

Aplicaciones de la genética para la mejora de la acuicultura

P. Martínez

Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. Campus de Lugo. E-27002 Lugo, España. Correo electrónico: paumarpo@lugo.usc.es

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

RESUMEN

Los planes de mejora genética en especies cultivadas están actualmente en una fase inicial. Para poner en marcha un plan de selección es esencial evaluar el potencial genético de las poblaciones naturales, para lo cual será necesario combinar la información de marcadores genéticos y caracteres cuantitativos. Los marcadores microsatélites son una herramienta indispensable para el análisis de parentesco, de gran utilidad y múltiples aplicaciones en la fundación de *stocks* de reproductores y el desarrollo de planes de selección. Mediante la manipulación del número de conjuntos cromosómicos se pueden obtener distintos productos, entre los que se encuentran los triploides y ginogenéticos, muy interesantes para la obtención de individuos estériles y poblaciones todo-hembras. La aplicación de mapas genéticos para la identificación de QTL y las hibridaciones con *microarrays* para el análisis genómico funcional están comenzando a utilizarse en acuicultura.

Palabras clave: Acuicultura, recursos genéticos, microsatélites, parentesco, triploidía, ginogénesis, mapas genéticos, *microarrays*.

ABSTRACT

Application of genetic improvement in aquaculture

Genetic selection programmes of cultured species are still in their infancy. The assessment of genetic resources in natural populations is an essential starting point in the design of genetic selection programmes. Information from both neutral genetic markers and quantitative traits will be necessary for this task. Microsatellite markers constitute an indispensable tool for parentage analysis, both for broodstock selection and for the development of genetic selection plans. Different chromosome set manipulation products can be obtained for culture improvement, among which triploids and gynogenetics are the most relevant for obtaining both sterile and all-female populations. The application of genetic maps for QTL identification and microarrays for functional genomic analysis are being used in aquaculture.

Keywords: Aquaculture, genetic resources, microsatellites, parentage analysis, triploidy, gynogenesis, genetic maps, *microarrays*.

GENÉTICA Y ACUICULTURA

La demanda mundial de productos pesqueros se ha duplicado en las tres últimas décadas, pasando de un consumo per cápita de 11 kg/per-

sona/año en 1970 a casi 16 kg en 2000. Mientras que la producción de pesca extractiva se ha estancado durante la pasada década 1991-2000 como consecuencia de los límites de explotación en los caladeros, la contribución de la acuicultu-

ra al suministro mundial de peces, crustáceos y moluscos ha crecido espectacularmente desde el 5 % de la producción total en 1970 hasta el 34 % en 2002 (Aproamar, 2004). La producción de especies marinas o dulceacuícolas en condiciones controladas es, por otro lado, enormemente diversa en comparación con los animales domésticos tradicionales, existiendo en la actualidad más de 210 especies explotadas en la acuicultura mundial. Esta tendencia, lejos de atenuarse, se acentúa, y entre las prioridades de la UE para este sector, además de la estabilización y el crecimiento de la cantidad de especies consolidadas, se incluye la domesticación de nuevas especies para diversificar la creciente demanda de mercado.

A pesar de que la antigüedad de la acuicultura se remonta a más de 2 000 años (en China), el intenso crecimiento de este sector es relativamente reciente, especialmente en comparación con el de los animales domésticos tradicionales, circunscribiéndose en mayor medida a la segunda mitad del siglo XX. Por ello, la inversión investigadora en este campo es todavía limitada, a pesar del impulso recibido durante las dos últimas décadas. El esfuerzo investigador se ha centrado, en mayor medida, en aspectos inmediatos relacionados con la puesta en marcha de los cultivos (nutrición, patologías, reproducción), y solo cuando el cultivo de una especie se ha consolidado, se han planteado programas de selección genética. En la actualidad solo existen programas de selección familiar en menos de 30 especies cultivadas.

En este artículo se revisa el estado actual de la genética en la acuicultura, introduciendo reflexiones al hilo de nuestro trabajo en este campo. Las aportaciones de nuestro grupo de investigación se han realizado en colaboración con otros grupos, preferentemente españoles, cubriendo diversas áreas, desde la evaluación de recursos en poblaciones naturales y cultivadas, pasando por la utilización de marcadores en programas de selección genética y las aplicaciones de la manipulación cromosómica, hasta los más recientes estudios genómicos centrados en el desarrollo de mapas genéticos y los análisis globales de expresión génica. Los datos presentados están contextualizados en el marco general del estado de la investigación en acuicultura.

Sin embargo, y como consecuencia del planteamiento expuesto, la mayor parte de la información que se presenta estará centrada en especies piscícolas, especialmente en el rodaballo *Psetta maxima* L., 1758, y, obviamente, se enfatizarán aquellos aspectos en los que nuestra aportación ha sido más relevante.

RECURSOS GENÉTICOS Y FUNDACIÓN DE STOCKS DE REPRODUCTORES

A diferencia de los animales y plantas de cultivo tradicional, los recursos genéticos en las especies de acuicultura se encuentran en poblaciones salvajes. Como ya se ha comentado, muchas de estas especies están en fase de domesticación y, por tanto, los *stocks* de reproductores se están constituyendo en la actualidad. Por otro lado, el número de generaciones de selección en aquellas especies con programas de esta naturaleza es todavía escaso, con lo que la introducción de variación genética desde poblaciones salvajes es todavía una posibilidad real (Toro y López-Fanjul, 1997; Dunham *et al.*, 2001; Hulata, 2001; Gjedrem, 2005). En consecuencia, la evaluación de recursos genéticos en poblaciones naturales constituye un soporte esencial para la acuicultura, ya que la materia prima a utilizar para la fundación de *stocks* e inicio de programas de selección genética se encuentra, sobre todo, en poblaciones naturales.

La evaluación de recursos genéticos se ha venido realizando principalmente mediante el análisis de la variación genética de tipo cualitativo esencialmente neutral. A partir de las frecuencias de variantes alélicas de diferentes marcadores (isoenzimas, AFLP, RAPD, microsatélites, etc.), o mediante el análisis de secuencias mayoritariamente mitocondriales, se han evaluado niveles de diversidad genética, establecido patrones de diferenciación y analizado las relaciones filogenéticas en poblaciones salvajes de las especies de interés (Moritz, 1994; Frankham, 1995; Haig y Avise, 1996). Los patrones observados deberían reflejar diferencias adaptativas entre las poblaciones (Chakraborty y Leimar, 1987), especialmente cuando la divergencia genética es profunda y, por tanto, se identificarían así los recursos genéticos para su explota-

Tabla I. Valores comparados de diversidad genética total (H_T) diferenciación interpoblacional (F_{ST}) y su significación estadística (P) en el noroeste de la península Ibérica para especies marinas (rodaballo, rémol y solla) y una especie continental (trucha común) a partir de datos alozímicos. (***) : $p < 0,01$. (n.s.): no significativo.

		H_T	F_{ST}	P
Trucha común	<i>Salmo trutta</i> L., 1758	0,04	0,270	***
Rodaballo	<i>Psetta maxima</i> (L., 1758)	0,02	0,002	ns
Rémol	<i>Scophthalmus rhombus</i> (L., 1758)	0,09	0,003	ns
Solla	<i>Platichthys flesus</i> (L., 1758)	0,10	0,002	ns

ción. En la tabla I se muestran los patrones de diferenciación (F_{ST}) y diversidad genética (H_T) para algunas especies de peces planos y para trucha común *Salmo trutta* L., 1758 como ejemplos de patrones de estructuración genética extremos en peces dentro de una misma área geográfica. Siguiendo esta línea argumental, a partir de estos datos habría que inferir que no existen diferencias genéticas adaptativas en los peces planos del noroeste de la península Ibérica, mientras que en la trucha común están profundamente subdivididos.

Actualmente se cuestiona que esta información pueda obtenerse únicamente mediante el análisis de marcadores neutrales. La información que estos marcadores suministran es esencial para elucidar patrones de flujo génico, variables y parámetros demográficos y estructura familiar (Milligan, Leebens-Mack y Strand, 1994; Ruzzante, Hansen y Meldrup, 2001). Sin embargo, es necesario enfatizar que la selección natural actúa sobre el fenotipo y, preferentemente, sobre caracteres de tipo cuantitativo (Bentsen, 1991; Reed y Frankham, 2001). En consecuencia, la información sobre la variación cuantitativa, compleja en cualquier caso dada su naturaleza poligénica y la influencia ambiental, es un complemento esencial para definir la variación adaptativa de las poblaciones. La correlación entre los marcadores neutros aplicados habitualmente en estudios de evaluación de recursos y los caracteres cuantitativos es baja o nula, tanto respecto a la cantidad de la diversidad como a su distribución (Butlin y Tregenza, 1998; Reed y Frankham, 2001). Los datos disponibles sugieren, entonces, combinar el análisis de marcadores genéticos con el de los caracteres morfológicos y de ciclo vital (edad de maduración, época reproductiva, comportamiento migrador, etc.), para identificar el potencial adaptativo de las pobla-

ciones (Utter, Seeb y Seeb, 1993; Crandall *et al.*, 2000; Reed y Frankham, 2001).

Para la fundación de los *stocks* de reproductores es fundamental disponer de la mayor diversidad genética posible, tanto intra como interpoblacional, especialmente si se planea el desarrollo de programas de selección genética. En especies con planes de selección en marcha existe la tendencia a hacerse con reproductores de otros centros de cultivo o comprar alevines de otras empresas para introducir la ganancia añadida de los planes de selección. En estos casos debe tomarse seriamente en consideración la existencia de estructuración familiar que pueda determinar la introducción de consanguinidad, con la consiguiente disminución de la productividad (Kincaid, 1983; Dunham, 1996; Dunham *et al.*, 2001). Los datos obtenidos indican una estructuración familiar muy limitada en poblaciones salvajes de especies marinas, como los pleuronectiformes (Bouza *et al.*, 2002; Díaz-Ferguson *et al.*, en preparación), pero que puede llegar a ser alta cuando la subdivisión poblacional es importante y los tamaños efectivos son bajos, como en los salmónidos (Hermida *et al.*, observaciones no publicadas). Por otro lado, en especies con planes de selección, como el rodaballo, los peces de otros centros de producción o los lotes de alevines muestran una fuerte estructura familiar, con coeficientes de parentesco superiores a 0,20, lo cual aconseja su exclusión como reproductores, a menos que se tenga un soporte con marcadores moleculares que permita identificar los parentescos (Bouza *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2004).

PROGRAMAS DE SELECCIÓN GENÉTICA Y MARCADORES MOLECULARES

El reciente desarrollo de la acuicultura ha determinado que en la mayor parte de las espe-

cies se hayan aplicado planes de selección masal, lo que, asociado a la elevada fecundidad en peces, ha planteado en no pocos casos problemas graves de depresión consanguínea. En la actualidad existen programas de selección familiar, mucho más complejos de desarrollar por las necesidades de espacio y de utilización de tanques en planta, a lo sumo en 30 especies (Hulata, 2001). La necesidad de ubicar las familias de selección en tanques individuales hasta que sea posible el marcado de los individuos seleccionados, unida al desarrollo simultáneo de los programas de mejora con los planes de producción, obstaculiza el desarrollo de los mismos, implicando costes importantes en instalaciones y trabajadores. A estos problemas hay que añadir el hecho de que muchas de las especies de peces cultivadas son de puesta natural, lo que complica la planificación de los apareamientos y limita la identificación de las familias. A pesar de todo, los planes de selección familiar están teniendo una buena respuesta en peces, tanto por su elevada fecundidad, que posibilita fuertes intensidades de selección, como por la mayor varianza aditiva presente en peces para crecimiento en comparación con animales domésticos tradicionales (Tave, 1993; Dunham *et al.*, 2001; Hulata, 2001). De hecho, ya se están obteniendo valores de progreso por generación para crecimiento próximos al 10 % (rango 5-20 %) para la mayoría de las especies que siguen estos programas, e incluso superiores para resistencia a enfermedades. Otros caracteres, como la tolerancia a la salinidad o a la temperatura, han sido aplicados con éxito en un número limitado de especies (Jackson *et al.*, 1998; Cnaani *et al.*, 2003).

Un aspecto importante relacionado con los planes de selección, como se indicó en el apartado anterior, es el apoyo que pueden suministrar los marcadores moleculares para la identificación de parentescos. La importancia de este matiz se pone de manifiesto por la gran cantidad de referencias existentes, tanto en relación con aspectos teóricos relacionados con la precisión y sesgo de los estimadores (Blouin *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1998; Lynch y Rytland, 1999; Wang, 2002), como con su aplicación práctica en acuicultura (Pérez-Enríquez, Takagi y Taniguchi, 1999; Hara y Sekino, 2003; Jackson, Martín-Robichaud y Reith, 2003; Castro *et al.*, 2004).

El uso de parentescos moleculares es esencial para la fundación de los *stocks* de reproductores, pero igualmente indispensable para especies de puesta natural, como dorada *Sparus aurata* L., 1758, lubina *Dicentrarchus labra* (L., 1758), lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858, etc., en las que no es posible planificar los cruzamientos, y tampoco, en consecuencia, identificar las familias. Pero incluso en especies en las que es posible diseñar apareamientos controlados, es recomendable el chequeo del plan de selección mediante marcadores moleculares. En estos casos, la propia incardinación del plan de selección con la producción en planta, que conlleva la actuación de operarios, el traslado de tanques, manejo de estadillos, etc., determina la existencia de errores, que hacen necesaria la revisión para su eliminación o circunscripción a niveles razonables.

Para la estimación de parentescos moleculares, se precisa de marcadores genéticos altamente polimórficos, técnicamente fiables y preferentemente codominantes. Los candidatos idóneos que se ajustan a estas premisas son los *loci* microsatélites, y por ello son ampliamente usados a tal fin (Liu y Cordes, 2004). La elevada variación observada en peces para *loci* microsatélites (en general por encima de 10 alelos/*locus* y heterocigosis superiores a 0,7) es producto de su alta tasa de mutación (entre 10^{-3} y 10^{-4}), que, a su vez, no compromete los análisis de parentesco (Castro *et al.*, 2004). Una de las cuestiones importantes a considerar en la aplicación de estos marcadores para análisis de parentesco es la presencia de alelos nulos. Frecuencias superiores a 0,05 pueden resultar problemáticas e inducir a falsas asignaciones o estimaciones erróneas. La presencia de alelos nulos puede obtenerse de forma pedestre a partir del análisis de las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (HW) producidas por defecto de heterocigotos utilizando diversos programas disponibles en red (Brookfield, 1996; Marshall *et al.*, 1998). De forma más precisa y fiable, los alelos nulos se estiman a partir de análisis de genealogías, detectándose su presencia por la aparición de incompatibilidades homocigoto-homocigoto (Marshall *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2004). Algunos aspectos técnicos pueden también inducir a error en el genotipado de microsatélites, en particular el

denominado *drop out*, producido por la amplificación diferencial durante la PCR de los alelos más largos en heterocigotos con gran distancia interalélica. Este fenómeno es detectable fácilmente mediante análisis familiar, ya que produce efectos similares a los alelos nulos.

La aplicación de los microsatélites para análisis de parentesco en acuicultura puede realizarse para la identificación de las relaciones paterno-filiales, especialmente interesante en especies de puesta natural, o para estimar parentescos entre cualesquiera parejas de individuos, particularmente valioso en la fundación de los *stocks* de reproductores. El potencial de los microsatélites para estos análisis dependerá del número de *loci* utilizados y de su polimorfismo. Entre 4 y 6 *loci* microsatélites suelen ser suficientes en peces para determinar la exclusión de un falso padre con probabilidades teóricas superiores al 99 % en peces (Castro *et al.*, 2004). En ocasiones, existe una importante discordancia entre las estimaciones teóricas y la capacidad real de identificación de los progenitores de un individuo-problema. La existencia de estructuración genética, de alelos nulos, de *loci* ligados y de estructura familiar en los *stocks* de reproductores son las causas más probables de esta discrepancia (Castro *et al.*, en evaluación).

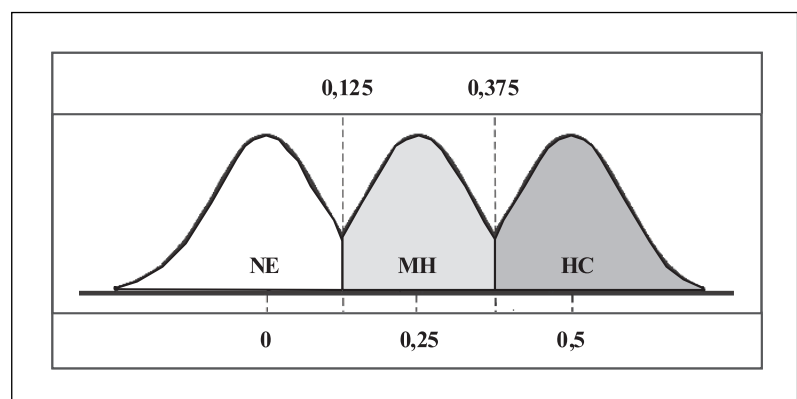
Por el contrario, la estimación de parentescos moleculares suele ser más compleja, aun dependiendo de los mismos factores que en el análisis paterno-filial. A la hora de calcular el parentesco entre dos individuos-problema, los diferentes algoritmos usados tratan de deducir de la similitud genética existente entre ellos la identidad debida al azar, para así obtener la identidad por descendencia, base del parentesco molecular (Wang, 2002). Esta circunstancia determina la

necesidad de una población de referencia, lo cual complica estas cuestiones. Nuestro grupo de investigación ha comparado los errores y el sesgo de los diferentes estimadores existentes en la bibliografía utilizando familias reales en rodaballo (Martínez *et al.*, en preparación), y se ha observado un comportamiento similar entre el estimador de Queller y Goodnight (1989) y el estimador de momentos de Wang (2002), y superior a los utilizados por otros autores (Blouin *et al.*, 1996; Lynch y Ritland, 1999). La aplicación de esta aproximación para organizar los *stocks* de reproductores y dirigir los cruzamientos para evitar los efectos de la consanguinidad se muestra en la figura 1. Finalmente, existen algunos programas en red mediante los cuales es posible la identificación de familias de hermanos con cierta fiabilidad utilizando parentescos moleculares en una población-problema (Partition 1.0; <http://www.mscs.dal.ca/buttler/partition>).

TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN CROMOSÓMICA Y SUS APLICACIONES

La manipulación del número de conjuntos cromosómicos ha permitido, mediante un conjunto de operaciones técnicamente sencillas, la obtención de diversos productos de interés en acuicultura que están siendo aplicados por la industria en diversas especies (Felip *et al.*, 2001; Hulata, 2001). La ventaja, desde el punto de vista del mercado, es que los individuos con modificaciones en su ploidía no son considerados organismos modificados genéticamente (OMG) pudiendo, en consecuencia, eludir todas las restricciones impuestas a éstos.

Figura 1. Clasificación de los reproductores de un *stock* mediante la aplicación de parentescos moleculares. En abscisas se da el valor del coeficiente de parentesco para individuos no emparentados (NE), medios hermanos (MH) y hermanos completos (HC). En la parte superior se indican los valores límite para clasificar los individuos en estas tres categorías. El error del estimador se refleja en las curvas normales de distribución del estimador para cada parentesco considerado.



Identificación de los productos de la manipulación cromosómica: verificación de ploidía

Una cuestión esencial para la aplicación de esta metodología es disponer de técnicas apropiadas que permitan verificar de forma precisa la ploidía de los individuos manipulados (Thorgaard, 1983; Phillips, Pleyte e Ihssen, 1989). Existen diferentes alternativas que deberían ser valoradas en función de su precisión, coste y aplicabilidad al material biológico manipulado (figura 2). Entre las más populares se encuentran métodos indirectos, como el conteo del número de nucleolos por núcleo, que en especies con un único *locus* organizador del nucleolo (NOR) tiene fácil interpretación, y la medida del diámetro de los eritrocitos, que presenta limitaciones en cuanto a la edad de los animales para su aplicación (Phillips, Pleyte e Ihssen, 1989). El conteo del número de cromosomas sería el método directo más fiable para estimar la ploidía, pero la dificultad de obtención de metafases en peces, lejos de la eficiencia y calidad obtenida en mamíferos, limita considerablemente su aplicación. Métodos más recientes implican el uso de marcadores moleculares, especialmente para confirmar la herencia exclusiva paterna o materna en androgenéticos y ginogenéticos, respectivamente (Felip *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2003). Finalmente, la citometría de flujo permite estimar con fiabilidad la cantidad de ADN por célula y, consecuentemente, la ploidía de los individuos testados. En rodaballo, a pesar de presentar un único *locus* NOR, la existencia de un polimorfismo de número para estas regiones dificulta la evaluación de la triploidía, aunque su aplicación a escala poblacional ha sido factible con un error bajo (próximo al 3 %) (Piferrer *et al.*, 2000). En individuos adultos la utilización del diámetro de los

eritrocitos resultó un método preciso y con un error mínimo, incluso cuando se aplicó a escala individual (Cal *et al.*, en prensa a). Sin embargo, para la confirmación de la herencia exclusiva materna de los ginogenéticos se necesitó de la aplicación de marcadores moleculares de tipo microsatélite, que mostraron una confianza estadística próxima a 1 (Castro *et al.*, 2003).

Uno de los problemas asociados a esta última técnica es la posible existencia de material genético espermático residual que no podría ser detectado cuando se utilizan solamente uno o dos marcadores (Thorgaard, 1983). El rastreo con más de 200 microsatélites de una población de ginogenéticos haploides durante la construcción de un mapa genético en esta especie ha confirmado la inexistencia de este material genético residual, lo cual respalda la fiabilidad del método aplicado en la obtención de ginogenéticos (Piferrer *et al.*, 2004).

Obtención de individuos estériles: triploides

La obtención de triploides se realiza de forma sencilla, usualmente mediante un choque térmico o de presión, y está siendo aplicada por la industria para la obtención de individuos funcionalmente estériles, especialmente en salmónidos (Hulata, 2001). La esterilidad de los triploides se ha relacionado con anomalías en el emparejamiento de los cromosomas y su segregación durante la meiosis (Thorgaard, 1983). Nuestro grupo de investigación ha podido comprobar en rodaballo la existencia de un comportamiento cromosómico diferencial durante la meiosis entre machos y hembras triploides, que podría explicar las diferencias en la maduración gonadal entre ambos sexos (Cuñado *et al.*, 2001, 2002). Igualmente, este grupo ha observado la existencia de apoptosis como mecanismo natural de regula-

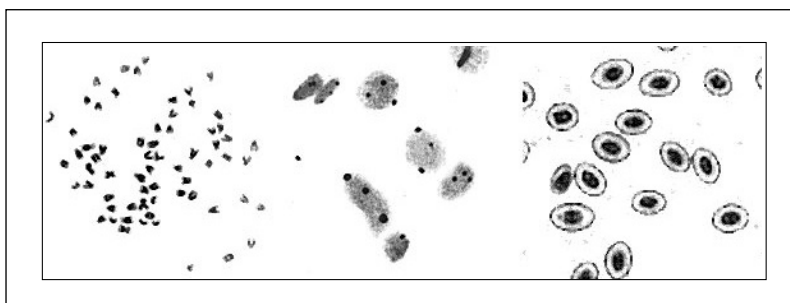


Figura 2. Métodos utilizados habitualmente para estimar la ploidía tras la aplicación de técnicas de manipulación cromosómica: metafase triploide de rodaballo ($2n = 66$) (izda.); presencia de tres nucleolos por núcleo en células triploides de rodaballo (centro); eritrocitos de un ejemplar triploide de esta misma especie (dcha.).

ción del ciclo de maduración en esta especie, pero a escalas superiores en triploides que en diploides, y en hembras respecto de machos, lo que podría explicar la ausencia de desarrollo gonadal asociada a la triploidía, particularmente en hembras (Terrones, 2002; Piferrer *et al.*, 2004).

Los triploides tienen la ventaja de evitar los problemas asociados a la maduración gonadal (reducción del crecimiento, pérdida de calidad de la carne, menor viabilidad, etc.), y son particularmente interesantes en especies de maduración única. Asimismo, pueden presentar proporciones sexuales desviadas a favor de las hembras al poseer dos genomas femeninos y uno masculino, y esto puede ser interesante en especies en las que las hembras crecen más rápidamente que los machos (Piferrer *et al.*, 2000; Felip *et al.*, 2001). Este es el caso del rodaballo, especie en la que las hembras alcanzan la talla comercial varios meses antes que los machos, y en la que hemos observado aproximadamente 3/4 de hembras en las progenies triploides (Cal *et al.*, en prensa a). La manipulación necesaria para la obtención de triploides, y la propia triploidía, puede determinar una disminución de la viabilidad respecto de los controles diploides (Hulata, 2001; Piferrer *et al.*, 2003).

Por otro lado, aunque la optimización del método permite en la mayoría de los casos la obtención de triploides con eficiencias próximas al 100 %, es necesario valorar y adaptar esta metodología experimental para su aplicación a escala industrial. El manejo de grandes cantidades de huevos puede obstaculizar la homogeneidad de las condiciones a aplicar para la obtención de triploides y determinar, en consecuencia, una disminución de la eficiencia en el proceso. Los valores de crecimiento y viabilidad postlarvaria observados en los triploides respecto de sus controles diploides son variables según las especies, aunque, en general, no se observan diferencias acusadas en uno u otro sentido (Hulata, 2001). Los datos obtenidos por nuestro grupo en rodaballo en colaboración con Francesc Piferrer (del Instituto de Ciencias del Mar de Barcelona) y Rosa María Cal (del Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía) indican que el crecimiento en los triploides tiende a despegarse preferentemente a partir de la primera maduración y, en consecuencia, podrían aportar una mayor diversificación de tallas relevante para el mercado.

Manipulación sexual y ginogénesis

El estudio de los mecanismos de determinación sexual en especies cultivadas es esencial para poder obtener poblaciones monosexo en aquellas especies en que las ventajas de crecimiento, maduración, o adaptación al mercado estén asociadas a uno de los sexos. La determinación del sexo en los peces exhibe características peculiares, dada su mayor labilidad y versatilidad que en el resto de los vertebrados (Bull, 1983): son poco frecuentes los heteromorfismos cromosómicos asociados con el sexo, se han descrito mecanismos poligénicos de determinación sexual, es factible la reversión sexual mediante tratamientos hormonales, son frecuentes los casos de hermafroditismo y también los factores ambientales pueden influir la determinación sexual (Conover y Kynard, 1981; Yamazaki, 1983; Brum, 1996; Devlin y Nagahama, 2002; Woram *et al.*, 2003). Sin embargo, existen pruebas indirectas de mecanismos genéticos de determinación sexual similares a los de los vertebrados superiores, como son las proporciones de sexos en ginogenéticos, androgenéticos y las progenies de neomachos, la existencia de herencia típica del par sexual para ciertos caracteres y de heteromorfismos ligados al sexo o la evidencia de secuencias específicas del sexo heterogamético (Hunter y Donaldson, 1983; Nanda *et al.*, 1992). Una de las aproximaciones a esta cuestión desarrollada en los últimos años ha sido la búsqueda de secuencias de ADN específicas asociadas al sexo (Nakayama *et al.*, 1994; Reed, Bohlander y Phillips, 1995; Matsuda *et al.*, 2002). En nuestro caso hemos aplicado aproximaciones citogenéticas con cromosomas mitóticos (Bouza, Sánchez y Martínez, 1994; Pardo *et al.*, 2001) o las más resolutivas de la primera profase meiótica (Cuñado *et al.*, 2002) para tratar de evidenciar heteromorfismos asociados al sexo en rodaballo, sin resultado positivo. Otras aproximaciones moleculares, como el rastreo del genoma con baterías de miles de RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), han revelado la presencia de algunos marcadores asociados preferentemente a un sexo u otro (Casas *et al.*, en preparación). Actualmente, nuestro grupo está aplicando técnicas de genómica estructural (mapas genéticos y QTL) y proteómica para detectar regiones genómicas o genes específicos relacionados con los mecanismos de diferenciación gonadal en esta especie.

La obtención de ginogenéticos tiene importancia tanto por representar un material biológico esencial desde una perspectiva experimental, como para el mejoramiento de la producción en peces cultivados (Piferrer *et al.*, 2000; Felip *et al.*, 2001). El análisis de la proporción de sexos en ginogenéticos ha aportado información relevante en relación con la elucidación de los mecanismos de determinación sexual en diferentes especies (Cal *et al.*, en prensa b). Por otro lado, la posibilidad de obtener ginogenéticos haploides o líneas isogénicas de origen femenino o masculino (androgénesis), facilita enormemente el trabajo en la construcción de mapas genéticos y en el análisis detallado de regiones específicas del genoma (Danzmann y Gharbi, 2001; Fortes *et al.*, 2004; Zimmerman *et al.*, 2004). En producción, los ginogenéticos han sido utilizados para la obtención inmediata, o a través de neomachos, de poblaciones todo-hembras, y para el desarrollo rápido de líneas de elevada consanguinidad para la explotación del componente dominante de la varianza en caracteres productivos (Tave, 1993; Felip *et al.*, 2001). Nuestro grupo ha optimizado un método para la obtención de ginogenéticos en rodaballo con una eficiencia próxima al 100 % (Castro *et al.*, 2003; Piferrer *et al.*, 2004), que ha servido para confirmar la existencia de un mecanismo preferentemente de tipo XX-XY en la determinación del sexo en esta especie (Cal *et al.*, en prensa b). Igualmente, ginogenéticos haploides están siendo utilizados por nuestro equipo para la construcción de un primer mapa de moderada densidad con marcadores microsatélite (Fortes *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, observaciones no publicadas).

NUEVAS APROXIMACIONES EXPERIMENTALES: LA ERA DE LA GENÓMICA

El análisis de la función génica se ha realizado tradicionalmente de forma individualizada. A partir de la década 1991-2000, surgen metodologías que permiten el rastreo de grandes regiones genómicas mediante la obtención y el uso de mapas genéticos y el análisis funcional simultáneo de miles de genes, objetivo de los estudios de genómica funcional. La aparición de la genó-

mica se ha basado en avances tecnológicos importantes (secuenciadores, termocicladores, robotización) que permiten el análisis masivo de secuencias y fragmentos. Igualmente, ha sido decisivo el desarrollo de herramientas bioinformáticas que han permitido procesar y analizar cientos de miles de datos de forma rápida y ordenada, limitando la proporción de errores y automatizando numerosas tareas, antes realizadas manualmente. La acuicultura ha ido incorporando, aunque lentamente, las nuevas herramientas de la genómica en los últimos años, siguiendo las líneas aplicadas en agricultura y ganadería.

Mapas genéticos y detección de QTL: selección asistida por marcadores

Los mapas genéticos son esenciales para la identificación y el seguimiento de genes o regiones genómicas de interés económico (Quantitative Trait Loci, QTL), para programas de selección asistida por marcadores y, en última instancia, para la localización mediante clonaje posicional de genes relacionados con la salud y el crecimiento de animales domésticos (Danzmann y Gharbi, 2001). El desarrollo logrado en peces en este campo es notablemente inferior al de otras especies domésticas. Se han obtenido mapas genéticos en algunas especies, varias de ellas organismos modelo para investigación básica (tabla II).

La aplicación de mapas genéticos para la detección de QTL ha rendido resultados consistentes en diferentes especies (Hirooka *et al.*, 2001; Doerge, 2002; Korstanje y Paigen, 2002). Esta metodología ha sido ensayada en peces solo en pocos casos (tabla III), en gran parte debido a la ausencia del número necesario de marcadores moleculares y de mapas genéticos de la densidad apropiada. Junto al desarrollo de nuevos marcadores anónimos de tipo II en peces (Single nucleotide polymorphisms, SNP), es necesario avanzar también en la elaboración de mapas de genes específicos. Esto será posible mediante la detección de sus polimorfismos utilizando SSCP (Single strand conformation polymorphisms), la obtención de librerías de BAC (Bacterial artificial chromosomes) y el desarrollo de

Tabla II. Relación de mapas genéticos desarrollados hasta la fecha o en fase de construcción en especies relacionadas con la acuicultura.

Mapas genéticos disponibles	Referencia
Pez cebra <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)	Shimoda <i>et al.</i> , 1999
Tilapia <i>Oreochromis</i> spp.	Kocher <i>et al.</i> , 1998 Lee <i>et al.</i> , 2005
Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792)	Sakamoto <i>et al.</i> , 2000
Salmón atlántico <i>Salmo salar</i> L., 1758	Nichols <i>et al.</i> , 2003
Pez gato <i>Ictalurus punctatus</i> (Rafinesque, 1818)	Waldbieser <i>et al.</i> , 2001
<i>Xiphophorus</i> Poeciliidae	Walter <i>et al.</i> , 2004
Platija japonesa <i>Paralichthys olivaceus</i> (Temminck & Schelegel, 1846)	Coimbra <i>et al.</i> , 2003
Ostra japonesa <i>Crassostrea gigas</i> (Thumberg, 1793)	Hubert y Hedgecock, 2004
Ostra americana <i>Crassostrea virginica</i> (Gmelin, 1791)	Yu y Guo, 2003
Camarón tigre <i>Penaeus monodon</i> (Fabricius, 1798)	Li <i>et al.</i> , 2003
Walking catfish <i>Clarias macrocephalus</i> (Günther, 1864)	Poompuang y Na-Nakorn, 2004
Carpa común <i>Cyprinus carpio</i> L., 1758	Sun y Liang, 2004
Lubina <i>Dicentrarchus labrax</i> (L., 1758)	Chistiakov <i>et al.</i> , 2005
Mapas genéticos en desarrollo	
Rodaballo <i>Psetta maxima</i>	
Dorada <i>Sparus aurata</i> L., 1758	
Seabream <i>Pagrus major</i> (Temminck & Schelegel, 1846)	
Locha <i>Acanthopthalmus</i> sp.	
Besugo <i>Pagellus bogaraveo</i> (Brünnich, 1768)	
Carpa dorada <i>Carassius auratus</i> (L., 1758)	

mapas físicos y, finalmente, mediante la integración de estos últimos con los mapas genéticos (Liu y Cordes, 2004). La progresión en el mapeo genético de peces hará posible la identificación de regiones homólogas entre diferentes especies y la detección de sintenias que facilitarán la identificación de genes de interés. Este grupo de investigación está implicado actualmente en el desarrollo del primer mapa genético en rodaballo mediante la aplicación de microsátélites y AFLP (Amplified fragment length polymorphisms) (Fortes *et al.*, 2004). El desarrollo de más de 300 marcadores microsátélite permitirá obtener un mapa con una densidad promedio de 2-3 cM teniendo en cuenta el tamaño del genoma de esta especie (800 Mb) (Cuñado *et al.*, 2001) y el tamaño de los mapas desarrollados en especies filogenéticamente próximas (Coimbra *et al.*, 2003). Esta densidad de mapa asegurará la presencia de un marcador cada 10 cM, distancia apropiada para el análisis y detección de QTL en esta especie. Este mapa está siendo aplicado para la identificación de QTL relacionados con crecimiento y resistencia a enfermedades y con la detección de regiones genómicas asociadas con la determinación sexual.

Genómica funcional: los *microarrays*

La genómica funcional se basa en el análisis masivo de patrones de expresión en tejidos de interés mediante el diseño de *microarrays*. Éstos permiten detectar variaciones en la respuesta a determinadas condiciones experimentales, como pueden ser la presencia de un patógeno, de un probiótico en la dieta, cambios en una determinada fase del desarrollo, etc., y la identificación de genes relevantes relacionados con las mismas (Yang y Speed, 2002). Los *microarrays* pueden estar constituidos por EST (Expressed sequence tags) a partir de librerías de cDNA, o por oligos cortos, diseñados a partir de las regiones más específicas de los EST, como son los 3'UTR. Los *microarrays* de cDNA plantean el problema de ser más proclives a la comisión de errores en la identificación de los EST, a producir hibridaciones cruzadas entre genes parálogos o pertenecientes a una misma familia y son incapaces de diferenciar los diferentes productos de un mismo gen por *splicing* diferencial. Los *microarrays* de oligos permiten solventar gran parte de estos problemas, pero implican un coste económico muy superior, por lo que su aplicación sería justificable en proyectos o líneas que impli-

Tabla III. Algunas de las referencias más relevantes relacionadas con la aplicación de mapas genéticos para la detección de QTL en acuicultura.

Especie	Carácter	Referencias
Trucha arcoiris	Tolerancia a la temperatura	Jackson <i>et al.</i> , 1998
		Danzmann, Jackson y Ferguson, 1999
		Perry <i>et al.</i> , 2001
		Moen <i>et al.</i> , 2004
Salmón atlántico	Tiempo freza	Sakamoto <i>et al.</i> , 1999
	Enfermedades virales (IPN, IHN)/sistema inmune	Ozaki <i>et al.</i> , 2001
	<i>Natural killer cell</i>	Zimmerman <i>et al.</i> , 2004
Platija japonesa	Resistencia a enfermedades	Okamoto <i>et al.</i> , 2005
Tilapia	Resistencia a enfermedades	Moen, Munck y Raya, 2005
		Zimmerman <i>et al.</i> , 2004
Tilapia	Tolerancia salinidad/temperatura	Jackson <i>et al.</i> , 1998
		Cnaani <i>et al.</i> , 2003

quen una importante producción de *arrays*. El uso de esta tecnología exige la aplicación de herramientas estadísticas y bioinformáticas desde que se obtiene el dato primordial de la hibridación hasta la interpretación final de los resultados. La gran cantidad de procesos implicados en el flujo del análisis por *microarrays* (creación de librerías, diseño del *array*, hibridación, cuantifica-

ción y normalización de la señal), hace recomendable poner un énfasis especial en el control de errores (comprobaciones, réplicas biológicas).

Esta tecnología ha tenido un desarrollo muy limitado en acuicultura (tabla IV). Se está aplicando esta metodología en el rodaballo para la identificación de genes candidatos de resistencia a patógenos relevantes en relación con su culti-

Tabla IV. Principales referencias de aplicaciones de *microarrays* en peces. Se incluyen tanto especies modelo para estudios básicos como aquellas otras cultivadas con perfil aplicado.

Aplicación	Especie	Referencias
Desarrollo técnico de <i>microarrays</i>	Pez cebra	Clark <i>et al.</i> , 2001 Lo <i>et al.</i> , 2003
	Salmón atlántico	Rise <i>et al.</i> , 2004b
	Pez gato	Liu, 2003
Farmacogenómica	Pez cebra	Van der Ven <i>et al.</i> , 2005 Tamaru <i>et al.</i> , 2005
Desarrollo embrionario	Pez cebra	Corredor-Adámez <i>et al.</i> , 2005 Wen <i>et al.</i> , 2005 Kidd <i>et al.</i> , 2004
	Pez gato	Ju, Dunham y Liu, 2002
Toxicología/fisiología	Pez cebra	Ton, Stamatiou y Liew, 2003 Linney, Upchurch y Donerly, 2004 Cossins y Crawford, 2005
Patologías	Pez cebra	Meijer <i>et al.</i> , 2005
	Salmón atlántico	Ewart <i>et al.</i> , 2005 Rise <i>et al.</i> , 2004a
Análisis de mutaciones SNP	Pez cebra	Stickney <i>et al.</i> , 2002

vo, como son *Aeromonas salmonicida* y *Philasterides dicentrachi*. Estos genes se aislarán posteriormente a partir de librerías de BAC, se caracterizarán y se analizarán sus polimorfismos para su inclusión en el mapa genético existente. Se espera que el cruce de la información resultante del análisis de QTL, de la genómica comparada y del análisis genómico funcional rinda los resultados apetecidos de cara a su aplicación para la selección de reproductores en los programas desarrollados por las empresas del sector.

AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del grupo de Genética de Peces de la Universidad de Santiago de Compostela: Laura Sánchez, Carmen Bouza, Jaime Castro, Belén G. Pardo, Ania Pino-Querido, Miguel Hermida, Carlos Fernández, Laura Casas, Gloria Fortes y a los técnicos Sonia Gómez, Lucía Insua, Susana Sánchez, María Portela y María López. También a todos los grupos de investigación españoles e internacionales que han colaborado o están colaborando actualmente con nuestro grupo. Los datos de investigación presentados en este artículo son, en cierto modo, una revisión del trabajo en común a lo largo de 15 años. Igualmente, mi agradecimiento al esfuerzo de los revisores, que ha permitido mejorar notablemente el trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Apromar. 2004. *La Acuicultura en el Mundo*. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos: 39 pp.
- Bentsen, H. B. 1991. Quantitative genetics and management of wild populations. *Aquaculture* 98: 263-266.
- Blouin, M. S., M. Parsons, V. Lacaille y S. Lotz. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393-401.
- Bouza, C., P. Presa, J. Castro, L. Sánchez y P. Martínez. 2002. Allozyme and microsatellite diversity in natural and domestic populations of turbot (*Scophthalmus maximus*) in comparison with other Pleuronectiformes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 1460-1473.
- Bouza, C., L. Sánchez y P. Martínez. 1994. Karyotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional, fluorochrome, and restriction endonuclease banding techniques. *Mar. Biol.* 120: 609-613.
- Brookfield, J. F. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5: 453-455.
- Brum, M. J. I. 1996. Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. *Braz. J. Genet.* 19: 421-427.
- Bull, J. J. 1983. *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Benjamin Cumming Pub. Menlo Park, California. EE UU: 316 pp.
- Butlin, R. K. y T. Tregenza. 1998. Levels of genetic polymorphism: marker loci versus quantitative traits. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 353: 187-198.
- Cal, R. M., S. Vidal, C. Gómez, B. Álvarez-Blázquez, P. Martínez y F. Piferrer. (En prensa a.) Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 251: 99-108.
- Cal, R. M., S. Vidal, P. Martínez, B. Álvarez-Blázquez, C. Gómez y F. Piferrer. (En prensa b.) Growth and gonadal development of gynogenetic diploid *Scophthalmus maximus*. *J. Fish Biology* 68: 401-413.
- Castro, J., C. Bouza, R. M. Cal, L. Sánchez, F. Piferrer y P. Martínez. 2003. Gynogenesis assessment using microsatellite genetic markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine Biotechnology* 5: 584-592.
- Castro, J., C. Bouza, P. Presa, A. Pino-Querido, A. Ríaza, I. Ferreira, L. Sánchez y P. Martínez. 2004. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* 242: 119-135.
- Chakraborty, R. y O. Leimar. 1987. Genetic variation within a subdivided population. En: *Population Genetics & Fishery Management*. N. Ryman y F. M. Utter (eds.): 89-119. Washington Sea Grant Program. University of Washington Press. Washington.
- Chistiakov, D. A., B. Hellems, C. S. Haley, A. S. Law, C. S. Tsigenopoulos, G. Kotoulas, D. Bertotto, A. Libertini y F. A. M. Volckaert. 2005. A microsatellite linkage map of the european sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Genetics* 170: 1821-1826.
- Clark, M. D., S. Henning, R. Herwig, S. W. Clifton, M. A. Marra, H. Lehrach y S. L. Johnson. 2001. An oligonucleotide fingerprint normalized and expressed sequence tag characterized zebrafish cDNA library. *Genome Research* 11: 1594-1602.
- Cnaani, A., E. M. Hallerman, M. Ron, J. I. Weller, M. Indelman, Y. Kashi, G. A. E. Gall y G. Hulata. 2003. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size in an F-2 tilapia hybrid. *Aquaculture* 223: 117-128.
- Coimbra, M. R. M., K. Kobayashi, S. Koretsugu, O. Hasegawa, E. Ohara, A. Ozaki, T. Sakamoto, K. Naruse y N. Okamoto. 2003. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 220: 203-218.
- Conover, D. O. y B. E. Kynard. 1981. Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* 213: 577-579.
- Corredor-Adámez, M., M. C. M. Welten, H. P. Spaink, J. E. Jeffery, R. T. Schoon, M. A. G. de Bakker, C. P. Bagowski, A. H. Meijer, F. J. Verbeek y M. K. Richardson. 2005. Genomic annotation and transcriptome analysis of the zebrafish (*Danio rerio*) hox complex

- with description of a novel member, *hoxb13a*. *Evolution Developments* 7: 362-375.
- Cossins, A. R y D. L. Crawford. 2005. Opinion-Fish as models for environmental genomics. *Nature Reviews Genetics/Nat. Rev. Genet.* DESARROLLAR 6: 324-333.
- Crandall, K. A., O. R. P. Bininda-Emonds, G. M. Mace y R. K. Wayne. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 290-295.
- Cuñado, N., J. Terrones, L. Sánchez, P. Martínez y J. L. Santos. 2001. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes and oocytes of turbot, *Scophthalmus maximus* (Pisces, Scophthalmidae). *Genome* 44: 1143-1147.
- Cuñado, N., J. Terrones, L. Sánchez, P. Martínez y J. L. Santos. 2002. Sex-dependent synaptic behaviour in triploid turbot, *Scophthalmus maximus* (Pisces, Scophthalmidae). *Heredity* 89: 460-464.
- Danzmann, R. G. y K. Gharbi. 2001. Gene mapping in fishes: a means to an end. *Genetica* 111: 3-23.
- Danzmann, R. G., T. R. Jackson y M. M. Ferguson. 1999. Epistasis in allelic expression at upper temperature tolerance QTL in rainbow trout. *Aquaculture* 173: 45-58.
- Devlin, R. H. e Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
- Doerge, R. W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics* 3: 43-52.
- Dunham, R. A. 1996. Results of early pond-based studies of risk assessment regarding aquatic GMOs. En: *126th Annual Meeting of the American Fisheries Society* (26-29 de agosto, 1996. Dearborn, Michigan, EE UU). Abstract 381.
- Dunham, R. A., K. Majumdar, E. Hallerman, D. Bartley, G. Mair, G. Hulata, Z. Liu, N. Pongthana, J. Bakos, D. Penman, M. Gupta, P. Rothlisberg y G. Hoerstgen-Schwark. 2001. Review of the status of aquaculture genetics. En: *Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium* (20-25 de febrero, 2000. Bangkok, Tailandia). R. P. Subasinghe, P. Bueno, M. J. Phillips, C. Hough, S. E. McGladdery y J. R. Arthur (eds.): 129-157. NACA. Bangkok, Tailandia.
- Ewart, K. V., J. C. Belanger, J. Williams, T. Karakach, S. Penny, S. C. M. Tsoi, R. C. Richards y S. E. Douglas. 2005. Identification of genes differentially expressed in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to infection by *Aeromonas salmonicida* using cDNA microarray technology. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 171-179.
- Felip, A., G. Martínez-Rodríguez, F. Piferrer, M. Carrillo y S. Zanuy. 2000. AFLP analysis confirms exclusive maternal genomic contribution of meiogynogenetic sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Marine Biotechnology* 2: 301-306.
- Felip, A., S. Zanuy, M. Carrillo y F. Piferrer. 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 111: 175-195.
- Fortes, G. G., F. Nonnis-Marzano, G. Gandolfi, R. Cal, F. Piferrer, C. Bouza, P. Martínez y L. Sánchez. 2004. Preliminary linkage map in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with AFLPs and microsatellite markers. En: *Aquaculture Europe 2004: Biotechnologies for Quality* (20-23 de octubre, 2004. Barcelona, España). S. Adams y J. A. Olafsen (eds.). 34: 346-348. *European Aquaculture Society. Special Publication.* 34: 346-348.
- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annu. Rev. Genet.* 29: 305-327.
- Gjedrem, T. 2005. *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*. Springer. Berlín: 364 pp.
- Haig, S. M. y J. C. Avise. 1996. Avian conservation genetics. En: *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. J. C. Avise y J. L. Hamrick (eds.): 160-189. Chapman & Hall. Nueva York.
- Hara, M. y M. Sekino. 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture* 217: 107-114.
- Hirooka, H., D. J. de Koning, B. Harlizius, J. A. M. van Arendonk, A. P. Rattink, M. A. M. Groenen, E. W. Brascamp y H. Bovenhuis. 2001. A whole-genome scan for quantitative trait loci affecting teat number in pigs. *J. Anim. Sci.* 79: 2320-2326.
- Hubert, S. y D. Hedgecock. 2004. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* 168: 351-362.
- Hulata, G. 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111: 155-173.
- Hunter, G. A. y E. M. Donaldson. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. En: *Fish Physiology*. W. S. Hoar, D. J. Randall y E. M. Donaldson (eds.) 9 B: 223-303. Academic Press. Nueva York.
- Jackson, T., M. M. Ferguson, R. G. Danzmann, A. G. Fishback, P. E. Ihssen, M. O'Connell y T. J. Crease. 1998. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. *Heredity* 80: 143-151.
- Jackson, T. R., D. J. Martin-Robichaud y M. E. Reith. 2003. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture* 220: 245-259.
- Ju, Z., R. A. Dunham y Z. Liu. 2002. Differential gene expression in the brain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to cold acclimation. *Molecular Genetics and Genomics* 268: 87-95.
- Kidd, K. R., K. Greer, J. B. Hoying y B. M. Weinstein. 2004. Molecular analysis of arterial-venous differentiation using oligonucleotide microarray technology in the zebrafish. *FASEB Journal* 18 (supl. S): p. A776.
- Kincaid, H. L. 1983. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture* 33: 215-227.
- Kocher, T. D., W. J. Lee, H. Sobolewska, D. Penman y B. McAndrew. 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148: 1225-1232.
- Korstanje, R. y B. Paigen. 2002. From QTL to gene: The harvest begins. *Nature Genetics* 31: 235-236.
- Lee, B. Y., W. L. Lee, J. T. Streelman, K. L. Carleton y E. H. Aimee. 2005. A second-generation genetic lin-

- kage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics* 170: 237-244.
- Li, Y., K. Byrne, M. Emmanuela, V. Whan, S. Moore, S. Keys, P. Crocos, N. Preston y S. Lehnert. 2003. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture* 219: 143-156.
- Linney, E., L. Upchurch y S. Donerly. 2004. Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicology and Teratology* 26: 709-718.
- Liu, Z. J. 2003. A review of catfish genomics: progress and perspectives. *Comparative and Functional Genomics* 4: 259-265.
- Liu, Z. J. y J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Lo, J., S. Lee, M. Xu, F. Liu, H. Ruan, A. Eun, Y. He, W. Ma, W. Wang, Z. Wen y J. Peng. 2003. 15.000 unique zebrafish EST clusters and their future use in microarray for profiling gene expression patterns during embryogenesis. *Genome Research* 13: 455-466.
- Lynch, M. y K. Ritland. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152: 1753-1766.
- Marshall, T. C., J. Slate, L. E. B. Kruuk y J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- Matsuda, M., Y. Nagahama, A. Shinomiya, T. Sato, C. Matsuda, T. Kobayashi, C. E. Morrey, N. Shibata, S. Asakawa, N. Shimizu, H. Hori, S. Hamaguchi y M. Sakaizumi. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417: 559-563.
- Meijer, A. H., F. J. Verbeek, E. Salas-Vidal, M. Corredor-Adámez, J. Bussman, A. M. van der Sar, G. W. Otto, R. Geisler y H. P. Spaink. 2005. Transcriptome profiling of adult zebrafish at the late stage of chronic tuberculosis due to *Mycobacterium marinum* infection. *Mol. Immunol.* 42: 1185-1203.
- Milligan, B. G., J. Leebens-Mack y A. E. Strand. 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology* 3: 423-435.
- Moen, T., J. J. Agresti, A. Cnaani, H. Moses, T. R. Famula, G. Hulata, G. A. E. Gall y B. May. 2004. A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23. *Aquaculture Research* 35: 893-904.
- Moen, T., H. Munck y L. G. Raya. 2005. A genome scan reveals a QTL for resistance to infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 247: 25-26.
- Moritz, C. 1994. Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375.
- Nakayama, I., F. Foresti, R. Tewari, M. Schartl y D. Chourrout. 1994. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma* 103: 31-39.
- Nanda, I., M. Schartl, W. Feichtinger, J. T. Epplen y M. Schmid. 1992. Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. *Chromosoma* 101: 301-310.
- Nichols, K. M., W. P. Young, R. G. Danzmann, B. D. Robinson, C. Rexroad, M. Noakes, R. B. Phillips, P. Bentzen, I. Spies, K. Knudsen, F. W. Allendorf, B. M. Cunningham, J. Brunelli, H. Zhang, S. Ristow, R. Drew, K. H. Brown, P. A. Wheeler y G. H. Thorgaard. 2003. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Genet.* 34: 102-115.
- Okamoto, N., K. Fuji, A. Ozaki, M. R. M. Coimbra, T. Sakamoto, K. Kobayashi y O. Hasegawa. 2005. Identification of QTL associated with viral disease resistance in fish. *Aquaculture* 247: 26-27.
- Ozaki, A., T. Sakamoto, S. Khoo, K. Nakamura, M. R. Coimbra, T. Akutsu y N. Okamoto. 2001. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Genetics and Genomics* 265: 23-31.
- Pardo, B. G., C. Bouza, J. Castro, P. Martínez y L. Sánchez. 2001. Localization of ribosomal genes in Pleuronectiformes using Ag- and CMA3 banding and *in situ* hybridization. *Heredity* 86: 531-536.
- Pérez-Enríquez, R., M. Takagi y N. Taniguchi. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* 173: 411-421.
- Perry, G. M. L., R. G. Danzmann, M. M. Ferguson y J. P. Gibson. 2001. Quantitative trait loci for upper thermal tolerance in outbred strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity* 86: 333-341.
- Phillips, R. B., K. A. Pleyte y P. E. Ihssen. 1989. Patterns of chromosomal nucleolar organizing region (NOR) variation in fishes of the genus *Salvelinus*. *Copeia* 47-53: 132-136.
- Piferrer, F., R. M. Cal, B. Álvarez-Blázquez, L. Sánchez y P. Martínez. 2000. Induction of triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*): I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* 188: 79-90.
- Piferrer, F., R. M. Cal, C. Gómez, B. Álvarez-Blázquez, J. Castro y P. Martínez. 2004. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture* 238: 403-419.
- Piferrer, F., R. M. Cal, C. Gómez, C. Bouza y P. Martínez. 2003. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture* 220: 821-831.
- Poompuang, S. y U. Na-Nakorn. 2004. A preliminary genetic map of walking catfish (*Clarias macrocephalus*). *Aquaculture* 232: 195-2003.
- Queller, D. C. y K. F. Goodnight. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.
- Reed, K. M., S. K. Bohlander y R. B. Phillips. 1995. Microdissection of the Y chromosome and fluorescence *in situ* hybridization analysis of the sex chromosomes of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosome Research* 3: 221-226.

- Reed, D. H. y R. Frankham. 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55: 1095-1103.
- Rise, M. L., S. R. M. Jones, G. D. Brown, K. R. Von Schalburg, W. S. Davidson y B. F. Koop. 2004a. Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Physiological Genomics* 20: 21-35.
- Rise, M. L., K. R. von Schalburg, G. D. Brown, M. A. Mawer, R. H. Devlin, N. Kuipers, M. Busby, M. Beetz-Sargent, R. Alberto, A. R. Gibbs, P. Hunt, R. Shukin, J. A. Zeznik, C. Nelson, S. R. Jones, D. E. Smailus, S. J. Jones, J. E. Schein, M. A. Marra, Y. S. Butterfield, J. M. Stott, S. H. Ng, W. S. Davidson y B. F. Koop. 2004b. Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: Data mining and interspecific hybridization characteristics. *Genome Research* 14: 478-490.
- Ruzzante, D. E., M. M. Hansen y D. Meldrup. 2001. Distribution of individual inbreeding coefficients, relatedness and influence of stocking on native anadromous brown trout (*Salmo trutta*) population structure. *Molecular Ecology* 10: 2107-2118.
- Sakamoto, T., R. G. Danzmann, K. Gharbi, P. Howard, A. Ozaki, S. K. Khoo, R. A. Woram, N. Okamoto, M. M. Ferguson, L. E. Holm, R. Guyomard y B. Hoyheim. 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* 155: 1331-1345.
- Sakamoto, T., R. G. Danzmann, N. Okamoto, M. M. Ferguson y P. E. Ihssen. 1999. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 173: 33-43.
- Shimoda, N., E. W. Knapik, J. Ziniti, C. Sim, E. Yamada, S. Kaplan, D. Jackson, F. de Sauvage, H. Jacob y M. C. Fishman. 1999. Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics* 58: 219-232.
- Stickney, H. L., J. Schmutz, I. G. Woods, C. C. Holtzer, M. C. Dickson, P. D. Kelly, R. M. Myers, y W. S. Talbot. 2002. Rapid mapping of zebrafish mutations with SNPs and oligonucleotide microarray. *Genome Research* 12: 1929-1934.
- Sun, X. y L. Liang. 2004. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance. *Aquaculture* 238: 165-172.
- Tamaru, Y., T. Wakasa, S. Akiyama y T. Tanaka. 2005. Transcriptome analysis on an antidepressant drug, imipramine by zebrafish DNA microarray. *J. Pharm. Sci.* 97 (supl. 1): p. 76.
- Tave, D. 1993. *Genetics for Fish Hatchery Managers*. Van Nostrand Reinhold. Nueva York: 415 pp.
- Terrones, J. M. 2002. Análisis morfológico y funcional del desarrollo gonadal y del crecimiento en rodaballo (*Scophthalmus maximus*): diploides vs triploides. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (A Coruña), España: 237 pp.
- Thorgaard, G. H. 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. En: *Fish Physiology*. W. S. Hoar, D. J. Randall y E. M. Donaldson (eds.) IX (B): 405-434. Academic Press. Nueva York.
- Ton, C., D. Stamatiou y C. C. Liew. 2003. Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development. *Physiological Genomics* 13: 97-106.
- Toro, M. A. y C. López-Fanjul. 1997. Mejora genética en Acuicultura. En: *Producción Animal Acuática*. C. Buxadé (ed.): 107 pp. Mundi-Prensa. Madrid.
- Utter, F. M., J. E. Seeb y L. W. Seeb. 1993. Complementary uses of ecological and biochemical genetic data in identifying and conserving salmo populations. *Fisheries Research* 18: 59-76.
- Ven, K. van der, M. de Wit, D. Keil, L. Moens, K. van Leemput, B. Naudts y W. de Coen. 2005. Development and application of a brain-specific cDNA microarray for effect evaluation of neuro-active pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 141: 408-417.
- Waldbieser, G. C., B. G. Bosworth, D. J. Nonneman y W. R. Wolters. 2001. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Genetics* 158: 727-734.
- Walter, R. B., J. D. Rains, J. E. Russell, T. M. Guerra, C. Daniels, D. A. Johnston, J. Kumar, A. Wheeler, K. Kelnar, V. A. Khanolkar, E. L. Williams, J. L. Hornecker, L. Hollek, M. M. Mamerow, A. Pedroza y S. Kazianis. 2004. A microsatellite genetic linkage map for xiphophorus. *Genetics* 168: 363-372.
- Wang, J. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203-1215.
- Wen, C. M., Z. H. Zhang, W. P. Ma, M. Xu, Z. L. Wen y J. R. Peng. 2005. Genome-wide identification of female enriched genes in zebrafish. *Development Dynamics* 232: 171-179.
- Woram, R. A., K. Gharbi, T. Sakamoto, B. Hoyheim, L. E. Holm, K. Naish, C. McGowan, M. M. Ferguson, R. B. Phillips, J. Stein, R. Guyomard, M. Cairney, J. B. Taggart, R. Powell, W. Davidson y R. G. Danzmann. 2003. Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in Salmonid fishes. *Genome Research* 13: 272-280.
- Yamazaki, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture* 33: 329-354.
- Yang, Y. H. y T. Speed. 2002. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nature Reviews Genetics* 3: 579-588.
- Yu, Z. N. y X. M. Guo. 2003. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Biol. Bull.* 204: 327-338.
- Zimmerman, A. M., J. P. Evenhuis, G. H. Thorgaard y S. S. Ristow. 2004. A single major chromosomal region controls natural killer cell-like activity in rainbow trout. *Immunogenetics* 55: 825-835.