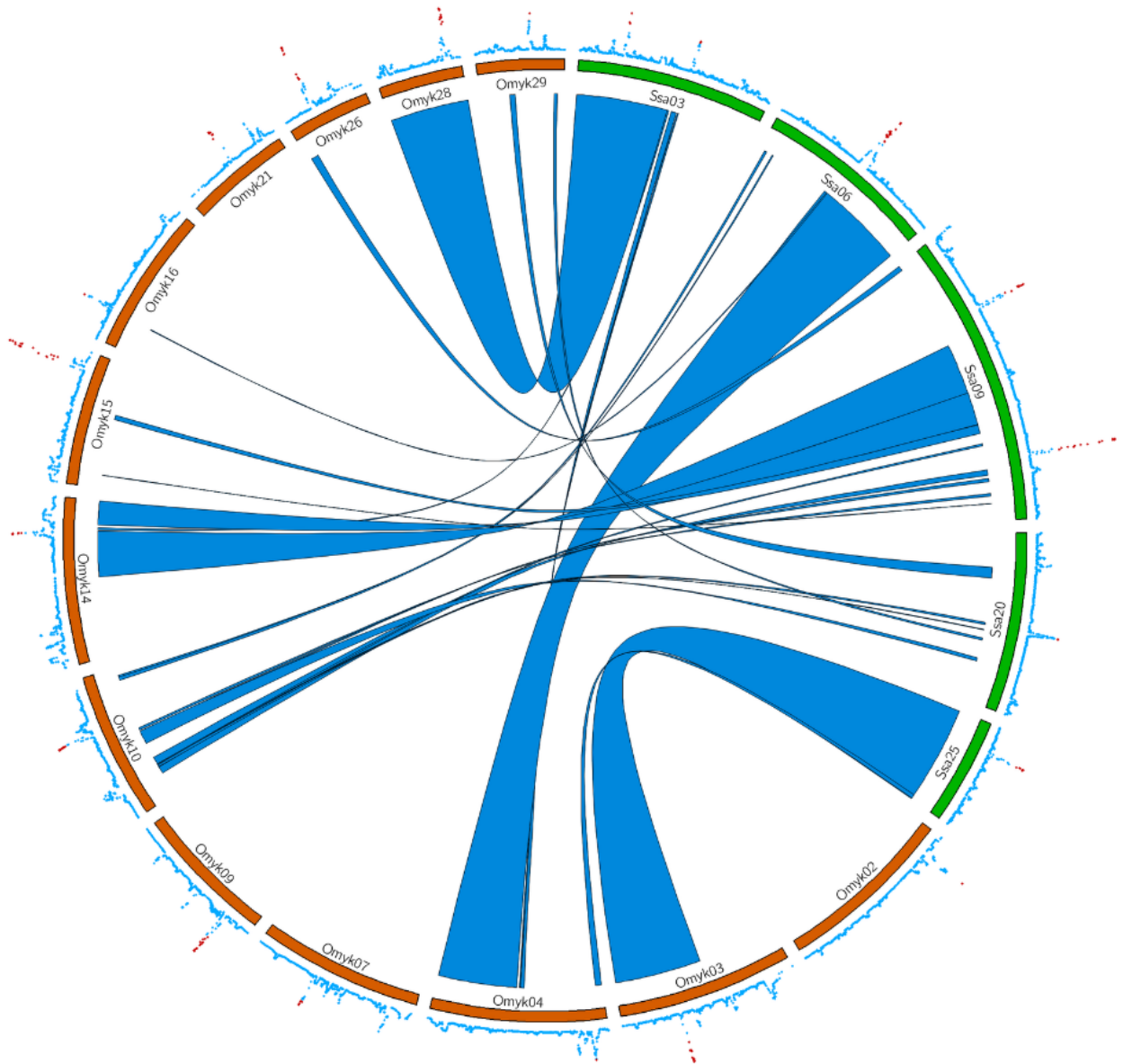


Figura 4. Circos *plot* de sintenia para los cromosomas albergando regiones explicando sobre un 1% de la resistencia al piojo de mar en salmón del Atlántico y trucha arcoíris. Las cintas internas marcan las regiones sinténicas entre los cromosomas de salmón del Atlántico (Ssa verde) y trucha arcoíris (Omyk naranja). Los valores del análisis de wssGBLUP se representan en el anillo exterior, con los marcadores asociados en rojo (valores $\geq 1\%$).

7. Discusión

7.1 Desafío experimental

El promedio de parásitos adheridos en ambas especies resultó ser similar, habiendo en ambos ensayos peces sin parásitos adheridos (**Tabla 1**). El número de parásitos contados en cada especie posterior al desafío está dentro del rango presentado previamente por Ødegård *et al.*,(2014) quienes obtuvieron un promedio de $12,81 \pm 9,02$. mientras que Tsai *et al.*,(2016) en su estudio obtuvieron un promedio de $18,3 \pm 9,1$.

La aproximación para estimar la resistencia a piojo de mar, propuesta previamente por Ødegård *et al.*,(2014), permite corregir el número de parásitos en función del peso corporal de cada pez, la cual también fue utilizada por Tsai *et al.*,(2016) para determinación de resistencia a *L. salmonis* en salmón del Atlántico.

Diferencias entre resultados en ensayos que fueron realizados en condiciones similares se pueden explicar por diversos factores que pueden afectar el resultado del desafío, como, por ejemplo, diferencias de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, dieta, características intrínsecas del parásito. Gjerde *et al.*, (2010) realizaron un ensayo utilizando una población de salmón del Atlántico, infestándola con piojo de mar (*Lepeophtheirus salmonis*) en tres tiempos distintos de vida del salmón. Este trabajo demostró que, en distintas etapas de vida tanto de peces como parásitos, la resistencia a piojo de mar (definida como LD), evidenció correlaciones altas ($0,80 \pm 0,16$) y ($0,87 \pm 0,12$) para el rasgo en poblaciones de distinta edad. Estos resultados que indicarían que la resistencia en el salmón del Atlántico, medida en diferentes etapas de la vida de los peces, puede considerarse como el mismo rasgo genético.

Correa *et al.*, (2017) utilizaron una población de 2.628 smolts de salmón del Atlántico pertenecientes a Salmones Chaicas, Chile, de la generación 2010, con un peso promedio de 274,89 g y una carga de infestación de 13 a 24 copépodos por pez, disminuyendo el flujo de agua y luminosidad por 6 horas durante 6 días. Por otra parte, Robledo *et al.*,(2019) utilizó una población de 2.668 smolts de salmón del

Atlántico de 104 familias de la generación 2014 de la misma población, con un peso promedio por pez de 122g. Esta población fue sometida a una presión de infestación de 50 copépodos por pez, por 6 horas durante 6 días. Las condiciones experimentales no fueron exactamente iguales, pero los resultados obtenidos en ambos ensayos, utilizando dos generaciones distintas de la misma población, lograron identificar un QTL común asociado a resistencia a piojo de mar en el cromosoma 21, mientras que Robledo *et al.*, (2019) además logró identificar QTL adicionales en otros cromosomas.

7.2 Estudio de Asociación de Genoma Completo (GWAS)

Utilizando el mismo rasgo de resistencia Tsai *et al.*,(2016), estimó heredabilidades de $0,22 \pm 0,08$ y $0,33 \pm 0,06$. Por su parte, Ødegård *et al.*,(2014) utilizando como rasgo LogLD obtuvo valores de $0,14 \pm 0,03$ y $0,13 \pm 0,03$. Además, Correa *et al.*,(2017) y Yáñez *et al.*,(2014) estimaron valores que varían desde 0,10 hasta 0,12 al definir resistencia como el número total de parásitos encontrados en todas las aletas. Para trucha arcoíris, Bassini *et al.* (2017) estimó una heredabilidad de 0,08 utilizando información de pedigree, por lo que la heredabilidad obtenida en este trabajo concuerda con el rango evidenciado anteriormente por otros autores.

Correa *et al.*,(2017) describe un QTL en el cromosoma 21 de salmón del Atlántico, relacionado con resistencia a piojo de mar, mientras que recientemente Robledo *et al.*,(2019) describió tres QTL para este rasgo en la misma especie, en el cromosoma 3 y cromosoma 18 con 7,5% de la varianza explicada en ambos y en el cromosoma 21 explicando un 13,3% de la varianza genética. En el presente estudio se logró evidenciar 7 y 13 regiones las cuales contienen SNP asociados a la resistencia a piojo de mar, en salmón del Atlántico y trucha arcoíris, respectivamente, lo cual podría sugerir que el rasgo posee una arquitectura genética de tipo poligénica en ambas especies. Similar arquitectura ha sido previamente sugerida por Correa *et al.*,(2017) y Tsai *et al.*,(2016) para salmón del Atlántico.

7.3 Genómica comparativa

Como se observa en la **Figura 2**, existen regiones de sintenia donde están presentes SNP que resultaron asociados al carácter, y al realizar el estudio de

genes ortólogos se identificó a *dual specificity protein phosphatase 10-like* en *Ssa06* y *dual specificity protein phosphatase 8-like* en *Omy04*, las cuales provienen de regiones sinténicas y que además cuentan con anotación similar en ambas especies. Estas moléculas tienen la función de inactivar a p38 (Keyse, 2008) dentro de la cascada de MAPK (Owens & Keyse, 2007).

Al determinar los grupos ortólogos, se logró identificar 15 ortogrupos que se comparten en ambas especies (**Tabla Suplementaria 1**), los cuales fueron clasificados de acuerdo con las anotaciones de ontología de genes (Bateman *et al.*, 2017). Dentro de los grupos más interesantes para el enfoque de este estudio se identificó al ortogrupo 12, el cual contiene *Lysophosphatidic acid receptor 2-like* de *S. salar* y *G-protein coupled receptor 12-like* en *O. mykiss* junto a otra proteína no caracterizada, las cuales comparten entre ellas la misma clasificación de genómica ontológica (GO), por lo tanto, funciones similares (GO:0004930, GO:0007186, GO:0016021, GO:0070915, GO:0007165, GO:0016020, **Tabla suplementaria 2**). Esta proteína está relacionada con la vía de señalización del receptor asociado a proteína G. *Lysophosphatidic acid* (LPA) y participa en múltiples procesos biológicos, como la modificación del citoesqueleto a través de la formación de fibra de actina (Moolenaar *et al.*, 1997) desempeñando además un papel en la activación de la adhesión relacionada con la tirosina quinasa focal (RAFTK) (Park *et al.*, 2006), que a su vez participa como un factor estimulante para los monocitos y macrófagos (Hatch *et al.*, 1998).

7.4 Genes candidatos

El SNP que entrega la mayor varianza explicada en salmón del Atlántico se ubica en el cromosoma *Ssa9*, en la región que contiene al gen *bcas3*, el cual codifica a un factor de migración celular asociado a micro túbulos, descrito por favorecer la movilidad celular (Berry *et al.*, 2002). La migración celular generalmente está inducida en respuesta a señales químio tácticas, la cual induce cambios en citoesqueleto y matriz extracelular (Lamallice *et al.*, 2007). A su vez, en trucha arcoíris en el cromosoma *Omy15* identificamos como gen candidato a *Tripartite*

motif-containing protein 16-like, que forma parte de la súper familia TRIM relacionadas a diferenciación celular, apoptosis, regulación de la transcripción y vías de señalización (McNab, Rajsbaum, Stoye, & O'Garra, 2011), mientras que en *Ssa25* se identificó la presencia del gen que codifica a una proteína similar en salmón del Atlántico la *Tripartite motif-containing protein 45*. También en el *Omy15* se encuentra un gen que codifica para el interferón $\gamma 2$ (*ifng2*), el cual es una citoquina que participa en la respuesta inmune tipo 1 favoreciendo la presentación de antígenos y activación de macrófagos (Zou *et al.*, 2005). En este mismo cromosoma también se identificó *putative ferric-chelate reductase 1* (*frrs1*), la cual se ha descrito que tiene funciones en la fijación del hierro en teleósteos (Bury & Grosell, 2003). Robledo *et al.*, (2019) en un estudio similar identificó en *S. salar* la *heme binding protein 2* (HEBP2) la cual tiene función de fijación del hierro. Distintos autores (Fast *et al.*, 2007; Valenzuela-Muñoz *et al.*, 2017) han planteado que disminuir la disponibilidad de hierro puede ser parte de un mecanismo de defensa nutricional frente a la infestación de piojo de mar.

La reacción frente a parásitos está mediada principalmente por linfocitos *T-helper 1* y *T-helper 2* en salmónidos (Wiegertjes *et al.*, 2016). Entre los genes identificados en las ventanas de interés, se pudo encontrar algunos que tienen relación en alguna etapa de la respuesta inmune, ya sea promoviendo el crecimiento de leucocitos, como favoreciendo su migración o activación.

Otros genes candidatos propuestos para *S. salar* son *T-cell activation Rho GTPase-activating protein*, los cuales participan en la activación y reclutamiento de células T del sistema inmune por medio de citoquinas (Tamehiro *et al.*, 2017), y Tenacin R la cual es una proteína de la matriz extra celular, presente en medula ósea, timo, bazo y linfonódulos. Se ha descrito que tiene una función de adhesina, favoreciendo la movilidad de linfocitos y linfoblastos (Ruegg *et al.*, 1989; Erickson & Springer, 1997). En *O. mykiss* se encontró el gen de T-box 21 (*tbx21*), o también descrito como Tbet (T-box expresado en células T), presente en *Omy16*, el cual pertenece a la sub familia Tbr1 (Fast, 2014), necesario para generar inmunidad tipo 1. Estas moléculas participan en la maduración y migración de células *T-helper 1* (Th-1), cuya citoquina

característica es interferón-gamma (*IFN-γ*). Estudios previos han descrito (Berry *et al.*, 2002; Townsend *et al.*, 2004) la expresión de T-bet en células NK (*natural killer*), células dendríticas y células T CD8+. También activan IFNG en células T CD4+ y aumentan la expresión del receptor β de IL-12 en células activadas (Graham *et al.*, 2005) en la mayoría de las células involucradas tanto en la inmunidad innata como adaptativa (Wang *et al.*, 2010).

Forkhead box protein N1-like (FOXN1) presente en *Ssa9* es parte de una familia de genes ampliamente estudiados en humanos, a los cuales se les atribuyen diversas funciones relacionadas con crecimiento celular, desarrollo de linfónodos y diferenciación de células T (Coffer *et al.*, 2004). Además, se ha propuesto que FOXN1 tiene un papel en la activación de receptores de factores de crecimiento de fibroblastos (Coffer *et al.*, 2004). En *Omy21* se identificó a *serine/threonine protein phosphatase 2A* 56 kDa, a la cual se le describe participación en crecimiento celular y señalización (Veerle & Jozef, 2001). Robledo *et al.*, (2019), en un estudio transcriptómico evaluando piel sana y piel post exposición a piojo de mar indicó que esta proteína mostró el cambio más significativo en la relación de piel sana y adhesión al piojo de mar, atribuyéndole un rol de importancia en un QTL de resistencia descrito por el estudio en salmón del Atlántico, además Skugor *et al.*, (2009) realizó un estudio transcriptómico con *L. salmonis*, en el cual también describe una sobre-expresión de esta proteína.

En peces de aguas cálidas como pez zebra (*Dario renio*) y bagre (*Rita rita*), se observa una reacción ante la infestación de piojo de mar, similar a los salmónidos pero con una menor infiltración de neutrófilos, favoreciendo el cerrado de la herida por medio del crecimiento acelerado de la epidermis que cubre la herida en unas pocas horas (Fast *et al.*, 2006). En salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) se ha observado que ocurre una infiltración de neutrófilos hasta el segundo día post infestación, junto a una reacción inflamatoria e hiperplasia de la zona (Skugor *et al.*, 2008), la cual presenta un rápido reclutamiento y migración de leucocitos.

También se logró identificar varias metaloproteasas en ambas especies, pero para el interés de este estudio, seleccionamos *GEM-interacting protein* la cual interactúa

con Rab27a o su efector en leucocitos. Rab es una gran familia de GTPasas responsables del transporte celular de vesículas (Stenmark *et al.*, 2009). La deficiencia de esta molécula en humano se correlaciona con deficiencias inmunes debido al mal funcionamiento de la actividad citotóxica de los linfocitos T, células *natural killer* y neutrófilos (Johnson *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta la importancia del crecimiento y el movimiento celular en respuesta a la infestación de piojos de mar, el citoesqueleto también puede desempeñar un papel considerable en los mecanismos de resistencia. *Epidermal growth factor (egf)* observado en *Ssa9*, es parte de una super familia de receptores con actividad de tirosin kinasa que se ha descrito en una gran variedad de órganos con funciones de promotor de crecimiento y diferenciación celular (Chen *et al.*, 2016). Así, el *egf* podría ser parte del mecanismo de reparación de tejidos al promover el crecimiento celular (Fast *et al.*, 2014) En trucha arcoíris destaca *Fibroblast growth factor (fgf11,fgf13)* presentes en *Omy10* y *Omy29* respectivamente, al cual se le atribuye función en la angiogénesis y respuesta inflamatoria (Presta *et al.*, 2005). Por otra parte, *ELMO/CED-12 domain-containing prot 1* fue identificada en *Omy10*. Esta proteína está descrita principalmente en *C. elegans* como partícipe en fagocitosis de células apoptóticas, mientras en mamíferos, además de esta función, se les atribuye un rol en la migración celular (Brzostowski *et al.*, 2009). Otros genes que pueden representar interés son *Procollagen galactosyltransferase 1* presente en *Ssa6*, *collagen alpha-1(XXVIII) chain-like* en *Ssa25* y *pleckstrin homology domain-containing family H member 1-like* (Lemmon, Ferguson & Abrams, 2002) como cofactores del citoesqueleto.

8. Conclusión

El análisis desde la genómica comparativa realizado entre el salmón del Atlántico y trucha arcoíris permitió evidenciar similitudes en los genes que podrían participar de la resistencia al piojo de mar en estas especies. Los genes identificados sugieren que podría haber una respuesta mediada por los leucocitos y, al mismo tiempo, por el citoesqueleto que promueve la movilidad celular y la reparación de la herida causada. Se indicaron genes candidatos, así como también se evidenció la sintenia

entre ambas especies, donde regiones de cuatro pares de los cromosomas asociados presentan similitudes en sus secuencias nucleotídicas. Además, el análisis de genes ortólogos, identificó proteínas con funcionalidades similares en ambas especies, siendo varias de ellas aún no caracterizadas, por lo cual, se requiere de investigaciones adicionales para identificar la función de estos genes y generar avances en la elucidación de la base genética detrás de la resistencia a la infestación por *Caligus rogercresseyi*. Estos resultados sugieren que es posible que mecanismos similares regulen la resistencia del salmón del Atlántico y la trucha arcoíris frente a *Caligus rogercresseyi*, proporcionando un mayor conocimiento sobre la biología del carácter.

9. Anexos

OG ¹	Especies	Genes	Descripción	GO anotación ²	CHR ³
01	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i>	ZSCAN29, zg57, ZKSCAN8 ZIC3	zinc finger and SCAN domain zinc finger protein	GO:0003676 GO:0003676,GO:0010469, GO:0008083	3,20,3,6 10
02	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i>	LOC106599059 GSONMT00068 523001	piggyBac transposable element-derived protein 4-like PNC ⁴	GO:0003677,GO:0006313, GO:0015074 GO:0003677,GO:0003779, GO:0006313,GO:0015074, GO:0016192,GO:0045010	3 NAC ⁵
03	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i>	TCB1 CDQ96296	Elemento transponible Tcb1 PNC	GO:0003677,GO:0006313 GO:0015074 GO:0003677,GO:0006313 GO:0015074	NAC NAC
04	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i>	AKP40998 GSONMT00038 303001	Proteína ORF2 PNC		NAC NAC
05	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i>	LOC106566723 LOC106571716 XP_021412816. 1	PNC K02A2.6-like K02A2.6-like	GO:0003676 GO:0015074	13,15,2 3,14 13
06	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i>	ABV31711.1 CDQ65039	Transposasa Transposasa	GO:0003677,GO:0006313 GO:0015074 GO:0003677,GO:0006313 GO:0015074	NAC NAC
07	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i>	LOC106600457 GSONMT00080 454001	PNC ATPasa transportadora de fosfolípidos	 GO:0045332,GO:0000166 GO:0000287,GO:0004012 GO:0005524,GO:0015914 GO:0016021,GO:0016020	3 NAC
08	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i>	LOC100194703 GSONMT00052 654001	Transposasa PNC	GO:0003677,GO:0006313 GO:0015074	NAC NAC
09	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i>	LOC100380853 GSONMT00026 139001	Tf2-1 PNC	GO:0003676,GO:0015074 GO:0016020,GO:0016021 GO:0003676,GO:0015074	9 NAC
10	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i>	LOC106582599 GSONMT00049 788001	PNC PNC	GO:0003676,GO:0008270	22 NAC
11	<i>S. salar</i>	LOC106612089 LOC106568774	PNC PNC	GO:0003676 GO:0015074	1,14,1 NAC

		LOC106566110	PNC		NAC
	<i>O. mykiss</i>	LOC110497478	PNC		17,19
12	<i>S. salar</i>	LOC106600920	Receptor de ácido lisofosfatídico 2-like	GO:0004930,GO:0007186 GO:0016021,GO:0070915 GO:0007165,GO:0016020	3,29
	<i>O. mykiss</i>	GSONMT00045 328001	Receptor acoplado a G12-like	GO:0004930,GO:0007186 GO:0016021,GO:0016020 GO:0007165	NAC
13	<i>S. salar</i>	LOC106607590	dual fosfatasa 10- like PNC	GO:0000188 GO:0035335 GO:0004725 GO:0006470 GO:0008138 GO:0016311 GO:0016791 GO:0017017 GO:0016787	6
	<i>O. mykiss</i>	GSONMT00014 913001 dusp8	dual phosphatase 8/ like		4,2
14	<i>S. salar</i>	LOC106585798	PNC	GO:0003676,GO:0003700 GO:0006355,GO:0008270 GO:0015074	24
	<i>O. mykiss</i>	LOC110514228	PNC		NAC ⁵
15	<i>S. salar</i>	LOC106578697	Factor de transcripción general II-I repite el dominio que contiene proteína 2- like		19
	<i>O. mykiss</i>	AGL94530.1	Supuesto factor de transcripción general II-I dominio de repetición que contiene proteína 2- like		NAC

Tabla Suplementaria 1. Listado de ortogrupos identificados.

¹ Ortogrupos

² Anotación ontología génica

³ Cromosoma

⁴ Proteína No Caracterizada

⁵ No asociado a cromosoma

Anotación Ontología Génica (GO)	Descripción
GO:0003676	Unión a ácido nucleico
GO:0010469	Regulación de señal actividad de receptor
GO:0008083	Actividad de factor de crecimiento
GO:0003677	Unión a DNA
GO:0006313	Transposición mediada por DNA
GO:0015074	Integración de DNA
GO:0003779	Unión de Actina
GO:0016192	Transporte mediado por vesícula
GO:0045010	Nucleación de actina
GO:0045332	Translocación de fosfolípidos
GO:0000166	Unión a nucleótidos
GO:0000287	Unión a ión de magnesio
GO:0004012	Translocación de fosfolípidos con actividad ATPasa
GO:0005524	Unión de ATP
GO:0015914	Transporte de fosfolípidos
GO:0016021	Componente integral de membrana
GO:0016020	Membrana
GO:0008270	Unión a ion de zinc
GO:0004930	Receptor acoplado a la proteína G
GO:0007186	Vía de señalización del receptor acoplado a la proteína G
GO:0070915	Actividad del receptor de ácido lisofosfatídico
GO:0007165	Transducción de señales
GO:0000188	Inactivación de actividad MAPK
GO:0035335	Desfosforilación de peptidil-tirosina
GO:0004725	Actividad de la proteína tirosina fosfatasa
GO:0006470	Desfosforilación de proteínas
GO:0008138	Actividad de la proteína tirosina / serina / treonina fosfatasa.
GO:0016311	Desfosforilación
GO:0016791	Actividad fosfatasa
GO:0017017	Actividad de la MAP quinasa tirosina / serina / treonina fosfatasa
GO:0016787	Actividad de hidrolasa
GO:0003700	Actividad de factor de transcripción de unión a ADN
GO:0006355	Regulación de la transcripción, con plantilla de ADN

Tabla Suplementaria 2. Descripción de clasificación GO

10. Bibliografía

- Abdelrahman, H., ElHady, M., Alcivar-Warren, A., Allen, S., Al-Tobasei, R., Bao, L., ... Zhou, T. (2017). Aquaculture genomics, genetics and breeding in the United States: Current status, challenges, and priorities for future research. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3557-1>
- Aguilar, I., Legarra, A., Wang, H., Hawken, R., Wing, T., Okimoto, R., ... Fernando, R. L. (2014). Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS) for 6-week body weight in broiler chickens. *Frontiers in Genetics*, *5*(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00134>
- Asche, F., & Roll, K. H. (2013). Determinants of Inefficiency in Norwegian Salmon Aquaculture. *Aquaculture Economics and Management*, *17*(3), 300–321. <https://doi.org/10.1080/13657305.2013.812154>
- Barría, A., Christensen, K. A., Yoshida, G. M., Correa, K., Jedlicki, A., Lhorente, J. P., ... Yáñez, J. M. (2018). Genomic Predictions and Genome-Wide Association Study of Resistance Against *Piscirickettsia salmonis* in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Using ddRAD Sequencing. *G3 & Genes/Genomes/Genetics*, *8*(April), g3.200053.2018. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200053>
- Bassini, N., Yáñez, J., Newman, S., Figueroa, R., Oyarzun, M., Erranz, F., & Lhorente, J. (2017). Genetic parameters for resistance to *Caligus rogercresseyi*, *Piscirickettsia salmonis* and body weight in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *472*, 127–127. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/149303/Genetic-parameters-for-resistance.pdf?sequence=1>
- Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alpi, E., Antunes, R., ... Zhang, J. (2017). UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D158–D169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>
- Berry, G., Dekruyff, R. H., Murphy, K. M., Sher, A., Tepper, J. S., Bottomly, K., ... Szabo, S. J. (2002). Distinct Effects of T-bet in TH1 Lineage Commitment and IFN-gamma Production in CD4 and CD8 T Cells. *Science*, *295*(January), 338–342.
- Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., ... Guiguen, Y. (2014). The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4657>
- Bishop, S. C., & Woolliams, J. A. (2014). Genomics and disease resistance studies in livestock. *Livestock Science*, *166*(1), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.034>
- Boxshall, A., & Bravo, S. (2000). On the identity of the common Caligus (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen systems in southern Chile. *Contributions to Zoology*, *69*(12), 137–146.
- Bravo, S., Nuñez, M., & Silva, M. T. (2013). Efficacy of the treatments used for the control of *Caligus rogercresseyi* infecting Atlantic salmon, *Salmo Salar L.*, in a new fish-

- farming location in Region XI, Chile. *Journal of Fish Diseases*, 36(3), 221–228. <https://doi.org/10.1111/jfd.12023>
- Bravo, Sandra, Silva, M. T., & Treasurer, J. (2014). Factors affecting the abundance of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo) on farmed salmonids in Chile in the period 2006-2007. *Aquaculture*, 434, 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.009>
- Brzostowski, J. A., Fey, P., Yan, J., Isik, N., & Jin, T. (2009). The Elmo family forms an ancient group of actin-regulating proteins. *Communicative and Integrative Biology*, 2(4), 337–340. <https://doi.org/10.4161/cib.2.4.8549>
- Bury, N., & Grosell, M. (2003). Iron acquisition by teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - C*, 135, 76490. <https://doi.org/10.1016/S1532-0456>
- Carvajal, J., Gonzalez, L., & George-nascimento, M. (1998). Native sea lice (Copepoda: Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile. *Aquaculture*, 166, 241–246.
- Chavanne, H., Janssen, K., Hofherr, J., Contini, F., Haffray, P., Aquatrace Consortium, ... Bargelloni, L. (2016). A comprehensive survey on selective breeding programs and seed market in the European aquaculture fish industry. *Aquaculture International*, 24(5), 1287–1307. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-9985-0>
- Chen, J., Zeng, F., Forrester, S. J., Eguchi, S., Zhang, M.-Z., & Harris, R. C. (2016). Expression and Function of the Epidermal Growth Factor Receptor in Physiology and Disease. *Physiological Reviews*, 96(3), 1025–1069. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2015>
- Clark, R. A., Erickson, H. P., & Springer, T. A. (1997). Tenascin supports lymphocyte rolling. *Journal of Cell Biology*, 137(3), 755–765. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.3.755>
- Coffer, P. J., & Burgering, B. M. T. (2004). Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4(11), 889–899. <https://doi.org/10.1038/nri1488>
- Conesa, A., Götz, S., García-gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., Genómica, D., ... Valencia, U. P. De. (2005). Blast2GO : a universal tool for annotation , visualization and analysis in functional genomics research, 21(18), 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>
- Connors, J., Krzywinski, M., Schein, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J., & Marra, M. A. (2009). Circos : An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*, 19(9), 1639–1645. <https://doi.org/10.1101/gr.092759.109.19>
- Correa, K., Lhorente, J. P., Bassini, L., López, M. E., Di Genova, A., Maass, A., ... Yáñez, J. M. (2017). Genome wide association study for resistance to *Caligus rogercresseyi* in Atlantic salmon (*Salmo Salar L.*) using a 50K SNP genotyping array. *Aquaculture*, 472, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.008>
- Correa, K., Lhorente, J. P., López, M. E., Bassini, L., Naswa, S., Deeb, N., ... Yáñez, J. M. (2015). Genome-wide association analysis reveals loci associated with resistance against *Piscirickettsia salmonis* in two Atlantic salmon (*Salmo Salar L.*) chromosomes. *BMC Genomics*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2038-7>

- Costello, M. J. (2009). How sea lice from salmon farms may cause wild salmonid declines in Europe and North America and be a threat to fishes elsewhere. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1672), 3385–3394. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0771>
- Emms, D. M., & Kelly, S. (2015). OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biology*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0721-2>
- Fang, G., Bhardwaj, N., Robilotto, R., & Gerstein, M. B. (2010). Getting started in gene orthology and functional analysis. *PLoS Computational Biology*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000703>
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016*. <https://doi.org/978-92-5-306675-9>
- Fast, M. D., Muise, D. M., Easy, R. E., Ross, N. W., & Johnson, S. C. (2006). The effects of *Lepeophtheirus salmonis* infections on the stress response and immunological status of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish and Shellfish Immunology*, 21(3), 228–241. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.11.010>
- Fast, Mark D. (2014). Fish immune responses to parasitic copepod (namely sea lice) infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2), 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.019>
- Gjedrem, T. (2015). Disease Resistant Fish and Shellfish Are within Reach: A Review. *Journal of Marine Science and Engineering*, 3(1), 146–153. <https://doi.org/10.3390/jmse3010146>
- Gjerde, B., Saltkjelvik, B., & Ødegård, J. (2010). Quantitative Genetics Of Salmon Lice Resistance In Atlantic Salmon At Different Life Stages. *October*, (1 L).
- Goddard, M.E., & Hayes, B. J. (2007). Genomic selection-OLD. *J. Anim. Breed. Genet.*, 124, 323–330.
- Goddard, Michael E., & 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. <https://doi.org/10.1038/nrg2575>
- Gonzalez-Pena, D., Gao, G., Baranski, M., Moen, T., Cleveland, B. M., Brett Kenney, P., ... Leeds, T. D. (2016). Genome-wide association study for identifying loci that affect fillet yield, carcass, and body weight traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Genetics*, 7(NOV). <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00203>
- Graham M. Lord, Ravi M. Rao, Hyeryun Choe, Brandon M. Sullivan, Andrew H. Lichtman, F. William Luscinskas, and L. H. G., & Inflammatory. (2005). T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking. *Blood*, 106(10), 3432–3439. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1393>.Supported
- Hamilton-West, C., Arriagada, G., Yatabe, T., Valdés, P., Hervé-Claude, L. P., & Urcelay, S. (2012). Epidemiological description of the sea lice (*Caligus rogercresseyi*) situation in southern Chile in August 2007. *Preventive Veterinary Medicine*, 104(3–4), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.12.002>
- Hardisson, R. C. (2013). Comparative Genomics. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 1(2), 102–105. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00299-0>

- Hatch, W. C., Ganju, R. K., Hiregowdara, D., Avraham, S., Groopman, J. E., Furthmayr, H., ... Sánchez-Madrid, F. (1998). The related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) is tyrosine phosphorylated and participates in colony-stimulating factor-1/macrophage colony-stimulating factor signaling in monocyte-macrophages. *Blood*, *91*(10), 3967–3973. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9573036>
- Hohenlohe, P. A., Amish, S. J., Catchen, J. M., Allendorf, F. W., & Luikart, G. (2011). Next-generation RAD sequencing identifies thousands of SNPs for assessing hybridization between rainbow and westslope cutthroat trout. *Molecular Ecology Resources*, *11*(SUPPL. 1), 117–122. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02967.x>
- Houston, R. D., Taggart, J. B., Cézard, T., Bekaert, M., Lowe, N. R., Downing, A., ... Hamilton, A. (2014). Development and validation of a high density SNP genotyping array for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, *15*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-90>
- J.M. Yáñez,, S. Naswa, M.E. López, L. Bassini, M.E. Cabrejos, J. Gilbey, L. Bernatchez, A. Norris, C. Soto, J. Eisenhart, B. Simpson, R. Neira, J.P. Lhorente, P. Schnable, S. Newman, A. Mileham, N. D. (2014). Development of a 200K SNP Array for Atlantic Salmon: Exploiting Across Continents Genetic Variation. *Proceedings of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, (August), 11–13.
- Johnson, J. L., Monfregola, J., Napolitano, G., Kiosses, W. B., & Catz, S. D. (2012). Vesicular trafficking through cortical actin during exocytosis is regulated by the Rab27a effector JFC1/Slp1 and the RhoA-GTPase-activating protein Gem-interacting protein. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(10), 1902–1916. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-12-1001>
- Jones, S. R. M., Fast, M. D., Johnson, S. C., & Groman, D. B. (2007). Differential rejection of salmon lice by pink and chum salmon: Disease consequences and expression of proinflammatory genes. *Diseases of Aquatic Organisms*, *75*(3), 229–238. <https://doi.org/10.3354/dao075229>
- Keyse, S. M. (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, *27*(2), 253–261. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9123-1>
- Lamalice, L., Le Boeuf, F., & Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation Research*, *100*(6), 782–794. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e>
- Legarra, A., Christensen, O. F., & Aguilar, I. M. (2014). Single Step, A General Approach For Genomic Selection. *Livestock Science*. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.029>
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., & Abrams, C. S. (2002). Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Letters*, *513*(1), 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03243-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03243-4)
- Lhorente, J. P., Gallardo, J. A., Villanueva, B., Araya, A. M., Torrealba, D. A., Toledo, X. E., & Neira, R. (2012). Quantitative genetic basis for resistance to *Caligus rogercresseyi* sea lice in a breeding population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, *324–325*, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.046>
- Li, N., Zhou, T., Geng, X., Jin, Y., Wang, X., Liu, S., ... Liu, Z. (2018). Identification of novel genes significantly affecting growth in catfish through GWAS analysis.

Molecular Genetics and Genomics, 293(3), 587–599. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1406-1>

- Lien, S., Berg, P. R., Hayes, B. J., Davidson, W. S., Kent, M. P., Omholt, S. W., ... Gidskehaug, L. (2011). A dense SNP-based linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals extended chromosome homeologies and striking differences in sex-specific recombination patterns. *BMC Genomics*, 12, 615. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-615>
- Lien, S., Koop, B. F., Sandve, S. R., Miller, J. R., Matthew, P., Leong, J. S., ... Vik, J. O. (2016). The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature*, 533(7602), 200–205. <https://doi.org/10.1038/nature17164>
- Liu, L., Ang, K. P., Elliott, J. A. K., Kent, M. P., Lien, S., MacDonald, D., & Boulding, E. G. (2017). A genome scan for selection signatures comparing farmed Atlantic salmon with two wild populations: Testing colocalization among outlier markers, candidate genes, and quantitative trait loci for production traits. *Evolutionary Applications*, 10(3), 276–296. <https://doi.org/10.1111/eva.12450>
- Mark Costello. (2009). The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of Fish Diseases*, 32(1), 115–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.01011.x>
- McNab, F. W., Rajsbaum, R., Stoye, J. P., & O'Garra, A. (2011). Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Current Opinion in Immunology*, 23(1), 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.10.021>
- Misztal, I., Aggrey, S. E., & Muir, W. M. (2013). Experiences with a single-step genome evaluation. *Poultry Science*, 92(9), 2530–2534. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02739>
- Moghadam, H. K., Ferguson, M. M., & Danzmann, R. G. (2005). Evolution of Hox clusters in salmonidae: A comparative analysis between atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Molecular Evolution*, 61(5), 636–649. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0338-7>
- Moolenaar, W. H., Kranenburg, O., Postma, F. R., & Zondag, G. C. M. (1997). Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 168–173. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80059-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80059-2)
- Ødegård, J., Moen, T., Santi, N., Korsvoll, S., Kjølglum, S., & Meuwisse, T. (2014). Genomic prediction in an admixed population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Genetics*, 5(NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00402>
- Owens, D. M., & Keyse, S. M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 26(22), 3203–3213. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210412>
- Palti, Y., Gao, G., Liu, S., Kent, M. P., Lien, S., Miller, M. R., ... Moen, T. (2015). The development and characterization of a 57K single nucleotide polymorphism array for rainbow trout. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 662–672. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12337>
- Park, S. Y., Schinkmann, K. A., & Avraham, S. (2006). RAFTK/Pyk2 mediates LPA-induced PC12 cell migration. *Cellular Signalling*, 18(7), 1063–1071. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.08.018>

- Pearse, D. E., Barson, N. J., Nome, T., Gao, G., Campbell, M. A., Abadía-Cardoso, A., ... Lien, S. (2018). Sex-dependent dominance maintains migration supergene in rainbow trout. *BioRxiv*, 504621. <https://doi.org/10.1101/504621>
- Portin, P., & Wilkins, A. (2017). The Evolving Definition of a Gene. *Genetics*, 205(11), 1353–1364. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.11.3>
- Presta, M., Dell’Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., & Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16(2 SPEC. ISS.), 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.004>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., ... Sham, P. C. (2007). PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
- Reid, D. P., Szanto, A., Glebe, B., Danzmann, R. G., & Ferguson, M. M. (2005). QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Heredity*, 94(2), 166–172. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800590>
- Robledo, D., Gutierrez, A. P., Barria, A., Lhorente, J. P., & Houston, R. (2018). Discovery and functional annotation of quantitative trait loci affecting resistance to sea lice in Atlantic salmon, (October). <https://doi.org/10.1101/455626>
- Robledo, D., Gutiérrez, A. P., Barría, A., Yáñez, J. M., & Houston, R. D. (2018). Gene expression response to sea lice in Atlantic salmon skin: RNA sequencing comparison between resistant and susceptible animals. *Frontiers in Genetics*, 9(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00287>
- Ruegg, C. R., Chiquet-Ehrismann, R., & Alkan, S. S. (1989). Tenascin, an extracellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(19), 7437–7441. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.19.7437>
- Sernapesca. (2018). Informe sectorial de pesca y acuicultura.
- Skugor, S., Glover, K. A., Nilsen, F., & Krasnov, A. (2008). Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo Salar L.*) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *BMC Genomics*, 9, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-498>
- Soderlund, C., Bomhoff, M., & Nelson, W. M. (2011). SyMAP v3.4: A turnkey synteny system with application to plant genomes. *Nucleic Acids Research*, 39(10). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr123>
- Soderlund, C., Nelson, W., Shoemaker, A., & Paterson, A. (2006). SyMAP: A system for discovering and viewing syntenic regions of FPC maps. *Genome Research*, 16(9), 1159–1168. <https://doi.org/10.1101/gr.5396706>
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), 513–525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
- Tamehiro, N., Nishida, K., Yanobu-Takanashi, R., Goto, M., Okamura, T., & Suzuki, H. (2017). T-cell activation RhoGTPase-activating protein plays an important role in T H 17-cell differentiation. *Immunology and Cell Biology*, 95(8), 729–735.

<https://doi.org/10.1038/icb.2017.27>

- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. Retrieved from <http://www.r-project.org>
- Townsend, M. J., Weinmann, A. S., Matsuda, J. L., Salomon, R., Farnham, P. J., Biron, C. A., ... Glimcher, L. H. (2004). T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and V α 14i NKT cells. *Immunity*, *20*(4), 477–494. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00076-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00076-7)
- Tsai, H. Y., Hamilton, A., Tinch, A. E., Guy, D. R., Bron, J. E., Taggart, J. B., ... Houston, R. D. (2016). Genomic prediction of host resistance to sea lice in farmed Atlantic salmon populations. *Genetics Selection Evolution*, *48*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0226-9>
- Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escárate, C. (2016). *Caligus rogercresseyi* serine proteases: Transcriptomic analysis in response to delousing drugs treatments. *Aquaculture*, *465*, 35–77. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.027>
- Valenzuela-Muñoz, V., Boltaña, S., & Gallardo-Escárate, C. (2017). Uncovering iron regulation with species-specific transcriptome patterns in Atlantic and coho salmon during a *Caligus rogercresseyi* infestation. *Journal of Fish Diseases*, *40*(9), 1169–1184. <https://doi.org/10.1111/jfd.12592>
- Valenzuela-Muñoz, Valentina, & Gallardo-Escárate, C. (2017). Iron metabolism modulation in Atlantic salmon infested with the sea lice *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus rogercresseyi*: A matter of nutritional immunity? *Fish and Shellfish Immunology*, *60*, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.045>
- Veerle, J., & Jozef, G. (2001). Protein phosphatase 2A: a high regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal*, *353*, 417–439.
- Wang, T., Holland, J. W., Martin, S. A. M., & Secombes, C. J. (2010). Sequence and expression analysis of two T helper master transcription factors, T-bet and GATA3, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and analysis of their expression during bacterial and parasitic infection. *Fish and Shellfish Immunology*, *29*(5), 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.016>
- Weis, J. S., Pizarro, J., Bostick, K., Cabello, F., & Burrige, L. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, *306*(1–4), 7–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.020>
- Wiegertjes, G. F., Wentzel, A. S., Spaink, H. P., Elks, P. M., & Fink, I. R. (2016). Polarization of immune responses in fish: The ‘macrophages first’ point of view. *Molecular Immunology*, *69*, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.026>
- Woram, R. A. (2003). Comparative Genome Analysis of the Primary Sex-Determining Locus in Salmonid Fishes. *Genome Research*, *13*(2), 272–280. <https://doi.org/10.1101/gr.578503>
- Yáñez, J. M., Bangera, R., Lhorente, J. P., Barría, A., Oyarzún, M., Neira, R., & Newman, S. (2016). Negative genetic correlation between resistance against *Piscirickettsia salmonis* and harvest weight in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, *459*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.020>

- Yáñez, J. M., Houston, R. D., & Newman, S. (2014). Genetics and genomics of disease resistance in salmonid species. *Frontiers in Genetics*, 5(NOV). <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00415>
- Yáñez, J. M., Lhorente, J. P., Bassini, L. N., Oyarzún, M., Neira, R., & Newman, S. (2014). Genetic co-variation between resistance against both *Caligus rogercresseyi* and *Piscirickettsia salmonis*, and body weight in Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Aquaculture*, 433, 295–298. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.026>
- Zou, J., Carrington, A., Collet, B., Dijkstra, J. M., Yoshiura, Y., Bols, N., & Secombes, C. (2005). Identification and Bioactivities of IFN- in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*: The First Th1-Type Cytokine Characterized Functionally in Fish. *The Journal of Immunology*, 175(4), 2484–2494. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2484>