

800.151
2-151
2005

INFORME FINAL

CORFO OFICINA DE PARTES	
16935-29.07.2005	
PROCEDENCIA	DESTINO
1110-2	15

Código Proyecto	202-3387
Título Proyecto	Desarrollo e implementación de un sistema de evaluación y de manejo de variabilidad genética mediante métodos moleculares de vanguardia para las tres especies salmonideas de importancia en el sistema productivo nacional : Salmón coho, Salmón del atlántico y trucha arcoiris
Empresa Solicitante	Diagnotec S.A.
R.U.T Empresa	78.957.810-9
Entidad Ejecutora	Diagnotec S.A.
Fecha de entrega	29 de Julio 2005

Resumen Ejecutivo

Diagnotec S.A. es una empresa biotecnológica especializada en el diagnóstico y control de enfermedades infecciosas en animales. La misión de la compañía es el desarrollo de productos biotecnológicos para aumentar la eficiencia de los sistemas productivos animales. Diagnotec actualmente usa tecnología de avanzada, desarrollada "in house" y ofrece servicios de diagnóstico molecular de patógenos a la industria acuícola y porcina.

En el sector acuícola, los servicios de diagnóstico se han enfocado principalmente al "screening" de reproductores, con objeto de evitar la diseminación del virus IPN y de las bacterias BKD y SRS a la generación de peces siguiente.

Diagnotec ha sido pionero en introducir métodos moleculares de diagnóstico en la industria acuícola nacional. El hecho de contar con estos servicios tecnológicos, ha permitido a Diagnotec mantenerse cerca de la industria y comprender las necesidades emergentes para poder continuar con desarrollos propios. De esta forma, se gestó el presente proyecto, con el fin de implementar el servicio de evaluación de variabilidad genética en peces como una herramienta complementaria y certera para mejorar el cruzamiento de los reproductores de salmón.

La Salmonicultura a nivel mundial representa un área económica importante con notables y constantes avances en su producción, como una respuesta a una creciente demanda. En nuestro país, estos avances productivos se ven claramente reflejados en los niveles de exportación de salmón y trucha, los cuales aumentaron a una tasa anual de 25.4% en el decenio 1990-2000. Aunque la salmonicultura se identifica como una de las actividades nacionales con mayor desarrollo y potencial, existe un notable contraste con respecto a la utilización de herramientas biotecnológicas, especialmente genéticas y moleculares, que actualmente se aplican a nivel mundial. Un claro ejemplo de esto, corresponde a los esfuerzos que se han realizado en la secuenciación masiva de los genomas de Trucha arcoiris y Salmón del Atlántico, la búsqueda de marcadores moleculares relacionados con características fenotípicas (QTLs) y de resistencia a enfermedades (bacterianas y virales), programas de selección asistida utilizando microsatélites y expresión génica, entre otros (Gjedrem, 2000). La utilización y el desarrollo de estas herramientas ha permitido, a países Europeos, mejorar en forma significativa la eficiencia de la producción y calidad del producto, lo cual a su vez se relaciona directamente con una mayor ventaja competitiva del producto en el mercado. De esta forma, en la actualidad existe una clara y urgente necesidad de desarrollar e implementar, en el ámbito de la Salmonicultura nacional, herramientas moleculares que permitan generar este mismo tipo de ventajas competitivas.

En la actualidad una parte de las empresas chilenas dedicadas a la industria del salmón cuentan con planes de manejo genético que se basan exclusivamente en un programa de selección por características fenotípicas o externas. Estas empresas están muy interesadas en tener una herramienta que les permita

evaluar que el manejo genético que están realizando es el adecuado. Sin embargo, las empresas que desarrollan programa de selección y/o de mejora genética no cuentan con laboratorios especializados para realizar este tipo de estudios. Basándonos en esto y en la experiencia adquirida por Diagnostec S.A. en el desarrollo y uso de técnicas moleculares de vanguardia, se ha desarrollado e implementado un sistema de evaluación de la variabilidad genética mediante el uso de microsatélites, con el fin de realizar planes de cruzamientos dirigidos que eviten las cruzas entre individuos emparentados (inbreeding). Esto se ha implementado para las tres especies salmonídeas de importancia en el sistema productivo nacional: Salmón coho, Salmón del atlántico y trucha arcoiris.

Diagnostec ya ha comenzado a introducir técnicas moleculares de monitoreo genético al sector a costos convenientes y competitivos para mejorar los programas de manejo genético establecidos e iniciar programas en empresas que aún no cuentan con ello, de manera de optimizar los parámetros productivos repercutiendo positivamente sobre los costos de producción.

Con el servicio propuesto se espera provocar beneficios a nivel de reducción de los siguientes costos de producción:

- Disminución de mortalidad de los peces por disminución de deformaciones
- Aumento de los ingresos por aumento de las toneladas producidas.

A) Exposición del Problema

Tal como se ha mencionado y en relación al proyecto propuesto, Diagnostec ha detectado a través del servicio la necesidad de la industria salmonera de manejar sus programas genéticos con herramientas más certeras y que además le permitan ahorrar tiempo, con lo cual disminuyen notoriamente sus costos de producción, lo que hoy es un requerimiento obligado para mantenerse con éxito en el sector. Por este motivo con el proyecto de innovación propuesto se espera poder introducir nuevas prácticas de avanzada al sistema productivo, de manera de lograr la introducción de métodos moleculares complementarios para el manejo genético de los peces, basándose en el éxito que han tenido estas técnicas en otros sistemas intensivos animales, tales como aves y cerdos, donde son utilizados como prácticas rutinarias. Esta es una línea que presenta grandes proyecciones en el país, ya que una vez que se den los primeros pasos quedarán muchos desafíos por resolver, como por ejemplo: determinación de origen, de sexo y selección asistida por diversos marcadores. Cabe destacar que esta metodología no busca la manipulación genética (transgenia), sólo pretende detectar y seleccionar el potencial genético de las especies cultivadas existentes en nuestro país.

En la actualidad algunas de las empresas chilenas dedicadas a la industria del salmón que cuentan con planes de manejo genético basados en programas de selección por características fenotípicas requieren de herramientas de evaluación del manejo genético que están realizando y las empresas que no cuentan con ningún plan de manejo de selección asistida, reconocen su urgente necesidad y aplicación. La necesidad de

este tipo de manejo asistido esta basada fundamentalmente en seleccionar adecuadamente los individuos destinados a ser los fundadores de próximas generaciones, y en realizar los cruzamientos en forma adecuada. Estos dos aspectos, claramente implican mantener un correcto nivel de variabilidad genética y evitar el efecto de consanguinidad. En sistemas cerrados de cultivo estos dos últimos factores son muy importantes a considerar.

En consecuencia, con estos antecedentes en la actualidad, es casi imposible pensar en el desarrollo del cultivo de cualquier organismo vertebrado, invertebrado o vegetal, sin incorporar planes de manejo de selección asistida, utilizando herramientas genéticas.

Los objetivos técnicos del proyecto son:

Objetivo general

Con la ejecución del proyecto de innovación tecnológica se espera desarrollar un sistema para evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de los salmones, coho del atlántico y trucha arcoiris, basada en la técnica molecular de microsatélites. Con el fin que las poblaciones de estas especies manifiesten cualidades superiores en características tales como peso, talla, resistencia a enfermedades, generación tras generación. Todo esto permitiría desarrollar las bases para un programa de mejora genética en el futuro.

Objetivos específicos

Mediante la implementación de la técnica de amplificación de microsatélites por PCR para la mejora genética de las especies de salmón coho, salmón del Atlántico y trucha arcoiris, Diagnostec S.A. pretende alcanzar los siguientes objetivos:

- 1.- Implementar y optimizar la técnica molecular de microsatélites para el análisis del grado actual de "inbreeding" en progenitores de las especies mencionadas
- 2.- Aplicar esta técnica en un grupo de progenitores para realizar cruzamientos que aseguren poblaciones con una elevada diversidad genética.
- 3.- Definir un sistema de implementación y comercialización de los nuevos servicios

El cumplimiento de estos objetivos permitió la concreción de un servicio de evaluación molecular de la variabilidad genética mediante el uso de microsatélites, elaboración de pedigrees, con el fin de realizar planes de cruzamientos dirigidos que eviten las cruas entre individuos emparentados (inbreeding). Esto se ha implementado para el Salmón coho, Salmón del atlántico y trucha arcoiris.

B) Metodología y Plan de Trabajo

1.- Obtención de muestras de salmón coho, salmón del atlántico y trucha arco iris.

Se realizaron visitas a los Centros de cultivo de las empresas Yadran, Pacific Star, Mainstream, participantes en el proyecto, con el fin de tomar muestras de tejido de distintas familias de Salmón coho, de Salmón del Atlántico y de Trucha arco iris.

2.- Ordenamiento de las muestras de acuerdo a información de pedigree:

Con el fin de realizar un análisis de las muestras que tenga mayor consistencia, se intentó ordenarlas de acuerdo a la información de pedigree que se había obtenido previamente. Sin embargo, la mayoría de las empresas no dispone de estos datos o son parciales, ya que están recién comenzando a trabajar con familias de peces seleccionados bajo ciertas características genéticas, manteniéndose estos grupos más o menos aislados.

3.- Extracción de DNA genómico de salmón coho, salmón del atlántico y Trucha arco iris

Se probaron distintos protocolos de extracción de DNA de acuerdo al tipo de tejido seleccionado: 3.a) Para tejido muscular: se realizó una digestión utilizando un solución tampón (Tris-HCl, EDTA, NaCl y SDS), proteinasa K y una posterior extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. 3.b) Para tejido adiposo: se realizó un procedimiento similar, solo que se utilizó como solución tampón una solución de CTAB y la precipitación se realizó con isopropanol.

4.- Optimización de la amplificación de microsatélites específicos de salmón coho, salmón del Atlántico y trucha arco iris por PCR.

Inicialmente se utilizaron las condiciones descritas originalmente para cada uno de los locus seleccionados. En los casos en donde estas condiciones no dieron resultados adecuados, se modificó y optimizó las condiciones de la reacción de PCR, con el fin de obtener productos de amplificación específicos y claros, que faciliten el análisis de los resultados. Se probaron concentraciones de partidores desde 0,25 pM a 5 pM y de Magnesio desde 1,5 a 3,5 mM. El programa de PCR estándar utilizado corresponde 94°Cx3', 94°Cx30", 55°Cx1', 72°Cx30" y 72°Cx5'. Además se realizaron gradientes de temperatura desde 50°C a 58°C y se probaron concentraciones de DNA de 40, 50, 60, y 80 ng/μL.

5.- Resolución o visualización de microsatélites específicos de salmón coho, salmón del atlántico y trucha arco iris

Se utilizó distintos tipos de microsatélites comunicados personalmente por diferentes investigadores o descritos en literatura y clonados a partir de salmónidos, con el fin de determinar su comportamiento y variabilidad dentro de una población de peces definida, de modo que, permita una interpretación certera de los resultados.

Para salmón coho se probaron distintos pares de partidores para amplificar por PCR las secuencias correspondientes a los microsatélites A1CH, B18CH, C19CH, D10CH y E13CH (Smith y colaboradores, 1998).

Para salmón del atlántico se probaron 10 pares de partidores para amplificar por PCR las secuencias correspondientes a los microsatélites SS1, SS2, SS3, SS4, SS5, SS6, SS7, SS8, SS9 y SS10 (los códigos de los loci, corresponden a códigos internos de Diagnostec S.A.) (Primmer y col., 2003).

Para trucha arco iris se probaron distintos pares de partidores para amplificar por PCR las secuencias correspondientes a 10 microsatélites. TA1, TA2, TA3, TA4, TA5, TA6, TA7, TA8, TA9 y TA10 (los códigos alfanuméricos corresponde a códigos internos de la empresa).

6.- Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding"

Se realizó un análisis de variabilidad genética mediante la comparación de los productos de PCR obtenidos entre los distintos individuos de una familia, con el fin de determinar los procesos de "inbreeding" y diseñar cruzamientos dentro de cada uno de los grupos.

7.- Nivel de parentesco entre individuos analizados

Se determinó el nivel de parentesco entre los individuos analizados mediante el uso de un programa computacional, que realiza tanto de análisis molecular como estadístico, con el cual se puede elaborar pedigrees.

Bibliografía

Smith, C.T., Koop, B.F. & Nelson, R.J. 1998. Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids. *Mol. Ecol.* 16:1613-1621

Primmer, C.R., Landry, P.A., Ranta, E., Merila, J., Piironen, J., Tiira, K., Peuhkuri, N., Pakkasma, S. & Eskelinen, P. 2003. Prediction of offspring fitness based on parental genetic diversity in endangered salmonid populations. *J. Fish. Biol.* 63:909-927.

Gjedrem, T. 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture* 31:25-33.

Actividades realizadas durante esta etapa:

- 1.- Obtención de muestras de salmón coho
- 2.- Ordenamiento de las muestras de acuerdo a información de pedigree
- 3.- Extracción de DNA genómico de salmón coho
- 4.- Optimización de la amplificación de microsatélites específicos de salmón coho por PCR.
- 5.- Resolución o visualización de microsatélites específicos de salmón coho
- 6.- Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding"
- 7.- Nivel de parentesco entre individuos analizados
- 8.- Preparación Informe de Avance 1
- 9.- Obtención de muestras de *Salmo Salar* (Salmón del Atlántico)
- 10.- Ordenamiento de las muestras de acuerdo a información de pedigree
- 11.- Extracción de DNA genómico de Salmón del Atlántico
- 12.- Optimización de la amplificación de microsatélites específicos de Salmón del Atlántico por PCR
- 13.- Resolución o visualización de microsatélites específicos de Salmón del Atlántico
- 14.- Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding"
- 15.- Nivel de parentesco entre individuos analizados
- 16.- Preparación Informe de Avance 2
- 17.- Obtención de muestras de trucha arco iris
- 18.- Ordenamiento de las muestras de acuerdo a información de pedigree
- 19.- Extracción de DNA genómico de trucha arco iris
- 20.- Optimización de la amplificación de microsatélites específicos de trucha arco iris por PCR.
- 21.- Resolución o visualización de microsatélites específicos de trucha arco iris
- 22.- Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding"
- 23.- Nivel de parentesco entre individuos analizados
- 24.- Preparación Informe de Final

Id	Icono	Nombre de tarea	Duración	2003												2004		
				ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	ene		
1	■	1.- Obtención de muestra de salmón coho	40 días				■											
2	■	2.- Ordenamiento de las muestras de acuerdo a información de	40 días				■	■										
3	■	3.- Extracción de DNA genómico de salmón coho	60 días						■	■								
4	■	4.- Optimización de la amplificación de microsatélites específicos	60 días							■	■							
5	■	5.- Resolución o visualización de microsatélites específicos de s:	64 días								■	■						
6	■	6.- Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding	22 días										■					
7	■	7.- Nivel de parentesco entre individuos analizados	20 días											■				
8	■	8.- Preparación Informe de Avance	20 días												■			
9	■	9.- Obtención de muestra de salmón del atlántico	40 días														■	
10	■	10.- Ordenamiento de las muestras de acuerdo a información de	40 días														■	
11	■	11.- Extracción de DNA genómico de salmón del atlántico	60 días														■	
12	■	12.- Optimización de la amplificación de microsatélites específico	60 días														■	
13	■	13.- Resolución o visualización de microsatélites específicos de :	64 días														■	
14	■	14.- Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding	22 días														■	
15	■	15.- Nivel de parentesco entre individuos analizados	32 días														■	
16	■	16.- Preparación Informe de Avance	32 días														■	
17	■	17.- Obtención de muestra de trucha arcoiris	40 días														■	
18	■	18.- Ordenamiento de las muestras de acuerdo a información de	40 días														■	
19	■	19.- Extracción de DNA genómico de trucha arcoiris	60 días														■	
20	■	20.- Optimización de la amplificación de microsatélites específico	60 días														■	
21	■	21.- Resolución o visualización de microsatélites específicos de	64 días														■	
22	■	22.- Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding	22 días														■	
23	■	23.- Nivel de parentesco entre individuos analizados	34 días														■	
24	■	24.- Preparación informe Final	34 días														■	

María Gloria Acharán Toledo
 NOTARIA 42
 NOTARIO - SANTIAGO

Proyecto: gantt fontec 2002
 Fecha: abr 2 '03

Tarea	■	Resumen	▾	Progreso resumido	▬
División	Tarea resumida	■	Tareas externas	▬
Progreso	▬	División resumida	Resumen del proyecto	▾
Hito	◆	Hito resumido	◇		

Id	Icono	Nombre de tarea	2005												ene	feb	mar	abr
			feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic					
1	RE	1.- Obtención de muestra de salmón coho																
2	RE	2.- Ordenamiento de las muestras de acuerdo a información de																
3	RE	3.- Extracción de DNA genómico de salmón coho																
4	RE	4.- Optimización de la amplificación de microsatélites específicos																
5	RE	5.- Resolución o visualización de microsatélites específicos de s:																
6	RE	6.- Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding																
7	RE	7.- Nivel de parentesco entre individuos analizados																
8	RE	8.- Preparación Informe de Avance																
9	RE	9.- Obtención de muestra de salmón del atlántico																
10	RE	10.- Ordenamiento de las muestras de acuerdo a información de																
11	RE	11.- Extracción de DNA genómico de salmón del atlántico	█															
12	RE	12.- Optimización de la amplificación de microsatélites específic	█															
13	RE	13.- Resolución o visualización de microsatélites específicos de:		█														
14	RE	14.- Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding				█												
15	RE	15.- Nivel de parentesco entre individuos analizados						█										
16	RE	16.- Preparación Informe de Avance							█									
17	RE	17.- Obtención de muestra de trucha arcoiris								█								
18	RE	18.- Ordenamiento de las muestras de acuerdo a información de									█							
19	RE	19.- Extracción de DNA genómico de trucha arcoiris										█						
20	RE	20.- Optimización de la amplificación de microsatélites específic											█					
21	RE	21.- Resolución o visualización de microsatélites específicos de:												█				
22	RE	22.- Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding													█			
23	RE	23.- Nivel de parentesco entre individuos analizados														█		
24	RE	24.- Preparación Informe Final															█	

María Gloria Acharán Toledo
 NOTARIA 42
 NOTARIO - SANTIAGO

Proyecto: gantt fontec 2002 Fecha: abr 2 '03	Tarea	█	Resumen	▾	Progreso resumido	█
	División	Tarea resumida	█	Tareas externas	▭
	Progreso	█	División resumida	Resumen del proyecto	▾
	Hito	◆	Hito resumido			

D) Resultados Obtenidos

Extracción de DNA genómico de salmón coho, salmón del atlántico y Trucha arco iris

Se probaron distintos protocolos de extracción de DNA de acuerdo al tipo de tejido seleccionado: Para tejido muscular y adiposo se realizó un procedimiento similar. Ambos tejidos generan un rendimiento relativamente similar de DNA extraído. Sin embargo la obtención de tejido adiposo, representa un método menos invasivo.

Optimización de la amplificación de microsatélites específicos de salmón coho, salmón del Atlántico y trucha arco iris por PCR.

Según los resultados obtenidos las condiciones óptimas para salmón coho se definieron como: 0,4 μM de partidores, 2,5 μM de Magnesio, 50°C de temperatura de anealing y utilizando 60-80 ng/ μL de DNA como templado.

Según los resultados obtenidos las condiciones óptimas para salmón del atlántico se definieron como: 0.2-0,4 μM de partidores, 1.5-2,5 μM de Magnesio, 50°C de temperatura de annealing o un gradiente de 52°C a 60°C y 30-60 ng/ μL de DNA como templado.

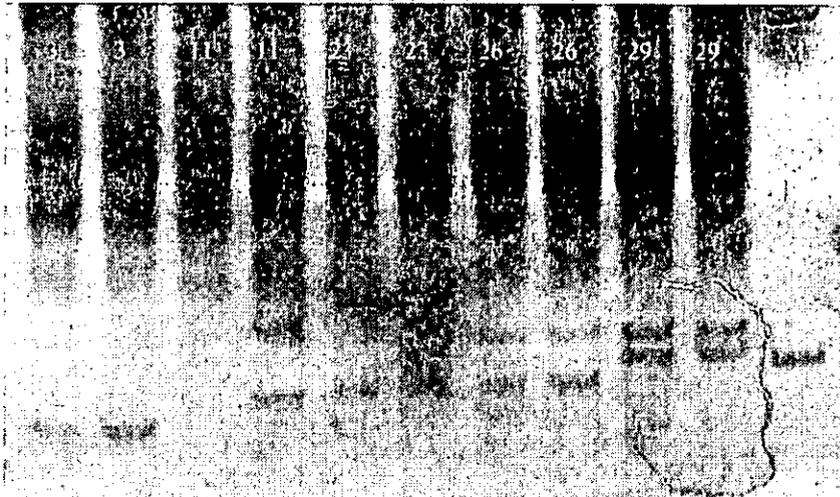
Según los resultados obtenidos las condiciones óptimas para trucha arco iris se definieron como: 0,3 μM de partidores, 2,0 μM de Magnesio, 53°C de temperatura de anealing y utilizando 60-80 ng/ μL de DNA como templado.

Resolución o visualización de microsatélites específicos de salmón coho, salmón del atlántico y trucha arco iris

Para salmón coho se seleccionaron los partidores A1CH y B18CH para analizar las muestras. Posteriormente se buscó una alternativa a B18CH, ya que entregaba una menor variabilidad que A1CH. Se realizaron pruebas con el partidore F101CH, obteniéndose una buena variabilidad con éste. Actualmente utilizamos fundamentalmente A1CH y B101CH para el análisis de las muestras.

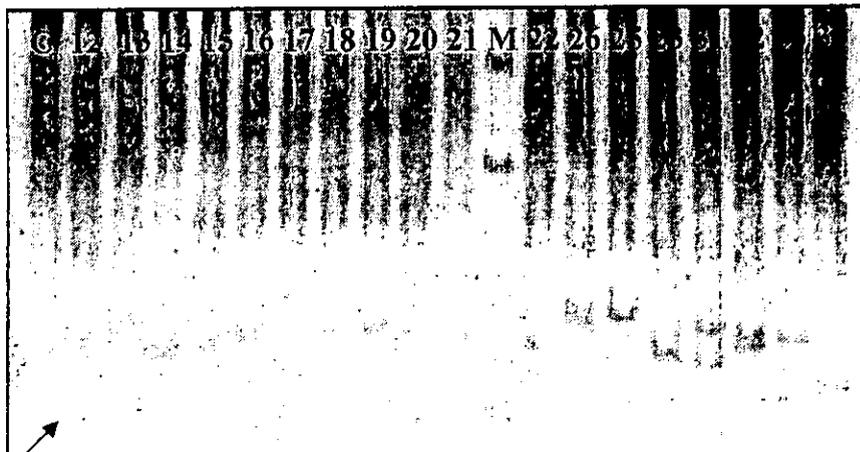
En la siguiente figura se muestra un gel de poliacrilamida al 8%, teñido con plata, en el cual se sometieron a electroforesis los productos obtenidos con los partidores que amplifican la secuencia correspondiente al microsatélite A1CH. Los números corresponden a códigos internos de Diagnostec respecto de muestras y M al marcador de peso molecular. En los distintos carriles se pueden observar las

bandas correspondientes a los productos de amplificación obtenidos de los diferentes alelos de las muestras 3, 11, 23, 26 y 29.



Para salmón del atlántico se seleccionaron los partidores SS1 y SS2 para analizar las muestras los cuales son utilizados fundamentalmente para el análisis de las muestras comerciales.

En la siguiente figura se muestra otro ejemplo de un gel de poliacrilamida al 8%, teñido con plata, en el cual se sometieron a electroforesis los productos obtenidos con los partidores que amplifican la secuencia correspondiente al microsatélite SS1. Los números corresponden a códigos internos de Diagnotec respecto de muestras, C al control de PCR y M al marcador de peso molecular. En los distintos carriles se pueden observar las bandas correspondientes a los productos de amplificación obtenidos de los diferentes alelos de las muestras.



Alelo

Para trucha arco iris se seleccionaron los partidores TC1, TC2 y TC3 para analizar las muestras.

Análisis de la diversidad genética y procesos de "inbreeding"

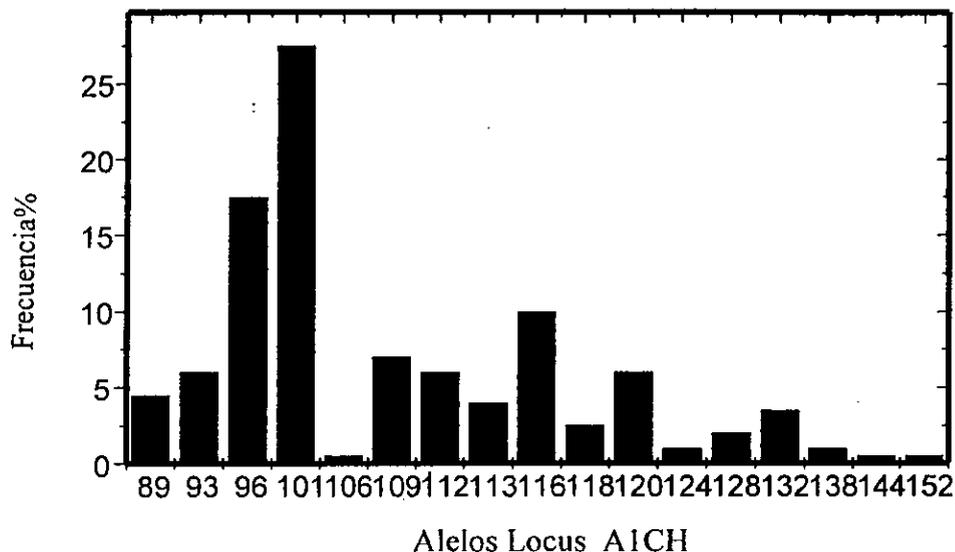
A continuación se presentan los resultados obtenidos del análisis de una porción de aproximadamente 0,1 g de aleta adiposa de un grupo de 184 salmones coho (grupo X). El análisis fue realizado mediante extracción de DNA, amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de secuencias de microsatélites, resolución con geles de poliacrilamida y estimación de los tamaños (peso molecular) de los alelos obtenidos. Una vez obtenido el tamaño de los alelos, se procedió al cálculo de índices de variabilidad genética tales como, número de alelos por locus, distribución de la frecuencia de los alelos y representativos porcentaje de heterogocidad. Finalmente se realizó la reconstrucción de la historia genealógica o pedigree utilizando la información de los genotipos.

Se recibieron las 184 muestras de un grupo X con códigos desde el 126 al 492. Tres individuos fueron eliminados de acuerdo a la información proporcionada por la empresa (códigos 228, 230 y 410). Asimismo, 17 ejemplares (9.2%) no fueron incluidos en los análisis de variabilidad y pedigree debido a su condición homocigota (códigos 126, 142, 166, 172, 216, 234, 250, 268, 270, 282, 312, 318, 320, 396, 404 y 412). Aunque estos ejemplares aparentemente no presentan modificaciones significativas en sus estándares de producción (tales como peso, crecimiento), no fueron incluidos debido a que la condición homocigota podría implicar una reducción en su variabilidad genética.

Los análisis de los locus A1CH y B18CH indican una reducida a moderada variabilidad genética para el grupo X, con valores de porcentajes de heterogocidad y número de alelos de 0.78 y 17, y 0.10 y 4, para los locus A1CH y B18CH, respectivamente. Como una forma de comparación, en un estudio reciente realizado en poblaciones salvajes de salmón coho en USA, en el cual se consideraron solamente 23 individuos, los valores de los índices comentados fueron para el locus A de 0.91 y 13, respectivamente. De esta forma por ejemplo, aunque en el presente grupo X se han analizado más de 100 individuos, solamente se detectaron 4 nuevos alelos con respecto al análisis de poblaciones salvajes.

La siguiente figura señala la distribución de las frecuencias de los alelos, la cual también indica un sesgo en sus frecuencias de ocurrencias. Por ejemplo, para el locus A1CH los alelos 101 y 152 presentan un claro

sesgo en su frecuencia y una situación similar se presenta en el locus B18CH. Esto podría estar relacionado con la selección sucesiva a lo largo de varias generaciones de individuos fundadores



emparentados, lo que haría prevalecer la frecuencia de un determinado alelo.

Ahora, se presentan los resultados obtenidos del análisis de una porción de aproximadamente 0,1 g de aleta adiposa de un grupo de 292 individuos de Salmón del Atlántico (grupo W). El análisis fue realizado mediante extracción de DNA, amplificación por PCR de secuencias de microsatélites, resolución con geles de poliacrilamida y estimación de los tamaños (peso molecular) de los alelos obtenidos. Una vez obtenido el tamaño de los alelos, se procedió al cálculo de índices de variabilidad genética, tales como: número de alelos por locus, distribución de la frecuencia de los alelos y alelos representativos, porcentaje de heterocidad. Finalmente, se realizó la reconstrucción de la historia genealógica o pedigree utilizando la información de los genotipos.

Los códigos del grupo W van desde el 347 al 2360 (los códigos numéricos no van en orden correlativos).

De acuerdo al análisis de ambos loci (Locus SS1 y SS2), se obtuvieron 14 ejemplares (4.8%) homocigotos, cuatro hembras (códigos 421,507,525,559) y 10 machos (códigos 1761,2073,2074,2110,2146,2266,2269,2270,2273,2329). También, 10 pares de ejemplares compartieron una condición genotípica idéntica (en ambos loci). Por ejemplo, los ejemplares 348 y 556, presentaron el mismo genotipo. Lo mismo sucedió para los ejemplares 419/480, 448/2249, 468/511, 485/499, 519/1828, 520/540, 2061/2281, 2063/2081 y 2228/2327. No obstante, no se observó ningún individuo con una condición homocigota en ambos loci.

El valor de heterocidad esperada para ambos sexos fue de 0.94. Considerando los dos loci evaluados, se obtuvo un total de 35 y 32 alelos para el locus SS1 y SS2, respectivamente.

La distribución de las frecuencias de los alelos (considerando machos y hembras) indica una dinámica molecular y genética similar para ambos loci (Figura 1). Por ejemplo, para el locus SS1, se observa una distribución unimodal, es decir, existe un grupo de tamaños de alelos estabilizado con una tendencia homogénea. Esto implica que los procesos de selección de cruzamientos dentro de este grupo de salares habría logrado un equilibrio, estabilizando los alelos presentes en la población. Asimismo, es importante destacar el amplio rango de tamaños de alelos obtenidos, lo cual sugiere que existe una gran diversidad genética.

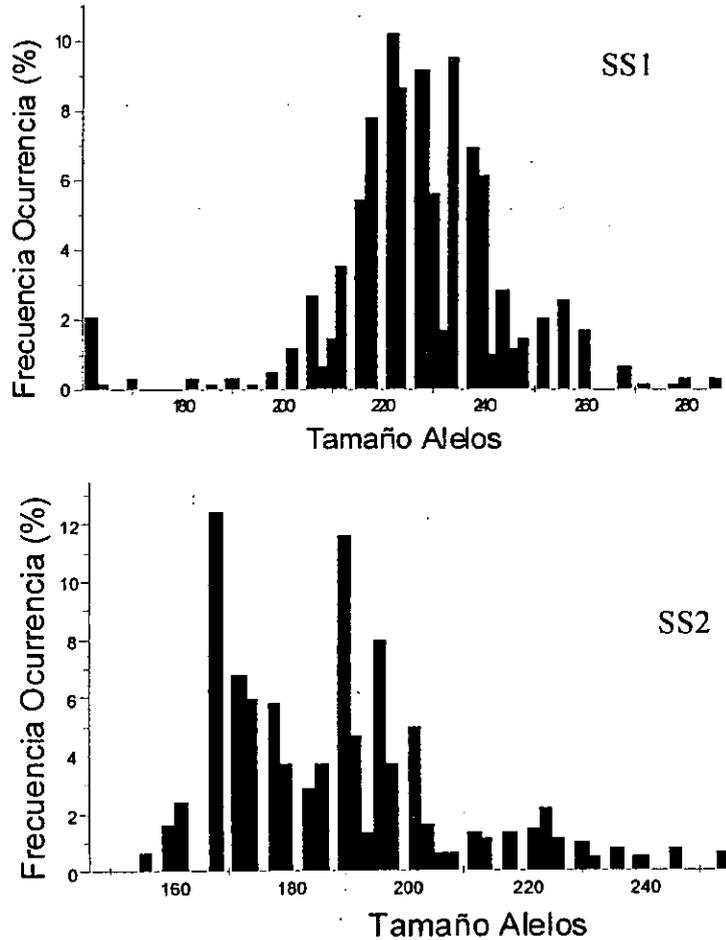


Figura 1. Distribución de la frecuencia de ocurrencia (%) de los diferentes tamaños de alelos detectados en ambos loci.

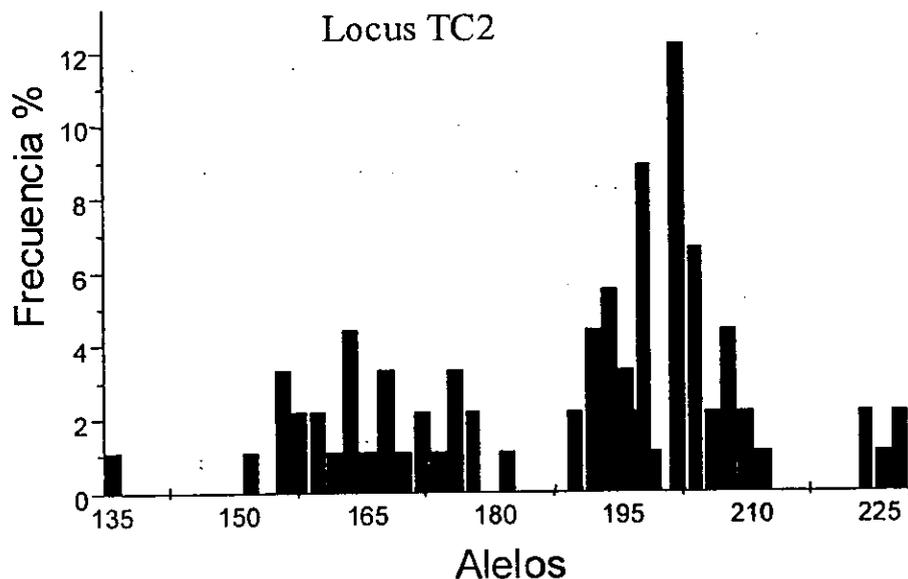
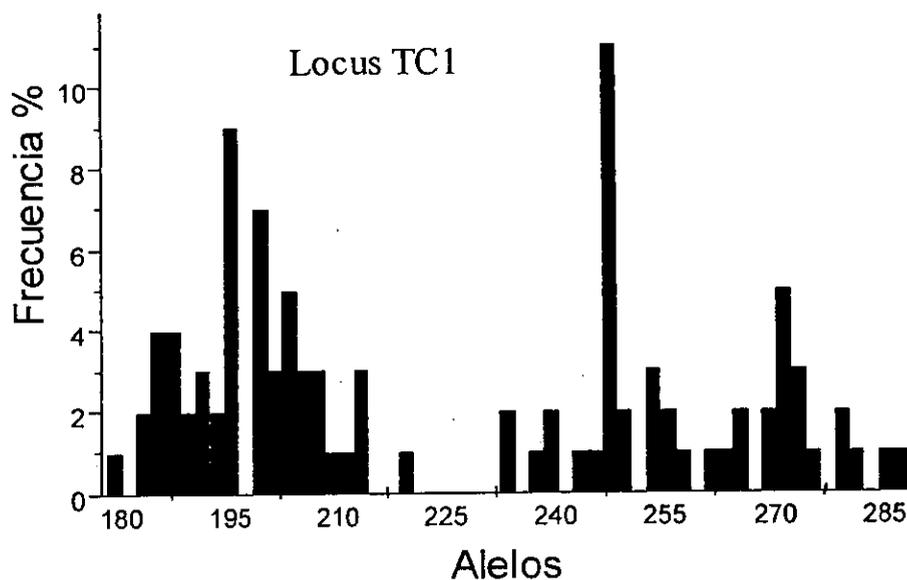
Finalmente, se presentan los resultados obtenidos del análisis de una porción de aproximadamente 0,1 g de aleta adiposa de un grupo de 155 Trucha arco iris (conformado dos grupos, 1 y 2). El análisis fue realizado mediante extracción de DNA, amplificación por PCR de secuencias de microsatélites, resolución con geles de poliacrilamida y estimación de los tamaños (peso molecular) de los alelos obtenidos. Una vez obtenido el tamaño de los alelos, se procedió al cálculo de índices de variabilidad genética tales como, número de alelos por locus, distribución de la frecuencia de los alelos y representativos porcentaje de heterogocidad. Finalmente se realizó la reconstrucción de la historia genealógica o pedigree utilizando la información de los genotipos.

Grupo Trucha Arco iris 1

Para el grupo 1 fueron colectadas 52 muestras con códigos desde el 9649 al 9704 Cuatro individuos fueron eliminados de acuerdo a la información proporcionada por la empresa Mainstream S.A (códigos 9663, 9665, 9666 y 9675) y otros cuatro individuos (códigos 9677, 9679, 9693 y 9696) fueron evaluados solamente en su nivel de varianbilidad, a solicitud de la empresa. Aunque fueron detectados individuos homocigótos con un locus, no se detecto ningún individuo homocigóto en ambos locus. El individuo con código 9691, no pudo ser analizado con ambos locus debido a la reducida calidad de DNA extraído, por lo tanto no fue incluido en los análisis.

Los análisis de los locus TC1, TC2 y TC3 indican una moderada a buena variabilidad genética para el grupo 1, con valores, por ejemplo, de porcentajes de heterogocidad y número de alelos de 0.94 y 13, y 0.93 y 18 para los locus TC1 y TC2, respectivamente.

La distribución de las frecuencias de los alelos en ambos locus indica una distribución multimodal en sus ocurrencias. Es decir se pueden diferenciar dos grupos de alelos. En relación con los individuos evaluados sólo en el aspecto de variabilidad, no se determino una frecuencia de alelos diferentes al resto de la población ni tampoco una mayor ocurrencia de homocigótos.

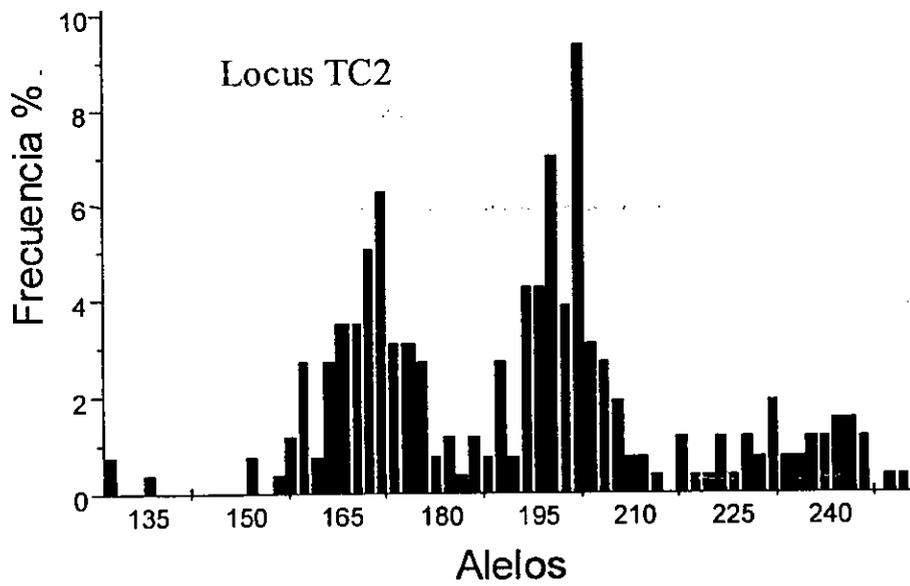
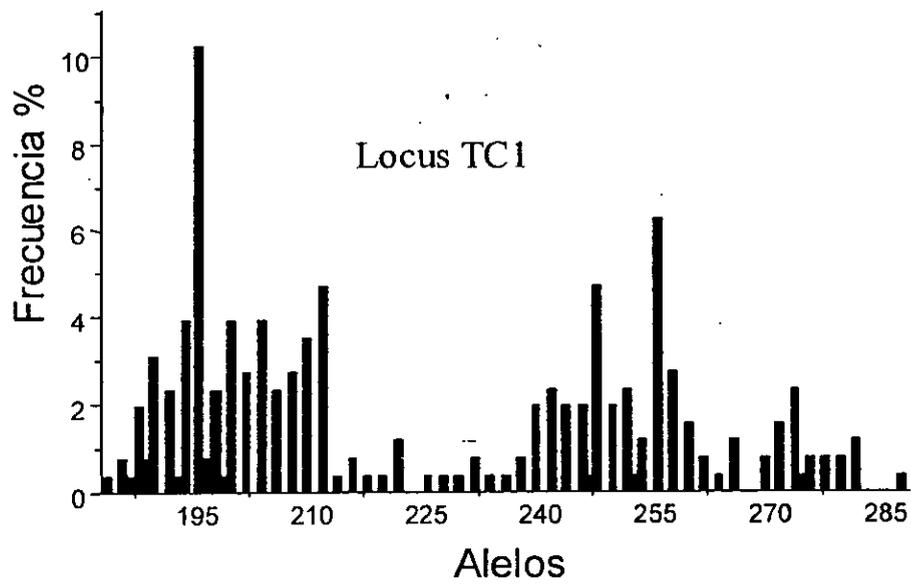


Grupo Trucha Arco iris 2

Para el grupo 2 fueron recibidas 103 muestras con códigos desde el 9705 al 9810. Tres individuos fueron eliminados de acuerdo a la información proporcionada por la empresa Mainstream S.A (códigos 9705, 9755 y 9800) y otros seis individuos (códigos 9739, 9759, 9760, 9774, 9776 y 9805) fueron evaluados solamente en su nivel de variabilidad, a solicitud de la empresa. Aunque fueron detectados individuos homocigotos con un locus, no se detectó ningún individuo homocigoto en ambos locos.

Los análisis de los locus TC1, TC2 y TC3 indican una moderada a buena variabilidad genética para el grupo 2, con valores, por ejemplo, de porcentajes de heterocidad y número de alelos de 0.89 y 12, y 0.90 y 17 para los locus TC1 y TC2, respectivamente.

La distribución de las frecuencias de los alelos en ambos locus indica una distribución multimodal en sus ocurrencias. Es decir se pueden diferenciar dos grupos de alelos. En relación con los individuos evaluados sólo en el aspecto de variabilidad, no se determinó una frecuencia de alelos diferentes al resto de la población ni tampoco una mayor ocurrencia de homocigotos.



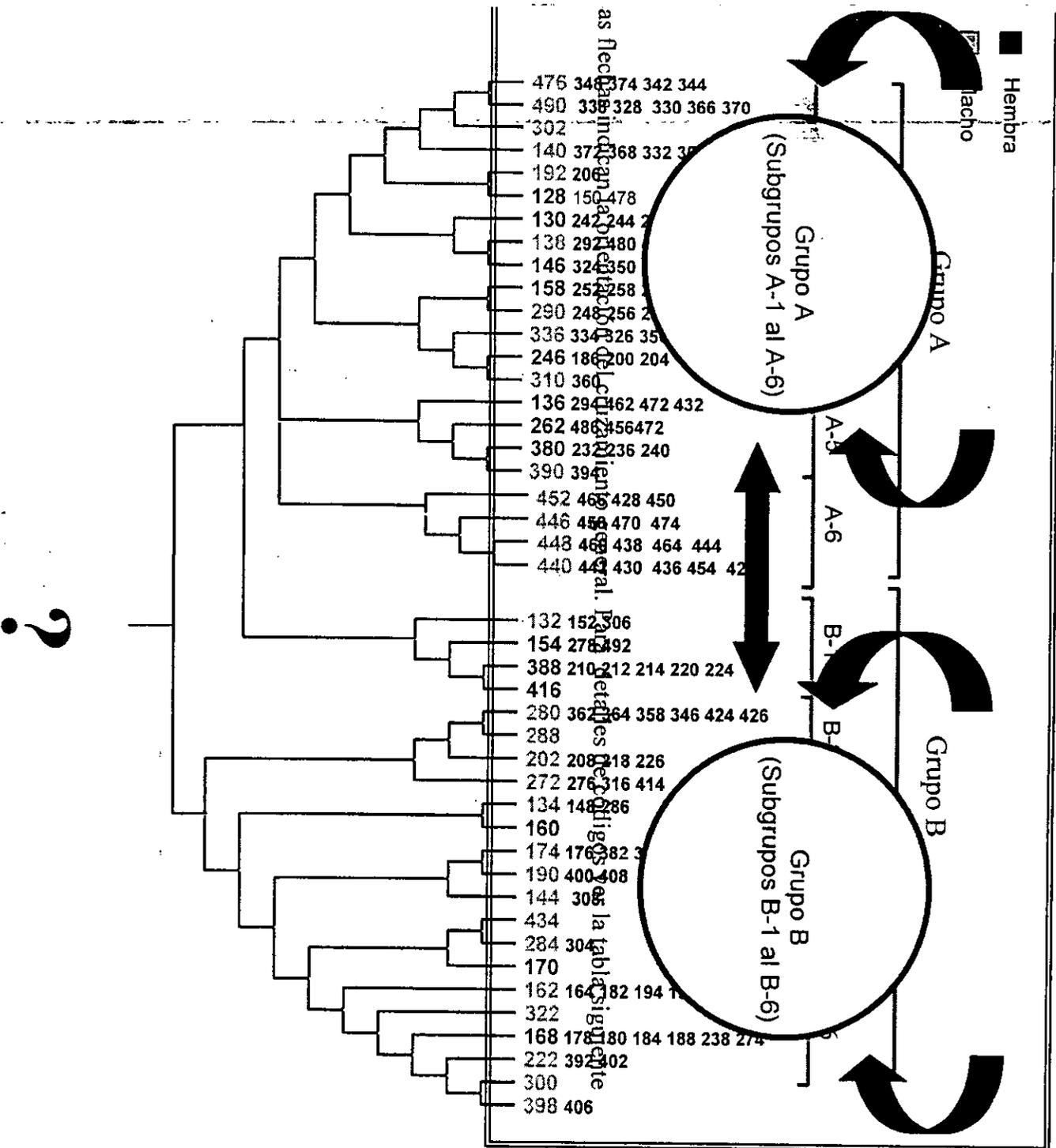
Nivel de parentesco entre individuos analizados

Debido a la reducida a moderada variabilidad genética del grupo X de salmón coho, que implica un gran número de individuos con genotipos idénticos, y al desconocimiento de la historia genealógica de los ejemplares analizados, es muy difícil desarrollar un modelo de selección de fundadores basado únicamente en la información de los genotipos obtenidos. De hecho, de los 164 individuos que fueron incluidos en el análisis, se obtuvieron solamente 40 genotipos diferentes (24.4%) en al menos uno de los alelos. De esta forma, se procedió a reconstruir la historia genealógica más probable del grupo X y la selección de los fundadores se realizó de acuerdo a grupos de individuos que comparten genotipos similares (consanguíneos) en al menos uno de los alelos. Este último tipo de análisis es más avanzado que la selección de fundadores basado solamente en genotipos.

La siguiente figura representa la reconstrucción más probable de la historia genealógica del grupo analizado X. Los códigos numéricos en color representan individuos seleccionados en forma aleatoria como representantes de cada uno de los grupos presentes. Los códigos numéricos en negro, que siguen a los de color, corresponden a individuos con genotipos idénticos. Por ejemplo, el individuo identificado con el código numérico de color, 476, corresponde a un tipo de genotipo obtenido y los códigos numéricos negros, que le siguen inmediatamente (348, 374, 342 y 344), corresponden a individuos con genotipos idénticos a 476.

Básicamente la historia genealógica reconstruida, indica que los individuos analizados se pueden dividir en dos grandes grupos, A y B, los cuales a su vez se pueden subdividir en diferentes subgrupos (A-1 al A-6 y B-1 al B-6). Es importante destacar, que al igual que cualquier relación genealógica, la figura obtenida indica que los subgrupos A (A-1 al A-6) y B (B-1 al B-6) están más relacionados genéticamente dentro de ellos (A-1 al A-6) y (B-1 al B-6) que entre los grupos A y B.

Los diferentes subgrupos descritos representan esencialmente la base de la selección de los



Genotipo de los individuos fundadores del grupo X desconocido. Aparentemente no se encuentra presente en los individuos analizados

fundadores, de acuerdo al modelo desarrollado en la siguiente figura.

Aunque el conocimiento de la variabilidad genética, es uno de los principales aspectos al momento de la selección de fundadores, el número de los individuos seleccionados también es importante. Es decir, debe existir un compromiso entre variabilidad y número al momento de la selección. Por ejemplo, la selección de un reducido número de fundadores con una elevada variabilidad genética no es la regla a seguir, ya que eventualmente dicha variabilidad tendería a reducirse con el tiempo, pasando de un estado moderado a bajo. De esta forma, la selección de un moderado a elevado número de fundadores, con una elevada y moderada variabilidad genética, evitando siempre los cruzamientos consanguíneos, es la regla a seguir. Desafortunadamente, es muy difícil definir a priori un número ideal de fundadores a seleccionar, ya que existen muchas variables a considerar, tanto prácticas (capacidad de infraestructura de la empresa, entre otras) como teóricas (el análisis de una gran número de microsatélites, conocimiento del pedigree, entre otras).

Las siguientes tablas, representan la selección de cruzamientos sugeridos para el grupo X. Para el diseño de estos cruzamientos, se ha asumido que los individuos analizados no presentan ninguna diferencia en algún parámetro de producción que se quiera mantener como una línea independiente, por ejemplo todos los individuos son homogéneos en crecimiento.

El cruzamiento entre los grupos A y B, debe tener preferencia al cruzamiento dentro de los subgrupos A y dentro del subgrupo B. En las siguientes tablas, cada una de las celdas definidas con la letra "X y Z" significa un cruzamiento sugerido. El cruzamiento "X" tiene preferencia sobre "Z".

Tabla 1. Códigos numéricos de los representantes para cada uno de los subgrupos definidos.

Subgrupos del Grupo A y B	Representantes (individuos que comparten el mismo genotipo y para cada uno de los subgrupos)
A-1	476,348,374,342,344,490,338,328,330,366,370,302,140,372,368,332,354,192,206,128,150,478
A-2	130,242,244,248,256,266,138,292,480,482,484,146,324,350,352,340
A-3	158,252,258,296,298,488,290,248,256,260,266
A-4	336,334,326,356,246,186,200,204,310,360
A-5	136,294,462,472,432,262,486,456,472,380,232,236,240,390,394)
A-6	452,466,428,450,446,458,470,474,448,460,438,464,444,440,442,430,436,454,420
B-1	132,152,306,154,278,492,388,210,212,214,220,224,416
B-2	280,362,364,358,346,424,426,288,202,208,218,226,272,276,316,414
B-3	134,148,286,160
B-4	174,176,382,384,190,400,408,144,308
B-5	434,284,304,170

B-6	162,164,182,194,196,254,264,322,168,178, 180,184 188,238,274,222,392,402,300,398,406
-----	--

Tabla 2. Cruzamientos sugeridos entre subgrupos de los grupos A y B.

Subgrupos Grupo B	Subgrupos Grupo A					
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6
B-1	X	X	X	X	X	X
B-2	X	X	X	X	X	X
B-3	X	X	X	X	X	X
B-4	X	X	X	X	X	X
B-5	X	X	X	X	X	X
B-6	X	X	X	X	X	X

Tabla 3. Cruzamientos sugeridos entre subgrupos dentro del grupo A.

Subgrupos Grupo A	Subgrupos Grupo A					
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6
A-1	Z	X	X	X	X	X
A-2	X	-	X	X	X	X
A-3	X	X	-	X	X	X
A-4	X	X	X	-	X	X
A-5	X	X	X	X	-	X
A-6	X	X	X	X	X	-

Tabla 4. Cruzamientos sugeridos entre subgrupos dentro del grupo B.

Subgrupos Grupo B	Subgrupos Grupo B					
	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6
B-1	Z	X	X	X	X	X
B-2	X	Z	X	X	X	X
B-3	X	X	Z	X	X	X
B-4	X	X	X	-	X	X
B-5	X	X	X	X	Z	X
B-6	X	X	X	X	X	Z

Cruzamientos entre Subgrupos de los grupo A y B: Ejemplo A-1 X B-1.

Cuando corresponda, los individuos resaltados en color rojo en la tabla 1, deberán tener preferencia en el momento de la selección de fundadores dentro de cada uno de los subgrupos correspondientes. Por ejemplo, individuo 302 (macho A-1) X individuo 416 (hembra B-1). Esto no significa que el resto de las combinatorias de cruzamientos posibles, como por ejemplo individuo 476 (macho A-1) X individuo 214 (hembra B-1), sean descartadas.

La selección de los cruzamientos entre subgrupos de los grupo A y B, representan el primer nivel en orden de importancia al momento de decidir los cruzamientos a realizar.

Cruzamientos entre Subgrupos A: Ejemplo A-1 X A-2.

Los individuos resaltados en color rojo de cada una de las tablas intra grupo, deberán tener preferencia en el momento de la selección de fundadores dentro de cada uno de los subgrupos correspondientes. Dichos individuos corresponden a ejemplares con genotipos de reducida ocurrencia y que hay que aumentar. Por ejemplo individuo 302 (macho A-1) X individuo 130 (hembra A-2). Esto no significa que el resto de las combinatorias de cruzamientos posibles, como por ejemplo individuo 476 (macho A-1) X individuo 242 (hembra A-2) sean descartadas.

Cruzamientos entre Subgrupos B: Ejemplo B-1 X B-2.

Los individuos resaltados en color rojo de cada una de las tablas intra grupo, deberán tener preferencia en el momento de la selección de fundadores dentro de cada uno de los subgrupos correspondientes. Dichos individuos corresponden a ejemplares con genotipos de reducida ocurrencia y que hay que aumentar. Por ejemplo individuo 416 (hembra B-1) X individuo 280 (macho B-2). Esto no significa que el resto de las combinatorias de cruzamientos posibles, como por ejemplo individuo 154 (hembra B-1) X individuo 202 (macho B-2) sean descartadas.

La selección de los cruzamientos entre subgrupos de los grupo A o B, representan el segundo nivel en orden de importancia al momento de decidir los cruzamientos a realizar.

Cruzamientos dentro de Subgrupos A o B: Ejemplo A-1 Z A-1 o B-1 Z B-1.

Los individuos resaltados en color rojo de cada una de las tablas intra grupo, deberán tener preferencia en el momento de la selección de fundadores dentro de cada uno de los subgrupos correspondientes. Dichos individuos corresponden a ejemplares con genotipos de reducida ocurrencia y que hay que aumentar. Por ejemplo, individuo 302 (macho A-1) Z individuo 128 (hembra A-1) o individuo 416 (hembra B-1) Z individuo 132 (macho B-1).

La selección de los cruzamientos dentro de subgrupos de los grupo A o B, representan el tercer nivel en orden de importancia al momento de decidir los cruzamientos a realizar.

A continuación se presenta la figura que representa la reconstrucción más probable de la historia genealógica del grupo analizado de salmón del atlántico. Los códigos numéricos corresponden a representantes de los genotipos detectados. Un ejemplar de cada uno de los 10 pares de individuos detectados fue eliminado, con lo cual la reconstrucción se realizó con 283 ejemplares. Los códigos seguidos de barras diagonales indican una reconstrucción muy poco definida estadísticamente dentro de cada uno de los grupos en concreto.

Aunque el conocimiento de la variabilidad genética, es uno de los principales aspectos al momento de la selección de fundadores, el número de los individuos seleccionados también es importante. Es decir, debe existir un compromiso entre variabilidad y número al momento de la selección. Por ejemplo, la selección de un reducido número de fundadores con una elevada variabilidad genética no es lo que conviene hacer, ya que eventualmente dicha variabilidad tendería a reducirse con el tiempo, pasando de un estado moderado a bajo. De esta forma, la selección de un moderado a elevado número de fundadores, con una elevada y moderada variabilidad genética, evitando siempre los cruzamientos consanguíneos, es la regla a seguir. Desafortunadamente, es muy difícil definir a priori un número ideal de fundadores a seleccionar, ya que existen muchas variables a considerar, tanto prácticas (capacidad de infraestructura de la empresa, entre otras) como teóricas (el análisis de una gran número de microsátélites, conocimiento del pedigree, entre otras).

Básicamente la historia genealógica reconstruida del grupo W, indica que los individuos analizados se pueden dividir en cinco grandes grupos, A-J (Tabla 1). Es importante destacar, que al igual que cualquier relación genealógica, la figura obtenida indica por ejemplo que los individuos que conforman el grupo C están más relacionados genéticamente dentro de ellos que con cualquier otro individuo de otro grupo. Los diferentes grupos descritos representan esencialmente la base de la selección de los cruzamientos.

Tabla 1. Códigos numéricos de los representantes para cada uno de los grupos definidos. En rojo se han resaltado ejemplares machos y los códigos subrayados corresponden a los ejemplares homocigotos.

Grupos	Representantes
A	520,2115,549,2124,1647,2060,2065,2236,506,2243,1823,2061,376,404,529,551,429,1580,2119,2315,1654,2078,2055,2212,2142,2287,2049,2206,2051,526,2200,399,2132,1751,2072,2326,2074,2076,378,260,450,391,1757,1761,546,16,1600,1621,
B	1786,2352,2219,2280,1767,2146,543,405,525,2222,2199,2258,514,447,1738,2233,2327,505,2284,357,544,1567,2307,1760,2204,388,2268
C	352,396,2265,550,1754,535,2220,423,386,414,394,422,517,440,2094,2270,2273,504,1655,2241,2269,406,421,363,2063,2095,508,1581,541,2062,510,542,501,502,503
D	444,1586,512,2079,1524,2053,2137,2054,2050,2057,359,1803,434,441,2096,2102,560,486,487,488,489,491,495,497,500
E	420,2277,1902,511,2275,439,446,449,407,2085,443,2118,425,1776,2068,2283,426,2291,1082,2086
F	382,558,385,513,48,1748,418,516,433,553,547,554,355,2213,2350,353,552,383,2083,64,2048,2110,527,2266
G	2261,2329,431,36,2339,523,2080,419,1839,427,2119,2126,2245,1782,522,2112,2309,136,507,528,539,2117,2227,484,485,473,474,478,483
H	424,428,559,54,2255,2139,2238,532,1792,2360,2252,362,2256,1736,1771,555,2254,144,2348,530,2140,1834,509,2058,2274,456,457,459,460,464,465,468
I	375,2077,432,106,2347,518,542,2066,2288,1804,417,533,538,451,452,453,455
J	358,360,519,052,534,2111,2059,2298,2225,2084,537,2064,2305,2349,347,524,53,348,2141,2247,430,2073,448,2107,2295,557,2120,2294

En lo posible el cruzamiento entre individuos pertenecientes a grupos detectados (A-J), debe tener preferencia al cruzamiento entre individuos dentro de un grupo en particular. En la siguiente tabla (Tabla 2), cada una de las celdas definidas con la letra "X" significa un cruzamiento sugerido entre grupos. La letra z, indica cruzamientos entre individuos dentro de grupos, lo cual es considerado como alternativa de cruzamiento secundario. Asimismo, en lo posible la selección de los individuos

subrayados (homocigotos) en la tabla de grupos (Tabla 1) debería ser evitada para cruzamientos tanto entre grupo como dentro de cada uno de ellos. Los diferentes grupos descritos representan esencialmente la base de la selección de los fundadores.

Tabla 2: Esquema de cruzamientos sugerido de acuerdo a los grupos obtenidos para el grupo inicialmente evaluado como grupo W.

Grupos	Grupos									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	z	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B	X	z	X	X	X	X	X	X	X	X
C	X	X	z	X	X	X		X	X	X
D	X	X	X	z	X	X	X	X	X	X
E	X	X	X	X	z	X	X	X	X	X
F	X	X	X	X	X	z	X	X	X	X
G	X	X	X	X	X	X	z	X	X	X
H	X	X	X	X	X	X	X	z	X	X
I	X	X	X	X	X	X	X	X	z	
J	X	X	X	X	X	X	X	X	X	z

Cruzamientos entre grupos: Ejemplo A X B.

Individuo 520 (macho A) X individuo 1786 (hembra B). La selección de los cruzamientos entre grupos, representan el primer nivel en orden de importancia al momento de decidir los cruzamientos a realizar.

Cruzamientos dentro de Grupos: Ejemplo A X A.

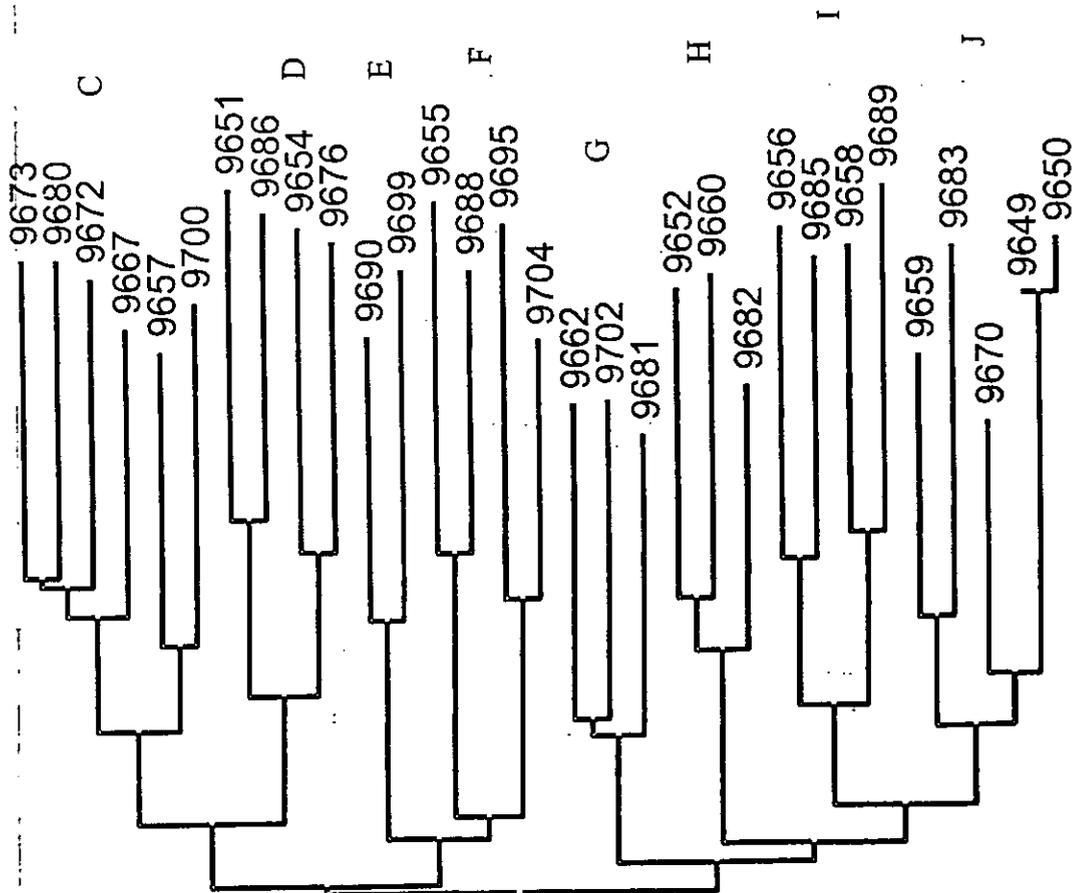
Individuo 520 (macho A) X individuo 2115 (hembra A). La selección de los cruzamientos dentro de grupos, representan el segundo nivel en orden de importancia al momento de decidir los cruzamientos a realizar.

Por otra parte, debido a la moderada a buena variabilidad genética del grupo 1 de trucha arco iris, que implica un número de individuos con genotipos idénticos, y al desconocimiento de la historia

genealógica de los ejemplares analizados, es muy difícil desarrollar un modelo de selección de fundadores basado únicamente en la información de los genotipos obtenidos. De hecho, de los 48 individuos que fueron incluidos en el análisis, se obtuvieron 31 genotipos diferentes (64.6%) en al menos uno de los alelos.

De esta forma, se procedió a reconstruir la historia genealógica más probable del grupo y la selección de los fundadores se realizó de acuerdo a grupos de individuos que comparten genotipos similares (consanguíneos) en al menos uno de los alelos. Este último tipo análisis es más avanzado que la selección de fundadores basado solamente en genotipos.

La siguiente figura representa la reconstrucción más probable de la historia genealógica del grupo analizado 1. Los códigos numéricos representan individuos seleccionados en forma aleatoria como representantes de cada uno de los subgrupos presentes. Para códigos que comparten el genotipo, ver tabla 1



dividir en diversos subgrupos, C al J. Es importante destacar, que al igual que cualquier relación genealógica, la figura obtenida indica por ejemplo que los miembros del subgrupos C y D están mas relacionados genéticamente dentro de ellos que entre ellos.

Aunque el conocimiento de la variabilidad genética, es uno de los principales aspectos al momento de la selección de fundadores, el número de los individuos seleccionados también es importante. Es decir, debe existir un compromiso entre variabilidad y número al momento de la selección. Por ejemplo, la selección de un reducido número de fundadores con una elevada variabilidad genética no es la regla a seguir, ya que eventualmente dicha variabilidad tendería a reducirse con el tiempo, pasando de un estado moderado a bajo. De esta forma, la selección de un moderado a elevado número de fundadores, con una elevada y moderada variabilidad genética, evitando siempre los cruzamientos consanguíneos, es la regla a seguir. Desafortunadamente, es muy difícil definir *a priori* un número ideal de fundadores a seleccionar, ya que existen muchas variables a considerar, tanto prácticas (capacidad de infraestructura de la empresa, entre otras) como teóricas (el análisis de una gran número de microsatélites, conocimiento del *pedigree*, entre otras).

Las siguientes tablas, representan la selección de cruzamientos sugeridos para el grupo 1. Para el diseño de estos cruzamientos, se ha asumido que los individuos analizados no presentan ninguna diferencia en algún parámetro de producción que se quiera mantener como una línea independiente, por ejemplo todos los individuos son homogéneos en crecimiento.

El cruzamiento entre los subgrupos, debe tener preferencia al cruzamiento dentro de los subgrupos. En las siguientes tablas, cada una de las celdas definidas con la letra "X" significa un cruzamiento sugerido

Tabla 1. Códigos numéricos de los representantes para cada uno de los subgrupos definidos.

Subgrupos	Representantes (individuos que comparten genotipos para cada uno de los subgrupos)
C	9672,9673,9667,9657,9700,9680,9678,9684,9687
D	9651,9686,9654,9676,9671,9674
E	9690,9699,9653,9658,9661
F	9655,9688,9695,9704,9668,9669
G	9662,9702,9681,9664,9691,9692
H	9652,9660,9682,9694,9697,9701,9703
I	9656,9685,9658,9689,9698
J	9659,9683,9670,9649,9650

Tabla 2. Cruzamientos sugeridos entre subgrupos.

Subgrupos	Subgrupos							
	C	D	E	F	G	H	I	J
C		X	X	X	X	X	X	X
D	X		X	X	X	X	X	X
E	X	X		X	X	X	X	X
F	X	X	X		X	X	X	X
G	X	X	X	X		X	X	X
H	X	X	X	X	X		X	X
I	X	X	X	X	X	X		X
J	X	X	X	X	X	X	X	

Tabla 3. Cruzamientos sugeridos dentro subgrupos.

Subgrupos	Subgrupos							
	C	D	E	F	G	H	I	J
C								
D		X						
E			X					
F				X				
G					X			
H						X		
I							X	
J								X

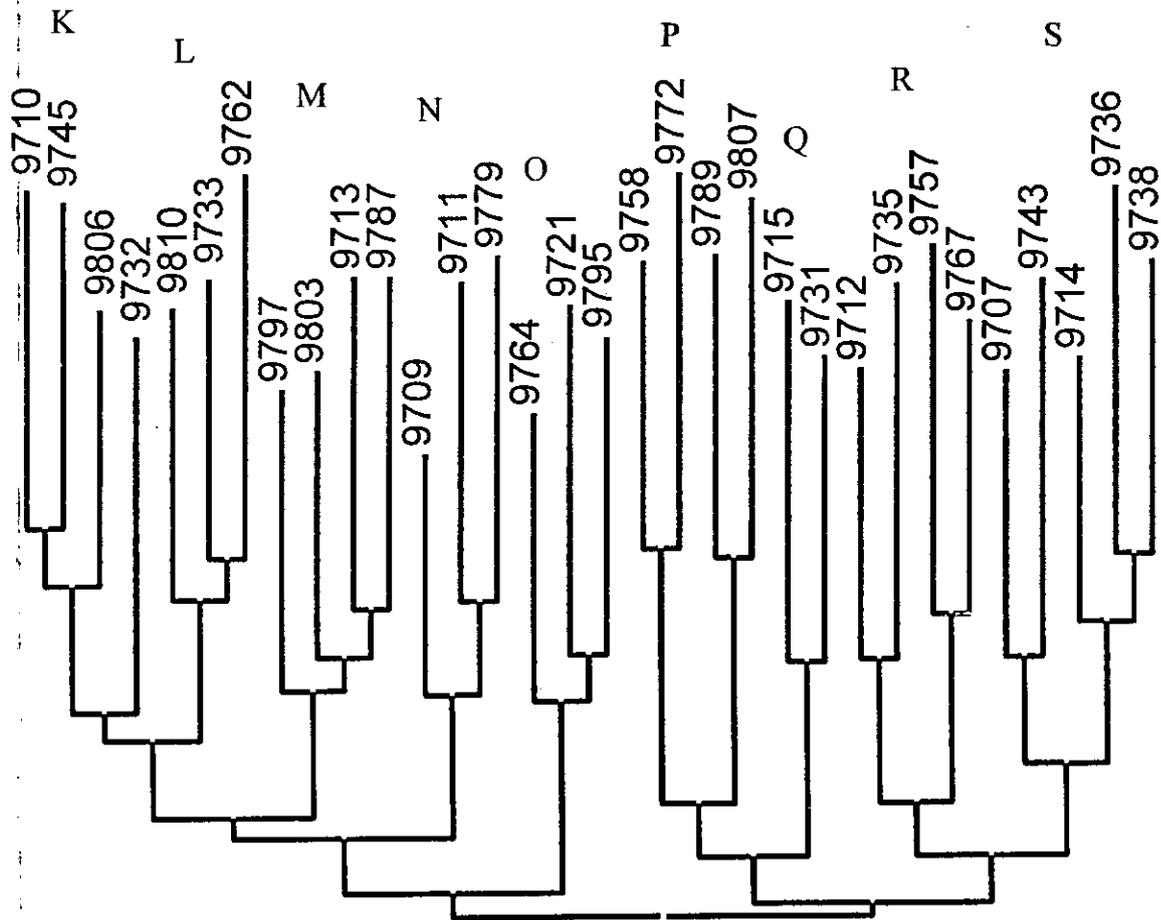
Debido a la moderada a buena variabilidad genética del grupo 2, que implica un número de individuos con genotipos idénticos, y al desconocimiento de la historia genealógica de los ejemplares analizados, es muy difícil desarrollar un modelo de selección de fundadores basado únicamente en la información de los genotipos obtenidos. De hecho, de los 97 individuos que fueron incluidos en el análisis, se obtuvieron 32 genotipos diferentes (33.0%) en al menos uno de los alelos.

De esta forma, se procedió a reconstruir la historia genealógica más probable del grupo y la selección de los fundadores se realizó de acuerdo a grupos de individuos que comparten genotipos similares (consanguíneos) en al menos uno de los alelos. Este último tipo de análisis es más avanzado que la selección de fundadores basada solamente en genotipos.

La siguiente figura representa la reconstrucción más probable de la historia genealógica del grupo analizado 2. Los códigos numéricos representan individuos seleccionados en forma aleatoria como

representantes de cada uno de los subgrupos presentes. Para códigos que comparten el genotipo, ver tabla 4

Básicamente la historia genealógica reconstruida, indica que los individuos analizados se pueden dividir en diversos subgrupos, K al S. Es importante destacar, que al igual que cualquier relación genealógica, la figura obtenida indica por ejemplo que los miembros del subgrupos K y M están mas relacionados genéticamente dentro de ellos que entre ellos.



Aunque el conocimiento de la variabilidad genética, es uno de los principales aspectos al momento de la selección de fundadores, el número de los individuos seleccionados también es importante. Es decir, debe existir un compromiso entre variabilidad y número al momento de la selección. Por ejemplo, la selección de un reducido número de fundadores con una elevada variabilidad genética no es la regla a seguir, ya que eventualmente dicha variabilidad tendería a reducirse con el tiempo, pasando de un estado

moderado a bajo. De esta forma, la selección de un moderado a elevado número de fundadores, con una elevada y moderada variabilidad genética, evitando siempre los cruzamientos consanguíneos, es la regla a seguir. Desafortunadamente, es muy difícil definir *a priori* un número ideal de fundadores a seleccionar, ya que existen muchas variables a considerar, tanto prácticas (capacidad de infraestructura de la empresa, entre otras) como teóricas (el análisis de un gran número de microsatélites, conocimiento del *pedigree*, entre otras).

Las siguientes tablas, representan la selección de cruzamientos sugeridos para el grupo 2. Para el diseño de estos cruzamientos, se ha asumido que los individuos analizados no presentan ninguna diferencia en algún parámetro de producción que se quiera mantener como una línea independiente, por ejemplo todos los individuos son homogéneos en crecimiento.

El cruzamiento entre los subgrupos, debe tener preferencia al cruzamiento dentro de los subgrupos. En las siguientes tablas, cada una de las celdas definidas con la letra "X" significa un cruzamiento sugerido

Tabla 4. Códigos numéricos de los representantes para cada uno de los subgrupos definidos.

Subgrupos	Representantes (individuos que comparten genotipos para cada uno de los subgrupos)
K	9710,9745,9806,9732,9771,9727,9728,9753,9791,9802,9805,9808,9809
L	9810,9733,9762,9768,9769,9770,9740,9751,9788,9790,9801
M	9797,9803,9713,9878,9765,9766,9737,9750,9786,9799,9800
N	9709,9711,9779,9776,9777,9722,9723,9734,9752,9784,9785
O	9764,9721,9765,9773,9774,9775,9729,9741,9749,9782,9783
P	9758,9772,9789,9807,9706,9708,9755,9756,9742,9781,9794,9804
Q	9715,9713,9761,9763,9717,9719,9730,9748,9754,9780,9793
R	9712,9735,9757,9767,9716,9718,9720,9744,9747,9778,9796
S	9707,9743,9714,9736,9738,9724,9725,9726,9746,9792,9798

Tabla 5. Cruzamientos sugeridos entre subgrupos.

Subgrupos	Subgrupos								
	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
K		X	X	X	X	X	X	X	X
L	X		X	X	X	X	X	X	X
M	X	X		X	X	X	X	X	X
N	X	X	X		X	X	X	X	X
O	X	X	X	X		X	X	X	X

P	X	X	X	X	X		X	X	X
Q	X	X	X	X	X	X		X	X
R	X	X	X	X	X	X	X		X
S	X	X	X	X	X	X	X	X	

Tabla 6. Cruzamientos sugeridos dentro subgrupos.

Subgrupos	Subgrupos									
	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	
K	X									
L		X								
M			X							
N				X						
O					X					
P						X				
Q							X			
R								X		
S									X	

Cruzamientos entre Subgrupos: Ejemplo C X D.

Por ejemplo, individuo 9672 (hembra C) X individuo 9676 (macho D).

La selección de los cruzamientos entre subgrupos, representan el primer nivel en orden de importancia al momento de decidir los cruzamientos a realizar.

Cruzamientos dentro Subgrupos: Ejemplo D X D.

Por ejemplo individuo 9651 (hembra D) X individuo 9686 (macho D).

La selección de los cruzamientos dentro de subgrupos, representan el segundo nivel en orden de importancia al momento de decidir los cruzamientos a realizar.

Análisis y conclusiones de los resultados obtenidos.

Es completamente indudable que la industria de la Salmonicultura representa para Chile una de sus principales actividades económicas. Al mismo tiempo, para la región sur de nuestro país, esta industria no solamente ha significado una importante actividad económica, sino también un significativo desarrollo social y organizacional, el cual es bastante complejo. Por ejemplo, en forma conjunta con el crecimiento de la industria de la Salmonicultura, se han desarrollado una serie de servicios anexos. Aunque en Europa y USA, el concepto de servicios biotecnológicos asociados a la industria de la acuicultura es un concepto ampliamente difundido, en nuestro país el concepto de estos servicios ha tenido un desarrollo relativo. Quizás una de las razones más importantes es que las especies en las cuales esta basada la industria de la Salmonicultura, Salmón coho, Salmón del Atlántico y Trucha arco iris, son especies introducidas, no endémicas para Chile. Con lo cual, todo el conocimiento necesario para el cultivo de estas especies debía ser exportado. De la misma forma, servicios biotecnológicos de vanguardia molecular o genéticos eran exclusivamente desarrollados y puestos en práctica en países Europeos o en USA. La aplicación de estos servicios en dichos países, ha generado productos con una mejor calidad, relacionados fundamentalmente con la mantención de una adecuada variabilidad genética y con el desarrollo de planes de manejo genéticos de selección asistida. Lo cual a su vez genera individuos, por ejemplo, con una mayor resistencia a enfermedades, mejores índices de conversión alimentaria, reducción del porcentaje de malformaciones, por comentar solo algunos logros. Claramente esto representa una enorme ventaja competitiva.

Hasta hace algunos años, no era posible para los productores nacionales de Salmón encontrar en Chile empresas que pudieran ofrecer servicios biotecnológicos genéticos-moleculares como los comentados anteriormente. De esta forma, uno de los hitos más importantes de este proyecto fue el de desarrollar, y establecer en la actualidad, una opción nacional para prestar servicios moleculares-genéticos. La aceptación de dichos servicios por parte de los productores nacionales ha sido muy importante. Otro de los aspectos importantes de este proyecto, fue el de interactuar directamente con los productores nacionales, explicando de una forma accesible el alcance de las técnicas genéticos-moleculares, con lo cual en la actualidad dichos productores comprenden perfectamente la real necesidad de estos servicios biotecnológicos.

Por otra parte, nuestros avances en los estudios de las tres especies de Salmónidos en Chile (Salmón coho, Salmón del Atlántico y Trucha arco iris), nos ha permitido generar una importante base de datos a nivel de variabilidad genética y cruzamientos. Dicha base de datos, permite tener una visión global de la realidad de la industria Salmonicultura chilena, lo cual a su vez permite establecer no solamente comparaciones con industria similares en el extranjero, sino también fijar metas y/o estándares de variabilidad genética, y desarrollar eficaces programas de manejo de selección asistida. Como ejemplos se pueden comentar varios aspectos.

- 1) La variabilidad genética de los salmones coho desarrollados en Chile, es reducida en comparación con la obtenida en la misma especie en otros países, por ejemplo USA. Esto se puede deber fundamentalmente, ya sea a un reducido número de parentales o a la reducida variabilidad genética de estos, que formaron las poblaciones originales de coho en Chile. La situación de Salmón coho necesita una supervisión constante.
- 2) La variabilidad genética de Trucha arco iris y Salmón del Atlántico desarrollados en Chile, va de un rango de buena a reducida, siendo generalmente aceptable. En los casos de una variabilidad reducida, esta puede casi siempre se relaciona con un deficiente programa de manejo selección.
- 3) Los reducidos programas de manejo de selección genética desarrollados en Chile, están fundamentalmente basados en caracteres fenotípicos. Aunque dichos programas son perfectamente aceptables, no han tenido los resultados esperables. Nuestra conclusión frente a este hecho, es que el total desconocimiento de la variabilidad genética y relaciones consanguíneas de las poblaciones originales con las cuales se comenzó a desarrollar dichos programas, son las principales razones por las cuales no logran, en general, cumplir con los objetivos propuestos.
- 4) Nuestra consideración final es que aunque el servicio desarrollado a nivel genético-molecular, utilizando microsátélites, represente un enorme avance y utilidad para la industria de la Salmonicultura nacional, lo ideal en la actualidad es implementar planes o programas de manejo genético de selección asistida, utilizando tanto marcadores moleculares como caracteres fenotípicos. Además, es muy necesario desarrollar e incorporar nuevas técnicas, tales como

expresión génica, y nuevos marcadores moleculares que permitan refinar y complementar aún más los planes o programas de manejo genético de selección asistida

C) Impactos del Proyecto

Mediante el servicio de evaluación molecular de la variabilidad genética propuesto se espera provocar beneficios a nivel de reducción de los siguientes costos de producción de salmones:

-Disminución de mortalidad de los peces producto de malformaciones y por mejoramiento en la adaptación del pez al medio ambiente, ya que se evitará el inbreeding, es decir se favorecerá la variabilidad genética.

-Esto implica un aumento de los ingresos por aumento de las toneladas producidas.

Estos beneficios se pueden presentar cuantitativamente a través del siguiente escenario conservador-pesimista. Asumiendo que la mortalidad pudiese rebajarse en un 3%, se esperaría obtener un 3% de Toneladas adicionales a la cosecha. Si consideramos que el precio promedio de los últimos tres años corresponde a 3,4US\$/Kg y que a modo de ejemplo en el año 2003 se exportaron aproximadamente 310.000 Toneladas, se esperaría cosechar 9.300 Toneladas adicionales por efecto de reducción en la mortalidad, esto significa que se lograría un beneficio adicional valorado en US\$ 31.620.000 para la industria.

Respecto a la oferta del servicio por parte de Diagnotec S.A., el laboratorio ha utilizado su expertis en técnicas moleculares, su infraestructura y la logística utilizada para el screening de reproductores, lo que ha permitido otorgar el servicio de evaluación de la variabilidad genética desde ya. Cabe destacar que este ha tenido una muy buena demanda de parte de los productores.