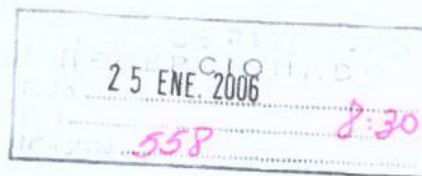


INFORME TECNICO FINAL



I. ANTECEDENTES GENERALES

NOMBRE DEL PROYECTO:
BIOTECNOLOGIA EN ACUICULTURA: TECNOLOGIA DE MARCADORES GENETICO-MOLECULARES EN EL MANEJO DE CARACTERES PRODUCTIVOS EN ESPECIES CULTIVADAS.

CODIGO : BIOT 01-AC-21
REGIONES : METROPOLITANA, X y XI
FECHA INICIO : 30 DICIEMBRE 2001
CONCURSO : PROGRAMA DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA
EJECUTOR : FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

COORDINADOR DEL PROYECTO: Dr. Nelson F. Díaz

COSTO TOTAL :
APORTE FIA :
PERIODO DE EJECUCIÓN:

USO INTERNO FIA	
FECHA DE RECEPCION	23 de ENERO de 2006

II. RESUMEN EJECUTIVO

El presente proyecto permitió realizar avances significativos en la búsqueda de Marcadores genéticos asociados a la Fecha de Desove en salmón coho, *Oncorhynchus kisutch*. En una primera aproximación, se obtuvo resultados de polimorfismos RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNAs) que mostraron diferencias entre salmones de desove temprano vs desove tardío.

Posterior al desarrollo de los polimorfismos RAPD, se efectuó la construcción de SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), con el resultado de tres marcadores SCAR útiles para diferenciar salmones de desove temprano vs desove tardío. Estos son resultados propios, relevantes, que han sido aportados a la información genética disponible en Gene Bank y podrán utilizarse a futuro en selección genética.

En otro ámbito, se realizó la búsqueda de polimorfismos con marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) o Microsatélites, y se obtuvo resultados de microsatélites polimórficos entre salmones de desove temprano vs desove tardío.

Posteriormente se confeccionaron partidores fluorescentes para estos microsatélites y con esta metodología se identificaron seis microsatélites que permiten diferenciar entre salmones de desove temprano vs desove tardío. Uno de estos microsatélites, OkiCAT229UCH es un hallazgo del trabajo del proyecto. Estos también son resultados propios, relevantes, y que acorde con los objetivos del proyecto son aporte disponible para trabajos futuros de selección de dicho carácter.

Entre las metodologías mas importantes, además del PCR para amplificación de partidores RAPD y microsatélites, el uso de partidores fluorescentes, hay que agregar el uso de Bioinformática para evaluar los resultados, y las metodologías de cálculo de asociación para afirmar que marcadores tipo RAPD-SCAR o Microsatélites permiten diferenciar peces de desove temprano vs desove tardío.

Se cumplieron así los objetivos mas relevantes, como desarrollar la infraestructura para estudios con marcadores genético-moleculares, e identificar y disponer de marcadores relacionados a la fecha de desove en salmón coho, cuya posterior selección genética permitirá mayor eficiencia en los cultivos de esta especie.

También se realizaron acciones de transferencia como un Taller y una Publicación Técnica, y se completaron dos manuscritos científicos.

III.TEXTO PRINCIPAL

1. BREVE RESUMEN DE LA PROPUESTA.

La propuesta para el presente proyecto se elaboró en el amplio contexto de **desarrollar marcadores genético-moleculares asociados a caracteres productivos, en salmón coho**, especie de gran importancia en la acuicultura chilena.

Los marcadores genéticos desarrollados permitirán **reconocer individuos con el carácter deseado, aportando nuevos criterios que posteriormente servirán de base a una Selección Asistida en Programas de mejoramiento genético.**

Los resultados se proyectan a **generar herramientas biotecnológicas para incrementar la eficiencia de la selección artificial** y por esa vía incrementar la productividad de los cultivos validando un modelo para la Acuicultura en general.

Objetivo General

Disponer de marcadores genético-moleculares aplicables a la Selección asistida en Programas de mejoramiento genético, desarrollando aspectos de Genómica comparada y de Bioinformática, asociados al análisis genético en especies de importancia productiva en acuicultura.

Objetivos Específicos

1. Identificar y disponer de marcadores genético-moleculares relacionados a la fecha de desove y evaluar su uso potencial en selección asistida en salmón coho.
2. Desarrollar infraestructura teórico práctica de Bioinformática necesaria para el análisis de los resultados de estudios de marcadores genético-moleculares.
3. Realizar divulgación y transferencia tecnológica.

Material biológico para el proyecto fueron salmones coho del Programa de Mejoramiento Genético desarrollado en conjunto por la Universidad de Chile y el Instituto de Fomento Pesquero, IFOP, en el Complejo Piscícola de Coyhaique, donde se mantienen dos poblaciones llamadas, "clase año par" e "impar", según si los peces desovan en años pares o impares. Cada clase año constituye una población separada, que consta de 100 familias de hermanos y medios hermanos, donde los individuos pertenecientes a cada familia están identificados con una marca electrónica.

2. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO.

Objetivo 1. Identificar y disponer de marcadores genético-moleculares relacionados a la fecha de desove y evaluar su uso potencial en selección asistida en salmón coho.

El Objetivo se cumplió con la construcción de tres marcadores RAPD-SCAR que han sido aportados a la información genética disponible en Gene Bank y pueden ser utilizados a futuro en selección genética. Además se obtuvo la identificación de seis marcadores Microsatélites asociados a la fecha de desove de salmón coho, resultados propios, relevantes, y que también son aporte disponible para trabajos futuros de selección de dicho carácter.

Su potencial uso en selección asistida es factible a partir de la demostrada asociación al carácter y a que se han analizado las alternativas para su aplicación.

Objetivo 2. Desarrollar infraestructura teórico práctica de Bioinformática necesaria para el análisis de los resultados de estudios de marcadores genético-moleculares.

El Objetivo se cumplió con la realización del Curso: "BIOINFORMÁTICA". Este se realizó entre el 19 y 23 de Enero de 2004 en Santiago, con la participación del Profesor Invitado Dr. Juan F. Medrano, de la University of California-Davis. El curso contó con 10 asistentes, incluidos los cinco ejecutantes del proyecto para actualizar nuestra formación en el tema.

El proyecto aportó además un Computador y un Notebook que han permitido el acceso a bases de datos, y la Facultad implementó las redes y espacio físico correspondientes.

Objetivo 3. Realizar Divulgación y Transferencia tecnológica.

El Objetivo se cumplió, en lo que es divulgación de sus resultados, con la presentación de siete trabajos a Congresos científicos nacionales e internacionales, y la elaboración de 2 Manuscritos con los resultados científicos del proyecto.

La transferencia hacia el sector productivo se realizó mediante un Taller en la X Región, que contó con asistencia de 16 personas, y una Publicación técnica en apoyo de dicho Taller y que fue entregada a los asistentes.

3. ASPECTOS METODOLOGICOS DEL PROYECTO.

Muestreo de peces y obtención de DNA

El criterio utilizado para seleccionar hembras de desove Temprano (TE) fue elegir hembras del primer tercio del periodo total de desove, que no fueran hermanas o medias hermanas. Conociendo las fechas de desove de cada hembra y su genealogía, se eligieron 33 de 99 hembras disponibles al desove el año 2001, y a partir de estas se extrajo ADN a 20 muestras para los análisis posteriores.

En el caso de las hembras de desove Tardío (TA), se contaba con 54 muestras de sangre tomadas a individuos de ese grupo en Febrero del 2001, meses antes de su maduración, por lo que se desconocía el sexo. Por esta razón fue necesario extraer ADN a todas las muestras, e identificar el sexo de los individuos, resultando 35 hembras, de las cuales se utilizaron 20 para los análisis posteriores.

Se realizó la extracción de ADN de muestras de sangre de salmón coho: 54 individuos de desove Tardío (TA) de sexo desconocido y 20 hembras de desove Temprano (TE). Se utilizó el siguiente protocolo:

Extracción ADN de glóbulos rojos nucleados con el método fenol-cloroformo

1. 20 μ l sangre almacenada en TNES-Urea se mezcló con 600 μ l de buffer STE, 10 μ l Proteinasa K (20 mg/ml) y 25 μ l SDS 20%. en un tubo eppendorf
2. Se dejó en agitación a 42 °C durante toda la noche.
3. Se agregó 600 μ l fenol equilibrado con Tris pH 8.0 (volumen 1:1).
4. Se centrifugó a 2500 rpm por 10 min .
5. La fase acuosa se traspasó con una pipeta de polipropileno a un tubo eppendorf
6. Se repitió dos veces los pasos 3 , 4 y 5.
7. La fase acuosa se traspasó a un tubo eppendorf y se agregó el volumen equivalente de cloroformo : fenol 1 : 1. Centrifugar a 2500 rpm por 10 min .
8. La fase acuosa se traspasó a un tubo eppendorf y se agregó con una pipeta de polipropileno igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Centrifugar a 2500 rpm por 10 min
9. La fase acuosa se traspasó a un tubo eppendorf. Se agregó dos volúmenes de ETOH absoluto frío para precipitar el DNA
10. En una pipeta de vidrio con punta sellada se enrolló la nube de ADN precipitado y se lavó con etanol 70%. El ADN se secó al vacío y se transfirió a un tubo eppendorf con 600 μ l de buffer TE pH 8.0. La solución de ADN se incubó a 45 °C durante 2 h en baño termostático.
11. El ADN extraído se almacenó a 4 °C.

Una vez obtenido el ADN se establece su concentración a partir de la medición en el espectrofotómetro.

Mediante PCR-RFLP se determinó el sexo de las muestra TA. utilizando como marcador el intrón C del gen de la hormona de crecimiento. Se aplicó el siguiente protocolo:

Amplificación de GH2 intrón C

1. Preparación de la mezcla de reacción para PCR de las para muestras de ADN de Salmón coho de sexo indeterminado (para 1 muestra):

H2O	10.57 ul
Buffer	1.5 ul
MgCl2 (50 mM)	0.6 ul
dnTP (10 mM)	0.18 ul
Partidor L	0.5 ul
Partidor R	0.5 ul
Taq	0.15 ul
ADN	1 ul

2. Colocar la mezcla de reacción en el termociclador (MJ Research) y utilizar el programa COHOGH2+, el cual consta de los siguientes pasos:

- 1) 94 °C x 2 min
- 2) 92 °C x 1 min
- 3) 62 °C x 1 min
- 4) 72 °C x1 min
- 5) ir al paso 2, 29 veces
- 6) 72 °C x x3 min
- 7) 20 ° C fin

3. Observar el producto de PCR en gel de agarosa al 1.2 % , en buffer TBE 1X para verificar amplificación. Se toman 5 ul del amplificado. El ADN se tiñe con bromuro de etidio y se visualiza en un transiluminador.

Digestión del intrón C

- 1 Digerir el amplificado restante con enzima Hinf I en buffer nº2 (Biolab). Para 1 muestra:

H2O	3.82 ul
Buffer 2	1 ul
ADN	5 ul
Enzima	0.18 ul

- 2 Preparación de gel de agarosa 1.8 % para visualizar resultado de la digestión. Se toman 2.5 ul de buffer de carga y se agrega a cada tubo.

Metodología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste en hacer la replicación *in vitro* del ADN, con el objeto de obtener múltiples copias de un segmento específico de esta molécula. Esta técnica toma ventaja de uso de una enzima polimerasa, la que permite la replicación o copia del ADN. Actualmente la enzima mas utilizada es la *Taq* polimerasa, que es estable a las altas temperaturas requeridas por la automatización de la PCR, pues fue originalmente aislada de una bacteria (*Thermus aquaticus*) que habita en aguas termales.

La PCR utiliza dos partidores u oligonucleótidos de secuencia corta, entre 10 y 35 bases o nucleótidos de longitud, que son diseñados para que sean complementarios a la región del genoma que se quiere copiar, llamada ADN blanco o molde. Estos partidores se unen en forma complementaria y antiparalela al molde para permitir la copia fiel del ADN que queda entre ambos partidores. En una mezcla típica de reacción de PCR los partidores son agregados en exceso al ADN blanco, en presencia nucleótidos (Adenina, Guanina, Timina y Citosina), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) como co-factor y de un tampón que asegura el funcionamiento óptimo de la enzima; todos estos componentes permiten la acción de la polimerasa y consecuentemente la copia del ADN molde. Esta copia es realizada en ciclos de 25 a 35 reacciones individuales, donde el resultado de una amplificación hace de blanco para la siguiente, incrementándose exponencialmente el numero de moléculas copiadas en cada ciclo hasta alcanzar 2^{25} a 2^{35} copias del ADN inicialmente usado en la mezcla de reacción.

Cada ciclo contiene un perfil de temperatura que permite separar las dos hebras de la molécula de ADN molde, la unión específica de los partidores y la acción de la polimerasa. La primera fase, llamada denaturación, comienza calentando la mezcla a 94 o 95 °C para separar las hebras de ADN, lo que permite la unión posterior de los partidores. En esta segunda fase, la temperatura se baja entre 35 a 70°C, dependiendo del tamaño promedio y secuencia de cada partidor que conforman el par utilizado (en general se consideran 2°C por cada Timina o Adenina presente y 4°C por cada Guanina y Citosina). Finalmente en una tercera fase llamada de polimerización, la temperatura es elevada a 72°C, óptima para el funcionamiento de la polimerasa, donde se produce la copia el fragmento de ADN que se esta amplificando.

La ventaja de los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa es que esta metodología permite generar grandes cantidades de ADN de segmentos específicos del genoma de un individuo en forma rápida, con baja complejidad técnica y sin necesitar personal con alto grado de entrenamiento.

Metodología de los Marcadores RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNAs)

El RAPD es una aplicación del PCR que permite generar rápidamente y a bajo costo una batería de marcadores genético moleculares sin conocer *a priori* nada del genoma donde serán utilizados. El desarrollo de esta metodología data de los años noventa, alcanzando su máxima aplicación en los años 1999 al 2003, siendo actualmente utilizada en especies para los que no se han desarrollado un número suficiente de otros marcadores moleculares mas informativos, tales como los microsatélites o SSR.

En un ensayo de RAPD se utiliza un sólo partidor de secuencia arbitraria (usualmente de 10 bases de longitud o 10-mer) para realizar un PCR. Los partidores son diseñados para contener un porcentaje de Guanina + Citosina de entre un 50 a 70%. Otra variación importante en relación con el PCR estándar es que la temperatura de unión de los partidores utilizada es tan baja como 35 °C. Con estas condiciones los partidores se unen, pero no en un 100%, a sitios complementarios presentes en el ADN genómico en estudio para generar la mayor cantidad de fragmentos amplificados posibles. Cuando dos partidores se unen en sitios presentes en el ADN en forma opuesta y antiparalela, dentro de una distancia amplificable (experimentalmente determinada en nuestro laboratorio como 3000 bases) se obtiene la copia de un fragmento discreto de ADN que puede ser visualizado en gel de agarosa al 2%. Sin embargo, como esto puede suceder en más de dos sitios distintos en el ADN genómico de un individuo usualmente se amplifican un promedio de entre 5 a 6 fragmentos por partidor RAPD, número que depende de cada especie en particular y de la secuencia del partidor.

La base molecular del polimorfismo detectado por RAPD corresponde a mutaciones en el sitio de unión de los partidores al ADN blanco, pudiéndose también deber a inserciones y pérdidas de segmentos de varios nucleótidos en la región comprendida entre ambos sitios de unión de los partidores. Por su naturaleza, el RAPD es una técnica multiloci, es decir se amplifican varios sitios en el genoma a la vez en la misma reacción de PCR, sin embargo, cada uno de ellos puede ser tratado como un locus (sitio del genoma) separado, e incluso se puede seguir la segregación mendeliana de cada marcador en familias donde el fragmento presenta polimorfismo.

Otra característica importante de los marcadores dominantes en general y del RAPD en particular es que cada marcador de este tipo puede ser convertido en un marcador de locus simple SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions). Los marcadores SCAR también son basados en PCR y sólo amplifican un fragmento genómico a diferencia del RAPD que amplifica varios a la vez. Los marcadores SCAR tienen aplicaciones biotecnológicas más interesantes cuando ellos son derivados de marcadores RAPD que han sido asociados con loci que controlan rasgos cuantitativos de importancia económica.

Protocolo estándar para uso de partidores RAPD.

La reacción de amplificación se realiza en un volumen de 15 μ l, que contenga:

1x de buffer de reacción 10x
1,8 mM $MgCl_2$
100 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP),
25 picomoles de partidor RAPD
20 ng de ADN genómico
0,5 unidades de Taq ADN polimerasa

Metodología de los Marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions).

Fragmentos polimórficos previamente identificados por ensayos RAPD pueden ser aislados del gel, purificados, clonados y secuenciados, con la finalidad de diseñar partidores para realizar una PCR que permita la amplificación específica del fragmento de interés. Si esto es logrado con éxito el fragmento de secuencia específica amplificado por PCR se convierte en un marcador SCAR. Como de este marcador se conoce su secuencia total de nucleótidos, muchas veces es posible identificar la naturaleza del polimorfismo detectado previamente por el marcador dominante. Estos marcadores SCAR, tienen la ventaja de ser especie específicos y además, un porcentaje de ellos puede presentar un patrón de herencia codominante, es decir se puede distinguir el individuo heterocigoto de los homocigotos, facilitando el análisis genético y sus potenciales aplicaciones.

Para construir un marcador SCAR se debe conocer la secuencia completa del marcador RAPD que interesa estudiar y para hacer esto es necesario obtener por clonación molecular múltiples copias del marcador dominante que permitan su posterior secuenciación en un laboratorio especializado que de este servicio. De este modo, la metodología básica de construcción de marcadores tipo SCAR contempla los siguiente pasos:

Primero hay una etapa de **Aislamiento y Purificación**, donde los fragmentos RAPD que se identificaron como polimórficos son amplificados por PCR, visualizados en una electroforesis y cortados del gel con una hoja de bisturí estéril. Posteriormente son purificados con un "kit de purificación de fragmentos PCR". Una consideración importante es que el fragmento polimórfico a ser purificado debe provenir del ADN genómico de un sólo individuo.

La segunda etapa es la de **Clonación**, donde el fragmento purificado es clonado en un plásmido o vector de clonación. Idealmente el vector de clonación debe ser uno que primero sea específico para clonar fragmentos obtenidos de una PCR, es decir, que sea un "TA cloning vector". Además debe permitir secuenciar los fragmentos clonados, es decir, debe contener a ambos lados del sitio de clonación secuencias para la unión para partidores universales (M13, T7 o T3) que se usarán en la

secuenciación del fragmento clonado. Existe una gran variedad de vectores de clonación, los mas eficientes son los vectores TOPO que poseen una enzima topoisomerasa que ayuda a la unión del fragmento purificado con el plásmido. La transformación química se realiza con las cepas de bacteria *E. coli* "competentes" proporcionadas con el kit o en su defecto se usan cepas DH5- α que son rutinariamente preparadas en todos lo laboratorios que realizan clonación molecular.

Una vez realizada la transformación y teniendo las colonias de bacterias que han sido cultivadas toda la noche en una placa de petri, viene la etapa de **Recuperación de Colonias Recombinantes y Purificación de Plásmidos**. La selección de las colonias recombinantes, es decir, que contienen bacterias que han incorporado el plásmido con el fragmento de PCR clonado, se realiza por "screening" blanco/azul en un medio con agar LB, utilizando como agente restrictivo ampicilina o kanamicina, dependiendo del gen de resistencia a antibiótico que posea el vector de clonación. En estas condiciones las colonias que presentan el fragmento de PCR clonado son de color blanco, mientras las que no tienen el fragmento clonado son de color azul. Finalmente se seleccionan varias colonias blancas para hacerlas crecer por 8 horas en 2 ml con medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y posteriormente se rompen las bacterias y se recuperan los plásmidos utilizando algún kit para hacer "Minipreps". De este tipo de columnas también existen varias marcas en el mercado y todas son igualmente eficientes.

En una etapa posterior las minipreps obtenidas son enviadas a **Secuenciación**, aquí la mejor opción en cada miniprep es secuenciarlas por "ambos lados" con partidores "forward" y "reverse". Debe notarse que el numero de secuencias dependerá del tamaño de cada fragmento clonado, un fragmento cuyo tamaño es mayor a 700 pb puede requerir el diseño de "partidores internos" para completar su secuenciación.

Con los resultados de secuenciación, se inicia el **Análisis de las Secuencias y Diseño de Partidores**. Cada una de las secuencias obtenidas se analiza en busca se segmentos repetidos, presencia de sitios de corte con enzimas de restricción y para diseñar los partidores específicos para amplificar el SCAR por PCR, los partidores también se mandan a sintetizar a laboratorios especializados, siguiendo los mismos criterios de la secuenciación. Normalmente cada partidore específico para el SCAR se diseña utilizando los 10 nucleótidos del partidore RAPD agregando 10 a 12 nucleótidos internos obtenidos de las secuencias del marcador SCAR.

Finalmente hay que realizar al **Amplificación del Marcador SCAR** en ADN genómico con los partidores específicos diseñados, para confirmar la presencia del polimorfismo ya sea de naturaleza dominante o codominante y detección de polimorfismo. Esta etapa puede requerir de algún tiempo de estandarización de las condiciones del PCR, para poder lograr la amplificación del marcador SCAR del tamaño esperado de acuerdo a su secuencia. Para confirmar el patrón de herencia lo ideal es amplificar el SCAR en familias, ambos padres y al menos unos diez hijos, para seguir su segregación mendeliana.

Metodología de los Marcadores Microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats).

Un tipo de secuencias de ADN repetidas en "tandem", es decir una tras otra, presentes en todos los genomas son los llamados microsatélites o secuencias repetidas simples (SSR), que corresponde a repeticiones de motivos cuyo tamaño fluctúa entre 1 a 4 nucleótidos de longitud.

En la amplificación por PCR de los microsatélites, los partidores se ubican en las regiones genómicas que flanquean las secuencias repetidas en "tandem", y por lo tanto, estos marcadores son especie específicos debido a que estas secuencias flanqueantes varían de una especie a otra.

El aislamiento y desarrollo de microsatélites puede ser técnicamente muy complejo y laborioso, de modo que por lo general se utilizan microsatélites desarrollados por otros investigadores para la especie bajo estudio. En el caso de que no existan microsatélites específicos para la especie estudiada, se pueden usar partidores "heterologos" aislados de especies evolutivamente cercanas y transferirlos a la que es objeto del estudio.

El polimorfismo detectado por un marcador SSR corresponde a variaciones en el numero de repeticiones del motivo central del microsatélite, que puede ser revelado por electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción radioactiva o con plata, o en un secuenciador automático utilizando en la PCR uno de los partidores modificado químicamente con un fluorocromo coloreado (rojo, verde, azul o amarillo) junto con el programa Genescan^{MR} para analizar los fragmentos resultantes.

El patrón de herencia de los marcadores microsatélites es codominante (se distinguen los homocigotos de los heterocigotos) y presentan en general una gran cantidad de alelos por locus, dado que las secuencias repetidas en tandem tienen tasas de mutación de dos a tres ordenes de magnitud mayores que las secuencias únicas (10^{-3} por gametos por generación v/s 10^{-6} , Ellegren 2004).

Ejemplo de Protocolo para amplificación de microsatélites:

La reacción de amplificación se realiza en un volumen de 20 μ l, que contenga:

1x de buffer de reacción 10x
1,5 mM $MgCl_2$
100 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP),
0,2 μ M de cada partidor
20 ng de ADN genómico
0,75 unidades de Taq ADN polimerasa

Esta mezcla de reacción es usada para amplificar al marcador SSR en un termociclador, programado con un perfil de temperaturas de:

1	94°	2'
2	94°	50''
3	54°	50''
4	72°	1'
5	ir a 2 X 32 veces	
6	72°5'	Fase final de extensión
7	10°	∞
8	END	

(**) Esta temperatura es específica para cada par de primarios y depende del tamaño y la secuencia de estos.

Los productos de amplificación se someten a electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 6%, son teñidos con plata. Mayor resolución se obtiene utilizando primarios fluorescentes, que permiten identificar en forma precisa el tamaño de los alelos en pares de bases, para esto como fue mencionado un primario de cada par se sintetiza con una modificación química en su extremo 5', introduciendo un fluorocromo del color elegido: FAM (azul), VIC (verde), NED (amarillo), etc.

Métodos de Análisis de Asociación

La aproximación para identificar asociación entre un marcador molecular con dos alelos, o un marcador de presencia/ausencia tipo SCAR, con un rasgo de interés productivo es el clásico test de asociación de chi cuadrado (X^2) o en su defecto la prueba exacta de Fisher (Terwilliger & Ott, 1994).

Ambos fueron utilizados con los marcadores SCAR construidos: SCAR-249, SCAR-075 y SCAR-229.

Para marcadores que presentan muchos alelos, como los microsatélites, estos tests de asociación no son útiles, debido a que, al hacer una prueba de asociación de X^2 con todos los alelos presentes en el loci aumenta el número de grados de libertad del test.

Para evitar el problema descrito se analizaron en el informe 6 tres aproximaciones propuestas, decidiéndose utilizar el estadístico (L_D) para analizar la asociación entre un rasgo y un marcador polimórfico. Este estadístico tiene la ventaja de presentar una distribución de probabilidad asintótica a la chi-cuadrado y es fácil de calcular (Choulakian & Mahdi, 2000). En este estadístico, el nivel de significación para detectar la asociación entre un alelo y un rasgo es del 0,1% ($\alpha = 0,001$).

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS

A. Cruzamientos y Muestreos de peces

Los peces utilizados corresponden a estocs que se mantienen a partir del cruzamiento de 30 a 35 machos con 100 hembras. Los salmones seleccionados para la búsqueda de marcadores moleculares fueron los que desovan temprana y tardíamente de la población clase año impar, año 2001. Otra muestra de la clase año impar, 1995, fue utilizada como control. Se obtuvo muestras de sangre de los peces y a partir de éstas se obtuvo ADN para la búsqueda de marcadores.

B. Búsqueda de Polimorfismos RAPD

En una primera aproximación, para la búsqueda de polimorfismos RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNAs) asociados al carácter, se adquirieron partidores, se capacitó a personas, y se puso en funcionamiento los equipos necesarios. Así se obtuvo resultados de polimorfismos que mostraron diferencias entre salmones de desove temprano vs desove tardío.

C. Construcción de Marcadores SCAR

Posterior al desarrollo de los polimorfismos RAPD, se efectuó la construcción de SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), marcadores de mayor utilidad porque permiten identificar la naturaleza del polimorfismo detectado previamente por el fragmento RAPD y porque tienen la ventaja de ser codominantes y especie específicos. Así se confeccionaron tres marcadores SCAR relacionados al carácter en estudio.

D. Búsqueda de Polimorfismos SSR

En otro ámbito, se realizó la búsqueda de polimorfismos con marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) o Microsatélites, para lo cual se analizó al inicio del proyecto la información bibliográfica disponible, se sintetizaron partidores, se capacitó a personas y se puso en funcionamiento los equipos necesarios.

Posteriormente se confeccionaron partidores fluorescentes para los microsatélites polimórficos, por cuanto los partidores fluorescentes tienen la ventaja que sus productos con la PCR (Polymerase Chain Reaction) se analizan en un secuenciador automático, lográndose una mucho mejor resolución en el análisis de alelos en comparación con su resolución en geles de agarosa o acrilamida.

E. Análisis de Asociación

Aparte del análisis clásico de X^2 , se incorporó el estadístico (L_D) para analizar la asociación entre un rasgo y un marcador polimórfico. Este estadístico tiene la ventaja de presentar una distribución de probabilidad asintótica a la chi-cuadrado y es fácil de calcular (Choulakian & Mahdi, 2000).

F. Propuesta de uso de Marcadores en MAS.

La utilización de marcadores asociados a un carácter en Programas de selección asistida por marcadores (MAS = Marker Assisted Selection), no ha sido realizada aún en especies acuícolas. Se realizó un análisis teórico de alternativas de su utilización, lo que junto a la disponibilidad de marcadores hacen factible su uso en la acuicultura nacional.

G. Presentaciones a Reuniones Científicas

Los resultados parciales de trabajos del proyecto se presentaron en siete reuniones científicas, tanto nacionales como internacionales, en forma de poster o de presentaciones orales.

H. Taller para Transferencia

Se realizó un Taller en Puerto Montt, orientado a personas que trabajan en universidades y empresas, entregándose información general sobre marcadores genéticos y los resultados del proyecto.

I. Publicación Técnica

Se elaboró una publicación especial para la transferencia de usos y resultados con marcadores moleculares, en lenguaje y con aportes metodológicos apropiados para la comprensión y uso por personas no especialistas.

J. Publicaciones científicas

Se eleboraron dos manuscritos científicos para ser publicados en revistas especializadas.

K. Curso de Bioinformática

Se realizó un Curso de Bioinformática para capacitación del propio personal del proyecto e interesados externos.

5. RESULTADOS DEL PROYECTO

Se trabajó con dos tipos de marcadores moleculares, RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNAs) y SSR (Simple Sequence Repeats) o Microsatélites, buscando asociación al carácter fecha de desove.

Con los marcadores RAPD, a partir de una búsqueda con 400 partidores, se obtuvo polimorfismos que mostraron diferencias entre salmones de desove temprano vs desove tardío, y aquellos marcadores RAPD polimórficos (UBC-075, UBC-229 y UBC-249), fueron utilizados para la construcción de SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), marcadores codominantes y especie específicos.

Se construyeron tres marcadores SCAR útiles (Tabla 5.1), *Oki075*, *OkiCAT229UCH* y *Oki249*, que permiten diferenciar salmones de desove temprano vs desove tardío.

Tabla 5.1

Características de tres SCAR asociados a fecha de desove en salmón coho.

Partidor RAPD	Marcador SCAR	Numero acceso GeneBank	Tipo de polimorfismo	Patrón de Herencia
UBC-075	<i>Oki075</i>	AY926350	Minisatélite	Codominante
UBC-229	<i>OkiCAT229UCH</i>	AY926352	Microsatélite	Codominante
UBC-249	<i>Oki249</i>	AY929856	Presencia/Ausencia	Dominante

Marcador SCAR-*Oki075*

Para este marcador se identificó un motivo de repetición de 52 pb, correspondiendo a la estructura de un minisatélite (secuencia de entre 5 a 100 pares de bases repetida en "tandem"). Se detectaron tres alelos cuyos tamaños aproximados fueron: alelo 1 = 620pb, alelo 2 = 734 pb, y alelo 3 = 796 pb. Algunos individuos fallaron consistentemente en amplificar este marcador aun cuando se utilizó ADN previamente usado para amplificar otros marcadores, lo que implica la presencia de un alelo nulo. En la Figura 5.1 se muestra una amplificación de los alelos detectados en individuos homocigotos y heterocigotos.

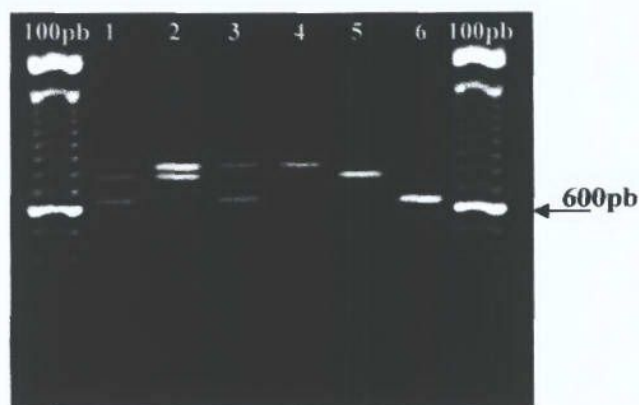


Figura 5.1.

Amplificación del marcador SCAR *Oki075* en hembras de salmón coho heterocigotas (genotipos 1/2, 2/3 y 1/3, carriles 1, 2 y 3, respectivamente) y homocigotas (genotipos 3/3, 2/2 y 1/1 carriles 4, 5 y 6, respectivamente).

Protocolo de Amplificación para marcador SCAR-075.

Mezcla de Reacción:		Programa de Amplificación		
H ₂ O	12,87 ul	1	94°	2'
Buffer 1X	2,5	2	94°	1':30"
MgCl ₂	0,75	3	60°	1':30"
dNTPs	0,2	4	72°	2'
Primer F	0,5	5	ir a 2 X 29 veces	
Primer R	0,5	6	72°	7'
Taq	0,18	7	15°	∞
DNA (5 ng/ul)	3	8	END	
Total:	20 ul			

Verificación del modo de herencia.

El patrón de herencia mendeliana codominante en la segregación del SCAR *Oki075* fue verificado en una familia compuesta por ambos progenitores y ocho individuos de su progenie, resultado que se muestra en la Figura 5.2

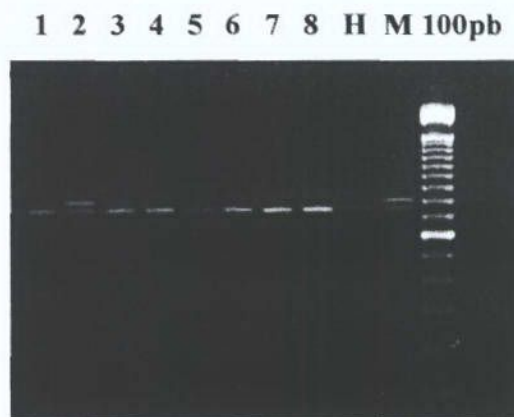


Figura 5.2

Amplificación del marcador SCAR Ok075 en una familia de salmón coho.
M = padre, H = madre.

Como se muestra en la Figura, el progenitor masculino es heterocigoto (genotipo 2/3) y el femenino es homocigoto (genotipo 2/2). En la progenie sólo se observan individuos donde la segregación de los alelos corresponde con la de sus progenitores. Todos los individuos de la progenie presentan un genotipo de acuerdo con los alelos que presentan sus progenitores .

Marcador SCAR-229

Protocolo de Amplificación para el marcador SCAR 229

Mezcla de Reacción:		Programa Amplificación-1			Programa Amplificación-2		
H ₂ O	10,728 ul	1	95°	5'	1	95°	3'
Buffer 1X	1,5	2	94°	2'	2	95°	0':30"
MgCl ₂	0,39	3	55°	1':30"	3	58°	1'
dNTPs	0,15	4	72°	1':30"	4	72°	1'
Primer F	0,3	5	ir a 2 X 34 veces		5	ir a 2 X 30 veces	
Primer R	0,3	6	72°	5'	6	72°	5'
Taq	0,132	7	4°	∞	7	10°	∞
DNA (5 ng/ul)	1,5	8	END		8	END	
Total:	15 ul						

100 pb Te1 Te2 Te3 Te4 Te5 Te6 100pb Ta1 Ta2 Ta3 Ta4 Ta5 Ta6 100 pb

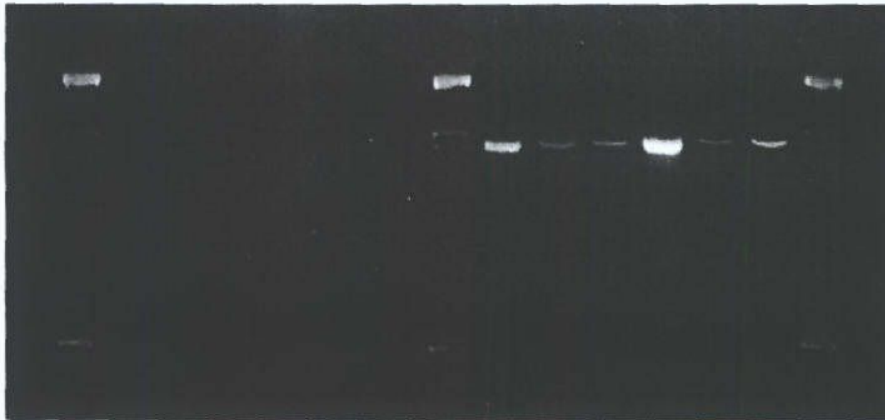


Figura 5.4

Marcador SCAR dominante Oki249 (1422 pb) asociado con fecha de desove en 7 hembras de desove temprano (Te) y 7 de desove tardío (Ta) en salmón coho, *Oncorhynchus kisutch*.

Protocolo de Amplificación para el marcador SCAR-249.

Mezcla de Reacción:		Programa de Amplificación		
H ₂ O	12,87 ul	1	94°	2'
Buffer 1X	2,5	2	94°	1':30"
MgCl ₂	0,75	3	60°	1':30"
dNTPs	0,2	4	72°	2'
Primer F	0,5	5	ir a 2 X 29 veces	
Primer R	0,5	6	72°	7'
Taq	0,18	7	15°	∞
DNA (5 ng/ul)	3	8	END	
Total:	20 ul			

Con los marcadores Microsatélites, se realizó una búsqueda con 40 microsatélites descritos para diferentes especies de salmónidos

Para la reacción de PCR de cada microsatélite, se usó el siguiente protocolo básico:

Buffer de reacción 1X,
200 uL de cada dNTP,
1,5 mM de MgCl₂,
0,2uM de cada partidor,
0,75 unidades de Taq DNA polimerasa (GibcoBRL)
20 ng de DNA templado;

Volumen total de la mezcla 20 uL

El programa básico de amplificación es 30 ciclos a 94°C (1min); temperatura de "annealing" de cada par de partidores (1min); 74°C (1min), seguido por una fase de extensión de 74 °C (5min).

En la Figura 5.5 se muestra a modo de ejemplo un resultado de amplificación, visualizando los alelos en un gel de agarosa.

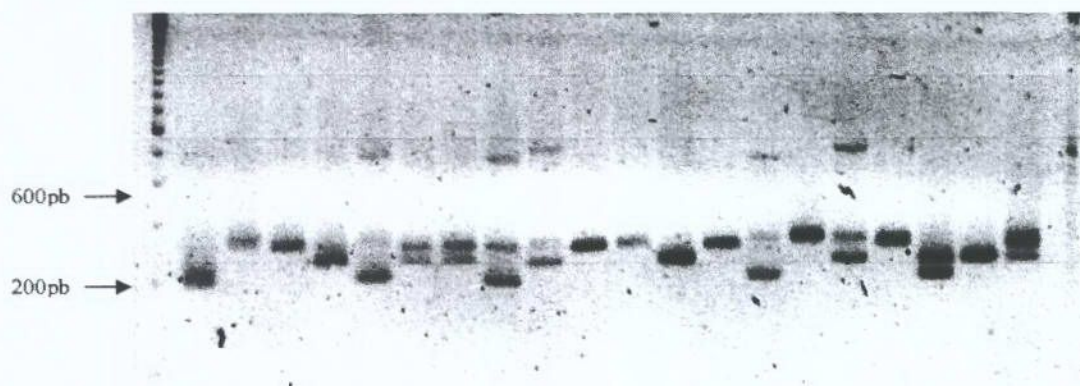


Figura 5.5

Amplificación del microsatélite *OkCAT229UCH* en 20 hembras de desove tardío.

Como resultado de este primer análisis con técnicas clásicas de PCR y resolución en geles de agarosa o poliacrilamida, se descartaron aquellos microsatélites monomórficos, y se trabajó con microsatélites polimórficos utilizando partidores fluorescentes y analizando los productos de PCR en un secuenciador automático ABI377, equipado con un software para análisis de fragmentos.

Se eligieron 12 microsatélites polimórficos y se enviaron a sintetizar los partidores fluorescentes. Se sintetizó un partidore de cada microsatélite, con una modificación química en su extremo 5' con el fluorocromo del color elegido : azul, verde rojo o amarillo (Applied Biosystems CA, USA), considerando la forma mas conveniente para su identificación por colores en corridas simultáneas con mas de un microsatélite, de acuerdo a las especificaciones que se entregan en la Tabla 5.2

Se completaron los análisis con todos ellos en las poblaciones de desove Temprano y Tardío de peces del año 2001. Entre estos se incluye el microsatélite OkiCAT229UCH, descubierto durante nuestra búsqueda de marcadores RAPD.

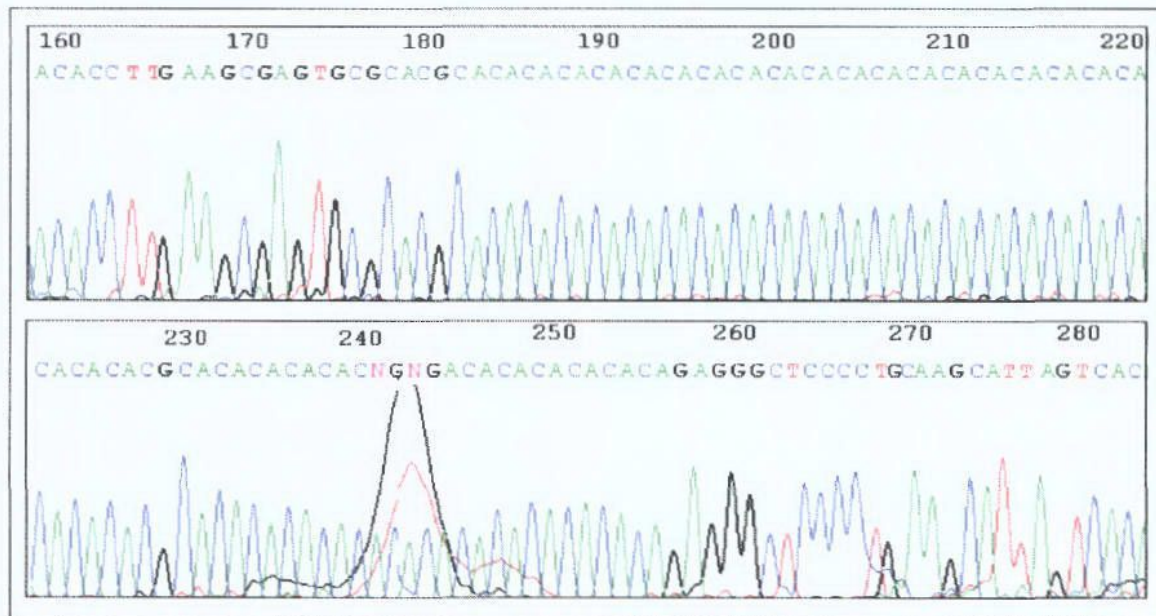
También se realizaron amplificaciones con estos partidores a fin de validar los resultados de asociación obtenidos entre marcadores microsatélites con fecha de desove para lo cual se utilizaron muestras de peces del año 1995, y de peces del año 2004. Estos últimos constituyen una clase año diferente en su origen, de la clase año impar, y que constituye una población independiente.

Tabla 5.2

Secuencias de partidores y temperaturas de "annealing", para 12 microsatélites usados en salmón coho.

Locus	Secuencia de partidores (5'-3')	Temperatura de Annealing	Referencias
Ogo1UW	F: GATCTGGGCCTAAGGGAAAC R: ACTAGCGGTTGGAGAACCC	59 °C	Olsen <i>et al.</i> , 1998
Ogo2UW	F: ACATCGCACACCATAAGCAT R: TCGTTCCTGTTTACGTCCACT	58 °C	Olsen <i>et al.</i> , 1998
Ots4BML	F: GACCCAGAGCACAGCACAA R: GGAGGACACATTTCAGCAG	58 °C	Banks <i>et al.</i> , 1999
Sasa311NCVM	F: TAGATAATGGAGGAACTGCATTCT R: CATGCTTCATAAGAAAAAGATTGT	54 - 60 °C	Slettan <i>et al.</i> , 1995
One2ASC	F: GGTGCCAAGGTTTCAGTTTATGTT R: CAGGAATTTACAGGACCCAGGTT	62 °C	Scribner <i>et al.</i> , 1996
Onep6	F: CAGAGTGGCCTAGATGCTTTAAT R: CCACACACCAAATCCTACCCTTA	60 °C	Scribner <i>et al.</i> , 1996
One19ASC	F: CTGGAAAGCACAGAGAGAGCCTT R: TCCAACAGTCTAACAGTCTAACCA	57 °C	Scribner <i>et al.</i> , 1996
OmyFGT22TUF	F: AGTGAACCTCCAGTGTTCCGG R: CTATGACGCGGCAGGAAC	70 - 60 °C	Sakamoto, 1996
OmyFGT34TUF	F: ACAGTAAGATGTGGGGGCTG R: TAAATTGACTGAGCAGCTGCC	64 - 58 °C	Sakamoto, 1996
OmyPuPuPyDU	F: ATGCAGCGGATGTAGGGGGA R: TTAAGTGAAAAGACGTAACCTTACC	52 °C	Morris <i>et al.</i> , 1996
Oki10	F: GGAGTGCTGGACAGATTGG R: CAGCTTTTTACAAATCCTCCTG	60 - 54 °C	Smith <i>et al.</i> , 1998
OkiCAT229UCH	F: TGT TGG AGC CAA CCT CTT TC R: CAC ACC TTG AAG CGAGTG C	58 °C	Araneda <i>et al.</i> , 2005

En la figura 5.6 se ejemplifica un resultado de análisis de un microsatélite con partidores fluorescentes.

**Figura 5.6**

Análisis de secuenciación del microsatélite *Oki229UCH* aislado en salmón coho.

Se observa una motivo di-nucleótido CA repetido en "tandem", .

Resultados de Asociación

Los análisis de asociación se realizaron para dos de los marcadores SCAR, dado que del marcador SCAR 229 se derivó un microsatélite y este fue incorporado a análisis con otros microsatélites.

En la Table 5.3 se entregan valores de asociación calculados para el marcador SCAR *Oki075*, incluyendo la población control 1995.

Tabla 5.3

Análisis de asociación entre alelos del marcador SCAR *Oki075* y temporada de desove en salmón coho, poblaciones 2001 y 1995.

	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 3	Total	L _D	Probabilidad
2001 Temprano	7	22	9	38	9,286	0,00231
Tardío	17	9	6	32		
1995 Temprano	8	15	17	40	14,531	0,00014
Tardío	10	1	27	38		

Se considera asociación si la Probabilidad es menor a 0,001

El SCAR *Oki249* mostró asociación altamente significativa entre la presencia del SCAR y la época tardía de desove ($\chi^2 = 20,417$; 1gl, Prob. Exacta < 0,0001). Con estos valores, la probabilidad de asignar correctamente a un salmón al grupo de desove tardío dado que presenta SCAR *Oki249* es de un 79,17%.

Los análisis de asociación con microsatélites, utilizando la población 2001, se realizaron para once microsatélites, incluido el *OkiCAT229UCH*, derivado del SCAR 229 ya mencionado. Los resultados se resumen en la Tabla 5.4

Tabla 5.4

Análisis de asociación entre alelos microsatélites y fecha de desove en salmón coho, población 2001.

Microsatélite	Nº Alelos	Asociación	Alelo	L_D	Probabilidad (χ^2)
Ogo1	2	No			
One2ASC	11	Si, con grupo Tardío	212	14,117	0,000170
One μ 6	11	No			
One19ASC	7	Si, con grupo Temprano	222	16,970	0,000038
OmyFGT22TUF	11	No			
OmyFGT34TUF	12	Si, con grupo Tardío	143	16,807	0,000041
OmyPuPuPyDU	9	No			
Ots4BML	4	No			
Oki10	14	Si, con grupo Tardío	231	16,229	0,000056
OkiUCh229	11	Si, con grupo Tardío	238	12,750	0,000038

Se considera asociación si la Probabilidad es menor a 0,001

Se considera asociación fuerte si la Probabilidad es menor que 0,0002

En esta Tabla se muestran los resultados con el estadístico L_D para 11 marcadores SSR estudiados en las hembras de las poblaciones de desove temprano (TE) y tardío (TA) en el año 2001. Los marcadores One2ASC, One19ASC, Oki10, Omy34, OmyPuPuPyDU y OkiCAT229UCH presentan alelos significativamente representados en una población y no en la otra, lo que es indicativo de asociación entre estos loci SSR y fecha de desove. Además, los marcadores One2ASC, One19ASC y Omy34 se han encontrado asociados con fecha de desove en trucha arcoiris (Sakamoto et al. 1999, Fishback et al. 2000, O'Malley et al. 2002), hallazgo que apoya la evidencia de su asociación con desove en salmón coho detectada en este proyecto.

El análisis utilizado es una prueba de asociación para la cual se construye una tabla de frecuencias de 2×2 , donde en las filas están representadas las poblaciones comparadas (desove temprano y tardío) y en la primera columna cada alelo es ingresado individualmente, mientras que en la segunda columna se juntan en una sola categoría todos los alelos restantes y se realiza la comparación estimando el estadístico L_D para cada uno de los alelos en el locus separadamente, seleccionando como L_D el valor mas alto de estos.

De este modo no basta con que un alelo este fuertemente representado en un grupo para ser significativa la asociación sino que además el alelo en cuestión debe estar poco representado en la otra población en relación a la suma de los alelos restantes.

Por ejemplo, en el locus Oki10 para el alelo 231, población 2001 el escenario es el siguiente:

	231 pb	Resto alelos	Total
Temprano	0	40	40
Tardío	11	29	40
Total	11	69	80

El valor de L_D para este alelo es de 12,75 con un $P = 0,00036$; claramente aquí si se logra un criterio de asociación moderada

En el caso de una asociación fuerte, locus Omy34 para el alelo 143, población 2001 el escenario es el siguiente:

	143 pb	Resto alelos	Total
Temprano	1	39	40
Tardío	16	24	40
Total	17	63	80

El valor de L_D para este alelo es de 16,81 con un $P = 0,000041$; que claramente sobrepasa los criterios utilizados para asignar asociación aceptados.

Estos criterios para asignar asociación corresponden a los aceptados en los estudios de mapeamiento de genes como lo validos cuando se utilizan valores de LOD Score. Este valor para asignar ligamiento corresponde a un LOD score de 3.0 que equivale a un nivel de significación del 0,0002. (los valor de L_D se pueden transformar a LOD Score dividiéndolos por 4,6). Estos criterios se utilizan para evitar cometer error estadístico tipo II, es decir aceptar la hipótesis de asociación cuando esta es en realidad falsa, como ha ocurrido en numerosos estudios de este tipo.

Por otra parte el locus Ogo 2 corresponde a un caso especial, pues este presentó un patrón de herencia tetrasómica (locus duplicado) y fue descartado de los análisis de asociación pues habían individuos que presentaban hasta 4 alelos segregando y bajo la condiciones utilizadas es imposible distinguir el origen parental de estos alelos.

Las asociaciones para los microsatélites en la población 1995 fueron menos relevantes, sólo OmyFGT34TUF (alelo 153 con desove tardío $L_D = 12.12$) y One19ASC (alelo 232 con desove tardío $L_D = 14,05$ y alelo 234 con desove temprano $L_D = 13.09$). Nótese que los alelos con asociación son distintos y los valores de L_D son menores.

En la población 2004 no se encontraron asociaciones significativas.

Análisis de aplicación de Marcadores Genéticos en Selección Asistida por Marcadores. (MAS= Marker Assisted Selection).

¿Cómo utilizar los marcadores?

En los programas de mejoramiento genético en peces existe el interés en utilizar marcadores moleculares en sus sistemas de selección:

- 1.- Para aquéllas características de baja heredabilidad, donde es difícil separar los efectos del ambiente en la expresión fenotípica.
- 2.- Para aquéllas características que no se pueden medir en el mismo individuo, ya sea por dimorfismo sexual o por que se requiere su sacrificio, como pueden ser caracteres asociados a calidad de la carne.
- 3.- Porque son muy difíciles de medir o es muy costoso contar con registros adecuados o por que se expresan muy tarde en la vida.

Los principales resultados de esta tecnología se originarán de un aumento de la precisión en la evaluación genética de los futuros reproductores; aumentando la intensidad de selección y disminuyendo el intervalo entre generaciones.

La posibilidad de utilizar marcadores genéticos ligados a QTL's para escoger los futuros reproductores resulta más eficiente hacerlo asociado a métodos de estimación del valor de cría, basados en valores fenotípicos individuales y de sus parientes, que basados solo en la información molecular por dos razones:

1. Porque existe la probabilidad de que un individuo que tiene el marcador no tenga el QTL debido a efectos de recombinación genética y
2. Porque un individuo que no tenga el marcador no será considerado como reproductor aún cuando posea muchos otros genes (poligenes) que favorecen el carácter. Lo mejor es combinar la información molecular con la información fenotípica, porque con ello sumaremos al efecto del QTL el efecto aditivo de los otros genes que favorecen al carácter, esto es lo que se denomina "selección asistida por marcadores (MAS)".

En el caso de marcadores ligados a un QTL, para un individuo en particular no podemos saber si la versión del marcador que posee está ligada al alelo favorable del QTL. Si se tiene evidencia que la progenie de un macho que ha recibido una de las versiones del marcador (+) tiene mejor comportamiento que aquélla que no la ha recibido, entonces conoceremos que fase de ligamiento está asociada a la versión alélica favorable del QTL. Sin embargo esta información es útil para este individuo en particular y su familia. Para su progenie se puede asignar una probabilidad asociada a la presencia del marcador (+) con la presencia de la versión alélica favorable del QTL, que está determinada por la tasa de recombinación.

De esta discusión resulta evidente la ventaja que significa contar con una base de datos con registros adecuados de información genotípica y de pedigrí, sobre todo porque ahora se cuenta con metodología para utilizar la información de todos los

parientes de un individuo para inferir qué variante del marcador que posee cada individuo está asociada a la variante favorable del QT_.

Selección asistida.

Los programas de mejoramiento genético de peces que cuentan con sistemas de selección basados en la estimación del valor genético aditivo (valor de cría) de cada individuo, sobre la base de su registro fenotípico de él y de sus parientes a través de estimadores BLUP (Best Unbiased Predictor), pueden ser aún más eficientes mediante la utilización de marcadores genéticos en sistemas que se denominan Selección Asistida por Marcadores (MAS).

El *valor de cría estimado* (EBV), o simplemente *valor de cría*, de un individuo se obtiene normalmente de un análisis utilizando un *modelo mixto*, que utilizando notación matricial puede escribirse como:

$$y = Xb + Za + Ze \quad (1)$$

donde **y** es un vector de observaciones, **b** es un vector de efectos fijos, **a** es un vector de valores genéticos aditivos aleatorios y **e** es un vector de efectos residuales aleatorios. **X** es una matriz de diseño que relaciona **y** con efectos fijos y **Z** es una matriz de diseño conocida que relaciona **y** con los valores genéticos aditivos y con los efectos residuales respectivamente. Los efectos fijos corresponden normalmente a fuentes de variación conocidas, como jaula, año, edad, etc. que tengan efectos significativos sobre la expresión fenotípica las observaciones que se miden.

En la ecuación del modelo (1) la estimación de los valores genéticos aditivos representa la suma de los efectos promedios de los varios o muchos poligenes que explican la variación del carácter cuantitativo que se analiza y que se encuentran en loci desconocidos. La adición de información de marcadores genéticos cambia levemente este la ecuación (1) a un *modelo de herencia mixto* (*mixed inheritance model*) como sigue:

$$y = Xb + Wq + Za + Ze$$

con efecto fijos en **b**, efectos de QTL en **q** y de valores genéticos aditivos en **a**. La matriz de diseño **W** relaciona **y** con el genotipo del QTL de los individuos. En este caso la herencia del QTL no es necesariamente la misma que para los efectos de los poligenes, por ejemplo la asociación entre el QTL de dos peces (ej. padre – hijo) puede ser completa, mientras que para el efecto del resto de los loci (poligenes) la covarianza es a lo sumo el 50% de la varianza fenotípica.

El efecto de los poligenes se estima como valores de cría para cada individuo descontado el efecto del QTL, mientras que los efectos QTL son estimados dando cuenta de la variación producida por los poligenes.

El efecto del genotipo – QTL puede ser estimado como efecto fijo, siguiendo un análisis en dos pasos, primero calculando la probabilidad asociada a cada genotipo para el QTL y luego calculando una regresión de los fenotipos sobre estas

probabilidades (Kinghorn et al 1993) o calculando directamente la regresión ponderada por estas probabilidades (Meuwisen y Goddard, 1997). En ambos casos el modelo incluye los efectos fijos y los valores genéticos aditivos entregando las probabilidades del genotipo-QTL y los valores genéticos aditivos para todos los individuos.

El efecto del genotipo – QTL puede ser también estimado como efecto aleatorio (Fernando y Grossman, 1989). El modelo para este análisis es:

$$y = Xb + Wv + Za + Ze$$

con efectos gaméticos en v que es un vector de tamaño igual al doble del número de individuos que contiene efectos genéticos maternos y paternos. Esta aproximación estima un valor genético asociado al genotipo- QTL para cada individuo, calculando la probabilidad de identidad por descendencia de los alelos para el QTL entre gametos. Este valor genético para el QTL se denomina *valor de cría marcador-asistido (marker-assisted estimated breeding value) (MA-EBV)*, que se entrega junto al *valor genético aditivo* para cada individuo.

Aplicaciones.

No existen ejemplos documentados de resultados de la aplicación de selección asistida por marcadores en peces, y aún muy pocos casos de QTL's mapeados con asociación a caracteres de importancia económica, de manera que las estimaciones que existen acerca de la ventaja de utilizar selección asistida provienen de estudios de simulación.

Kinghorn (2000) presenta gráficamente la situación general. Cuando la selección involucra a un QTL individual, la mayor respuesta puede ir de un 2% a un 60% en las primeras generaciones, cuya magnitud depende de la heredabilidad del carácter, de la dificultad de medición del fenotipo, de la proporción de la variación explicada por el QTL , etc. La ventaja se hace cada vez mas pequeña, luego de las primeras generaciones porque los alelos favorables se fijan con rapidez.

6. FICHAS TÉCNICAS

7. PROBLEMAS ENFRENTADOS

Los únicos problemas enfrentados fueron problemas menores de retrasos en la tramitación de contratos, retrasos en algunas actividades de terreno por espera del ciclo reproductivo de los peces, por repetición de algunos experimentos particulares para mejorar resultados, lo que finalmente redundó en un retraso en la planificación original.

8 CALENDARIO DE EJECUCIÓN PROGRAMADO REAL

Resultado de lo anterior puede concluirse que el cumplimiento de las actividades se retrasó en aproximadamente dos meses en comparación con los plazos comprometidos.

9. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

I. DIFUSIÓN.

A. PRESENTACIONES A CONGRESOS CIENTÍFICOS Y SIMPOSIOS INTERNACIONALES.

1. Genetic divergence of early and late coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) spawners based on RAPD variation. C.Araneda, R. Neira, S. Cortéz, C. Soto, N.F. Díaz and P. Iturra. International Symposium Genetics in Aquaculture. 9-15 Noviembre 2003.
2. Diferenciación genética en hembras de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) con desove temprano y tardío. Cortéz, S., Araneda, C., Iturra, P. y Díaz, N.F. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. 27-29 Octubre 2004.
3. Status of the chilean aquaculture and use of genetic markers. N.F. Díaz. International Symposium "Australasian Aquaculture" Sydney 19-23 Septiembre 2004.
4. Microsatellites and RAPD-SCAR markers associated to spawn date in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Díaz, N.F., Iturra, P., Araneda, C. and Cortéz, S. World Aquaculture Congress. Indonesia. 9-15 Mayo 2005.
5. Identificación y caracterización de marcadores moleculares asociados con rasgos productivos en salmónidos. C. Araneda. Reunión Abierta REDBIO Argentina-Chile. Buenos Aires 7-10 Junio 2005.
6. Marcadores genético moleculares asociados a la fecha de desove en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*). Nelson F. Díaz. Seminario "Sector Agrícola y la Biotecnología, situación actual y desafíos". REDBIO Chile. 3-4 Noviembre 2005.
7. Caracterización de dos marcadores moleculares codominantes asociados con fecha de desove en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*). Araneda, C., Gómez, G., Pérez, C., Díaz, N.F. XLVIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. Noviembre 2005.

B. MANUSCRITOS CIENTÍFICOS EN REVISTAS ISI

1. Identification, development and characterization of three molecular markers associated to spawning date in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Cristian Araneda, Nelson F. Díaz, Roberto Neira, Soledad Cortéz, Claudio Pérez, and Patricia Iturra
Enviado a Revista Acta Zoológica Sinica ISI
2. Comparative approach shows evidence of association between microsatellite loci and QTLs affecting spawning date in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Nelson F. Díaz, Soledad Cortéz, Gilda Gómez, Patricia Iturra and Cristian Araneda. Se enviará a Animal Genetics ISI.

II. TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

A. CURSOS Y TALLERES

1. Curso:
"BIOINFORMÁTICA".
Realizado entre el 19 y 23 de Enero de 2004 en Santiago.
Profesor Invitado Dr. Juan F. Medrano. University of California-Davis.
10 asistentes.
2. Taller:
"El uso de marcadores Genético moleculares en el mejoramiento genético de peces"
Realizado en Puerto Montt el 2 de Diciembre de 2005.
Expositores: Nelson F. Díaz, Cristian Araneda, Patricia Iturra, Roberto Neira.
16 asistentes.

B. PUBLICACIONES TÉCNICAS

1. El uso de marcadores Genético moleculares en el mejoramiento genético de peces. Nelson F. Díaz, Cristian Araneda, Patricia Iturra, Roberto Neira.. 2005. 64 págs.

10. IMPACTOS

Los principales impactos son el cumplimiento de los Objetivos propuestos, y en consecuencia:

- 1.- la construcción y definición de marcadores relacionados al carácter fecha de desove, disponibles para posterior uso en selección asistida.
- 2.- la adecuación del Laboratorio para trabajos con marcadores genético moleculares.
- 3.- la capacitación de personas para trabajos con marcadores genético moleculares.
- 4.- la capacitación de personas en Bioinformática
- 5.- la elaboración de material para divulgación y la transferencia de metodologías
- 6.- la generación de presentaciones y publicaciones científicas

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los Objetivos del proyecto se cumpliero cabalmente, generando los resultados previstos y las capacidades básicas para continuar una línea de trabajo en disponibilidad de marcadores moleculares para el mejoramiento genético en Acuicultura.

Será importante en tal sentido que en el contexto del desarrollo de la Biotecnología en el país se considere esta línea de trabajo.

12. OTROS ASPECTOS DE INTERES

14 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1.- Olsen, Jeffrey B., Bentzen, Paul, and Seeb, James E.
Characterization of seven microsatellite loci derived from pink salmon.
Molecular Ecology 7 : 1083 – 1090. 1998.
- 2.- Wenburg, John K., Bentzen, Paul and Foote, Chris J.
Microsatellite analysis of genetic population structure in an endangered salmonid:
the coastal cutthroat trout (*O. clarki clarki*).
Molecular Ecology 7 : 773 - 749. 1998.
- 3.- Olsen, Jeffrey B., Wenburg, John K., and Bentzen, Paul.
Semiautomated multilocus genotyping of Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.) using microsatellites.
Molec. Marine Biol. and Biotech. 5: 259 - 272. 1996.
- 4.- Morris, Dianne B., Richard Kenny R., and Wrigth Jonathan M.
Microsatellites from rainbow trout (*O. mykiss*) and their use for genetic study of salmonids.
Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53: 120 – 126. 1996.
- 5.- Olsen, Jeffrey B., and Seeb, Lisa W.
Genetic intrepetation of broad – scale microsatellite polymorphism in odd – year pink salmon.
Transactions of the Am. Fish. Soc. 127 : 535 – 550. 1998.
- 6.- Wenburg, John K., Olsen, Jeffrey B., and Bentzen, Paul.
Multiplexed system of microsatellites for genetic analysis in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) and steelhead (*Oncorhynchus mykiss*).
Molec. Marine Biol. and Biotech. 5: 273 – 283. 1996.
- 7.- Condrey, Michael J., and Bentzen, Paul.
Characterization of coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) microsatellites and their conservation in other salmonids.
Molecular Ecology 7: 787 – 789. 1998.
- 8.- Small, M. P., Beacham T. D., Withler, R. E., and Nelson, R. J.
Discriminating coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations within the Fraser River, British Columbia, using microsatellites DNA markers.
Molecular Ecology 7: 141 – 155. 1998.
- 9.- Smith, Christian T., Koop, Ben F., and Nelson, R. John.
Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids.
Molecular Ecology 7: 1613 – 1621. 1998.
- 10.- Scribner, Kim T., Gust Judy R., and Fields Raymond L.
Isolation and characterization of novel salmon microsatellites loci: cross – species amplification and population genetic applications.
Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53: 833 – 841. 1996.
- 11.- Banks, M. A., Blouin M. S., Baldwin B. A., Rashbrook V. K., Fitzgerald H.A., Blankenship S. M., and Hedgecock D.
Isolation and inheritance of novel microsatellites in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).
The Journal of Heredity 90: 281 – 288. 1999.

- 12.- Sakamoto, T., Okamoto N., Ikeda Y., Nakamura Y., and Sato, T.
Dinucleotide – repeat polymorphism in DNA of rainbow trout and its application in fisheries science.
Journal of Fish Biology 44: 1093 – 1096. 1994.
- 13.- Holm, L-E., Brusgaard, K.
A polymorphic dinucleotide microsatellite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): OmDIAS1.
Animal Genetics 28: 308 – 322. 1997.
- 14.- Williamson, Kevin S., Cordes, Jan F., and May, Bernie.
Characterization of microsatellite loci in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and cross-species amplification in other salmonids.
Molecular Ecology Notes 2: 17 – 19. 2002.
- 15.- Sakamoto, T., Danzmann, R. G., Okamoto, N., Ferguson, M. M., Ihssen, P. E.
Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 173: 33 – 43. 1999.
- 16.- Smith, C.T., Nelson, R.J., Wood, C.C. and Koop, B.F.
Glacial biogeography of North American coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).
Molecular Ecology 10:2775-2785. 2001.
- 17.- Choulakian V. & S. Mahdi. 2000. A new statistics for the analysis of association between trait and polymorphic marker loci. *Mathematical Biosciences*,164:139-145
- 18.- Terwilliger J. 1995. A powerful likelihood method for the analysis of linkage disequilibrium between trait loci and one or more polymorphic marker loci.
- 19.- Terwilliger J. & J. Ott. 1992. *Handbook of human genetic linkage*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- 20.- Thompson J., Gibson T., Plewniak F., Jeanmougin F. & D. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882.
- 21.- Araneda C, Neira R, Iturra P, 2005. Identification of a dominant SCAR marker associated with colour traits in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 247:67-73.
- 22.- Brunelli J, Thorgaard G, 2004. A New Y-Chromosome-Specific Marker for Pacific Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 133: 1247–1253 .
- 23.- Darvasi A, Soller M, 1992. Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and quantitative trait locus. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 353-359 (In English).
- 24.- Darvasi A, Soller M, 1994. Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics* 13: 1365-1373.
- 25.- Dekkers C, Hospital F, 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Review Genetics* 3: 22 – 32.
- 26.- Dickey J, Swanson P, 1998. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Molecular Endocrinology* 21: 291-306

- 27.- Dickey J, Swanson P, 2000. Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology* 118: 436-449.
- 28.- Ellegren H, 2004. Microsatellites: Simple sequence with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5:435-437.
- 29.- Faber C, Medrano JF, 2003. Putative *in silico* mapping of DNA sequences to livestock genome maps using SSLP flanking sequences. *Animal genetics* 34:11-18.
- 30.- Fishback A, Danzmann R, Ferguson M, 2000. Microsatellite allelic heterogeneity among hatchery rainbow trout maturing in different seasons. *Journal of Fish Biology* 57: 1367-1380.
- 31.- Gall G, Neira R, 2004. Genetic analysis of female reproduction traits of farmed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 234: 143-154.
- 32.- Gallardo J, García X., Lhorente JP, Neira R, 2004. Inbreeding and inbreeding depression of female reproductive traits in two populations of Coho salmon selected using BLUP predictors of breeding values. *Aquaculture* 234:111-122.
- 33.- Iturra P, Medrano J, Bagley M, Lam N, Vergara N, Marin J, 1998. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent *in situ* hybridization in rainbow trout. *Genetica* 101: 209-213.
- 34.- Iturra P, Bagley M, Vergara N, Imbert P, Medrano JF, 2001. Development and characterization of DNA sequence OmyP9 associated with the sex chromosomes in rainbow trout. *Heredity* 86: 412- 419.
- 35.- Martínez V, Neira R, Gall G, 1999. Estimation of genetic parameters from pedigreed populations: lessons from analysis of alevin weight in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 180: 223-236.
- 36.- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L, 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *BioTechniques* 8: 43.
- 37.- Michelmores R, Param I, Kesseli R, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832.
- 38.- Marshall T, Slate J, Kruuk L, Pamberton J, 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7:639-655.
- 39.- Mount, D.W. 2001. *Bioinformatics, sequence and genome analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 564 p.
- 40.- Nakamura K, Ozaki A, Akutsu T, Iwai K, Sakamoto T, Yoshizaki G, Okamoto N, 2001. Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Genet Genomics* 265:687-693.
- 41.- Neira R, Díaz N, Gall G, Gallardo J, Lhorente J, Alert A, 2005. Genetic improvement in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) II: Selection response for early spawning date. (*Aquaculture*, in press)
- 42.- O'Malley K, Sakamoto T, Danzmann R, Ferguson M, 2003. Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes. *Journal of Heredity* 94: 273-284.

- 43.- Paran I., Michelmore R, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85, 985-993.
- 44.- Quinn T, Peterson J, Gallucci V, Hershberger W, Brannon E, 2002. Artificial selection and environmental change: countervailing factors affecting the timing of spawning by coho and chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 131: 591-598.
- 45.- Shalburg, K., Rise, M., Brown, G., Davidson, W., Koop, B., 2005. A comprehensive survey of the genes involved in maturation and development of the rainbow trout ovary. *Biology of Reproduction* 72: 687-699 (In English)..
- 46.- Siitonen L, Gall G, 1989. Response to selection for early spawn date in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 78: 153-161 (In English).
- 47.- Su G-S, Liljedahl L-E, Gall G, 1999. Estimates of phenotypic and genetic parameters for within-season date and age at spawning of female rainbow trout. *Aquaculture* 171: 209-220 (In English).
- 48.- Allendorf, F.W., and Thorgaard, G.H. 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. *In* *Evolutionary genetics of fishes. Edited by B.J. Turner.* Plenum Press, New York. pp. 1-53.
- 49.- Gilbey, J., Verspoor, E., McLay, A., and Houlihan, D. 2004. A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Anim. Genet.* 35: 98-105.
- 50.- Jackson, T.R., Ferguson, M.M., Danzmann, R.G., Fishback, A.G., Ihssen, P.E., O'Connell, M. and Crease, T.J. 1998. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. *Heredity* 80:143-151.
- 51.- Nichols, K.M., Young, W., Danzmann, R.G., Robison, B., Rexroad, C., Noakes, M., Phillips, R.B., Bentzen, P., Spies, I., Knudsen, K., Allendorf, F.W., Cunningham, B.M., Brunelli, J., Zhang, H., Ristow, S., Drew, R., Brown, K.H., Wheeler, P.A., and Thorgaard, G.H. 2003. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Genet.* 34: 102-115.
- 52.- Perry, G.M. Danzmann, R.G., Ferguson, M.M, and Gibson, J.P. 2001. Quantitative trait loci for upper thermal tolerance in outbred strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity* 86:333-341.
- 53.- Reid, D.P., Szanto A., Glebe, B., Danzmann, R.G., and Ferguson, M.M. 2004. QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). 94:166-172.
- 54.- Sakamoto, T. 1996. Study for the introduction of positional cloning method using DNA markers in fisheries science. Ph.D. thesis, University of Fisheries, Department of Aquatic Biosciences, Tokyo, Japan.
- 55.- Sakamoto, T., Danzmann, R.G., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Kean Khoo, S, Woram, R.A., Okamoto, N., Ferguson, M.M., Holm, L., Guyomard, R., and Hoyheim, B. 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* 155: 1331-1345.

- 56.- Somorjai, I.M.L., Danzmann, R.G., and Ferguson, M.M. 2003. Distribution of temperature tolerance quantitative trait loci in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and inferred homologies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genetics* **165**: 1443-1456.
- 57.- Winkler, F., Bartley, D. and Díaz, N.F. 1999. Genetic differences among year classes in a hatchery population of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792) in Chile. *Aquaculture* **173**:425-433.
- 58.- Woram, R.A., McGowan, C., Stout, J.A., Gharbi, K., Ferguson, M.M., Hoyheim, B., Davidson, E.A., Davidson, W.S., Rexroad, C., and Danzmann, R.G. 2004. A genetic linkage map for Arctic char (*Salvelinus alpinus*): evidence for higher recombination rates and segregation distortion in hybrid versus pure strain mapping parents. *Genome* **47**: 304-315.

Comparative approach shows evidence of association between microsatellite loci and QTLs affecting spawning date in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).

Nelson F. Díaz ^{1*}, Soledad Cortéz ², Gilda Gómez. ¹ Patricia Iturra ², and Cristian Araneda ¹.

¹ Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

² Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

*Corresponding author (e-mail: ndiaz@uchile.cl)

Abstract

In salmonids, spawning date is a quantitative trait that can be modified by selection. Researchers working on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) have been successful in describing various Quantitative Trait Loci (QTLs) that affect the expression of this trait. In this study we have identified six microsatellite loci associated with spawning date, using females from two populations of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) that were subjected to divergent selection for the expression of this character. Four of the loci that showed a strong association with spawning date in coho salmon (*OmyPuPuPyDU*, *OmyFGT34TUF*, *One2ASC* and *One19ASC*) were previously associated with QTLs in rainbow trout. Utilizing comparative information from this closely related species, we hypothesize that these four loci are linked with two presumed QTLs in coho salmon. Two additional loci (*Oki10*, and *OkiCAT229UCH*) also showed a strong association with spawning date in coho salmon; this finding should be confirmed through linkage studies. This work provides evidence of the identification of QTLs in coho salmon, and supports the use of comparative studies of loci linked to QTLs as a valid strategy for detecting loci that affect quantitative characteristics, especially for species whose genomes are poorly characterized and for which linkage maps do not yet exist.

Introduction

In salmonids spawning date is an important reproductive and life-history trait determining the moment of fertilization, date of progeny emergence, and even the probability of survival and the growth rate of the small fry (Quinn et al. 2002). In salmon farming extending the reproductive period allows for better management of fish production according to season, as well as increasing the period during which ovas are available in the market (Gall and Neira 2004).

In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spawning date is a trait with high additive genetic variation ($0.53 \leq h^2 \leq 0.65$, Siitonen and Gall 1989, Su et al. 1999).

Current evidence supports polygenic inheritance of this trait and several microsatellite markers that are linked with Quantitative Trait Loci (hereafter, QTLs) have been identified (Sakamoto et al. 1999, Fishback et al. 2000, O'Malley et al. 2003).

In coho salmon, Gall and Neira (2004) estimated $h^2 = 0.24 \pm 0.07$ for spawn day, in a hatchery stock. Advancement of spawning date has been achieved in cultivated populations of the species that are subjected to selection (Quinn et al. 2002). In Chile, using populations subjected to selection, Neira et al (2006) shows that they responds to selection for early spawning, and estimated medium values of heritability; ($h^2 = 0.40 \pm 0.05$ and $h^2 = 0.40 \pm 0.06$, for even and odd year classes respectively).

Despite its importance as a farmed species in the southern hemisphere, Coho salmon has been poorly characterized from a genetic point of view. In contrast to rainbow trout and Atlantic salmon (*Salmo salar*) the lack of a saturated genetic map for this species has delayed the search for QTLs related to commercial or life-history traits. Nevertheless, in coho salmon it is possible to carry out comparative QTL mapping using the genetic maps of closely related species, as has been done for the identification of QTLs associated with temperature tolerance in Arctic char (*Salvelinus alpinus*, Somorjai et al. 2003), using previously identified QTLs from rainbow trout (Jackson et al. 1998, Perry et al. 2001).

This study takes a comparative approach to identify microsatellite loci associated with potential QTLs affecting spawning date in coho salmon. Fish obtained from the two populations that have undergone divergent selection for spawning date were screened at microsatellite loci; some of them that are previously described as linked to this trait in rainbow trout (Sakamoto et al. 1999, O'Malley et al. 2003). If the microsatellite markers linked to QTLs for spawning date in rainbow trout are conserved in coho salmon, then we expect to find strong allele heterogeneity between populations under divergent selection for this character, thus indicating an association between these microsatellite loci and the QTL for spawning date in coho salmon. Other microsatellites were also used, for which no previous information was available about putative association with the trait.

Materials and Methods

Coho salmon used in this study were reared at the facilities of the Coho Breed Improvement Program (Centro de Mejoramiento Genético) located in Coyhaique, Region XI in southern Chile. The program started with year classes during 1992 and 1993, both closed populations managed under a two year reproductive cycle, mating 30-35 males with 100-120 females each cycle, selecting for harvest weight and early spawning using an animal model (for details of this breeding program see Martínez et al. 1999, Winkler et al., 1999, Gallardo et al. 2004, Gall and Neira, 2004).

In 1995 a divergent selection experiment was initiated using the population of 139 females available to spawn; two sets of breeders were selected: those that spawned during the first third of the spawning period (i.e. the early spawning population) and those that spawned during the last third of the spawning period (i.e. the late spawning population). Those were the basis for the divergent lines (populations), selected again during 1997 and 1999 generations. In 2001 blood samples for DNA extraction were obtained from 20 females of the early spawning population, and 20 females from late spawning population. At this time, the average difference in spawning date between both populations was 80 days.

DNA samples from 40 individuals of the initial population in 1995, before to start selection, were also available; 20 from individuals of the first and 20 from individuals of the last third of the spawning period.

In salmonids the effect of different recombination rates between sexes on the detection of QTLs has been well documented (Sakamoto et al. 2000). As Somorjai et al. (2003) have shown, once a linked group that presumably carries a QTL has been detected, evaluation of the marker-trait association in females allows for more accurate localization of the QTL. All associations between microsatellite loci and spawning date were evaluated in females, in part to exploit the higher rate of recombination in females, but also because the trait is sex limited and there are no data available for the males.

Eleven polymorphic microsatellite loci were available to screen for associations with spawning date. Six microsatellite loci previously identified as associated and three other loci not associated with this trait in rainbow trout; two additional microsatellites described for coho salmon, without information about association with spawning date or location in a coho genetic map were included (Table 1). The forward primer used to amplify each loci was dye labeled and the amplicons resulting from PCR were run on an automated sequencer (Model ABI377, Applied Biosystems™) with the appropriate size standard. The thermal profile was 94°C for 2 min, followed by 30 cycles at 94°C for 30 sec., 57°C to 70°C for 1 min (see Table 1 for the specific annealing temperature of each primer pair), 72°C for 1 min, with a final 5 min extension step at 72°C. For some primer sets, we used a touchdown protocol to improve the resolution of PCR fragments (Table 1). PCR was carried out in a total volume of 15 µL containing 1.5 µL of 10x PCR buffer, 4.0 µM of each dNTP, 0.4 µM primer, 1.8 mM MgCl₂, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen™) and 40 ng of DNA from each individual.

The association of microsatellite alleles with Early or Late spawning date was measured using the L_D statistic, a multiple comparison approach based on

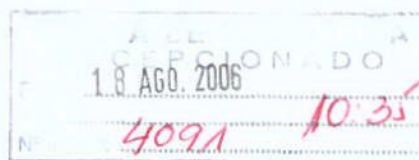
contingence tables between microsatellite alleles and populations (Choulakian and Mahdi 2000). This procedure tests the null hypothesis that two populations are homogeneous with respect to the probability distribution of microsatellite alleles; the alternative hypothesis is that at least one allele is excessively associated with a particular population. For every locus the highest value of L_D across alleles was contrasted with the chi-squared value of 13.8 with one degree of freedom equivalent to an LOD score of 3.0, which corresponds to an α level of approximately 0.0002. The LOD score estimate the probability of linkage between two loci; a score over 3.0 implies that the probability of linkage between both loci is 1000 times higher than those expected by hazard.

Results

Tetrasomic genotypes for the *Ogo2UW* locus (with seven alleles ranging in size from 163 to 197 bp) were revealed in coho salmon. Therefore, given the impossibility of reconstructing, with certainty, the genotypes of the fish analyzed for the *Ogo2UW* locus, this locus was excluded from the subsequent association analyses.

Four of the ten remaining loci (*Ogo1UW*, *Onep6*, *OmyFGT22TUF* and *Ots4BML*) do not show allele heterogeneity among fish belonging to the early and late spawning populations. Figure 1 shows the allele heterogeneity for the six remaining loci, among fish belonging to these divergent populations, suggesting that those are associated with spawning date. All six microsatellite loci putatively associated with spawning date showed differences in allele frequency between early and late spawning females. In particular, for the *OmyFGT34TUF* locus the alleles 139 and 143 occurred in high frequencies in late spawning females (32.5% and 40%, respectively), but were infrequent in early spawning females (5% and 2.5%, respectively). On the same locus, allele 185 also occurred in high frequency (25%) and was exclusively found in early spawning females.

Sra.
Isabel Reveco
Jefa unidad de Estudios y Proyectos
FIA
Presente



Estimada Sra. Reveco

Por la presente envío a Ud las repuestas a las observaciones realizadas al Informe Final del Proyecto FIA BIOT 01-AC-21, contenidas en su carta UP-Nº0367.

1. Capítulo "Resultados"

1.1 Se solicitó las secuencias nucleotídicas completas obtenidas para los SCARs *Oki075*, *OkiCAT229UCH* y *Oki249*

Las siguientes son la secuencias en formato FASTA:

```
>gi|60391976|gb|AY926350.1| Oncorhynchus kisutch, Oki075 SCAR marker
CACGTCCAGAGGAAGATCTCTTAATAACCAGGAGTTAAATCTCTTTCCAATC
TTTTCCCCCATAGGAGAGAGATTTAAGTTGGCCCTTTCTTTCTGATCTTTGCT
AATGTTAAAACCAAGATATGTGATCACATCATTTACAGGGATATTAATAACT
GAGTTTAAAGTCACATCTTTTCAATGCAAATAATTGACATTTCTTAATATTCA
GAGATAAACCTGATACATGTGAGAAGGCATTAATACACTCAACAGCTTTCC
TGACTTCATTAAGATCTTTTTCAAATAATGATGGTGTCTGTCAGCCAATTGTG
AAAATTGTATCTCTTTATCTTGTAACCTGAACACCCCTAAAACCTATTGTTATTG
ATATGAAGTACCAAATATTACCACACTGAATGGGGATAACACCACATATTA
CCACACTGAACGGGGCTAGCACCACACTGAATGGGGATAACACCACATATTA
CCACACTGAACGGGGCTAGCACCACACTGAATGGGGATAACAACACATATT
ACCACACTGAACGGGGCTAGCACCACACTGAATGGGGCTAACACCCCATAT
TACCACACTGAATGGGGCTAGCACCACACTGAATGGGGCTAACAAACACATA
TTCTCCTTCCGTGGCCTCCAATTGCTCTTAAATACAAGTAAANCTAAATGCA
TGCTCTTCTACCGATCGCTACCTGCACCTACCCGCCTGTCCACATCACTACTC
TGGACGTCA
```

```
>gi|60391978|gb|AY926352.1| Oncorhynchus kisutch, OkiCAT229UCH SSR marker
ACTCCATGTTAAGGCGTCTCGATGGGAGACTATGTTCTTAATTATACCGACA
ATATTTAGATGGGTAATTTTGTGTGCTCACTACAATATTATCTCACCAAACCTC
TGTACCTGTACCTTTGATGTAATCTTAACCTATCATAACATGTGGGTTCTGTAG
ACTTCACTTCTCTAAGAAAATGAATCGTCAACTACTAATTGTCTAATCTCA
CAGCGAAATTAGTGCCACACAGTATCTACTATATGACACCACCAGTATGCTT
CTGTTTCTTCTCAATCAATGAATTAATGACCCGGTTCCCTCGTACAGCACAG
CGAGAGACTACATTGCGGCTGTTGGAGCCAACCTCTTTCTAACCTGAGTGAG
GCTAATTAAGCACACTTGTTTCACAAACACGACAAACACTCTTTTATTAGTA
CTGTGACTCACTCTCAAACACCATGTGACTAATGCTTGCAGGGGAGCCCTCT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
ATTTCCAGAGAGGTAGCAGGCTCTCCAAGCCCTCCAGTGGAGCACCTCTCAT
CCCATAACTAGGGAAAGGAAAGGACAACATTATAGATGGAGCTTATTATG
TAAAGGAAATTTTTTGGTTACTCTGGGTGGAAGGGCGAATTCGTTTAAA
```

>gj|60652435|gb|AY929856.1| *Oncorhynchus kisutch*, Oki249 SCAR marker
GCATCTACCGTATAGAGGGTCACTCTACAGGCCAGGTAATCAAACCGATAC
CCCCACTGCTGGCCATTAGACATCAACACTTGATCTGTCAGAGCATTGCTG
GCGGTATTTGGGTTCTATACACATTTAAAAAACGTTTTTTTGGCGCATCATA
TATTGCTGGTTGATACTTTGCCCTTGCTCTATGGGCAACCCGAGGGCCTGCT
TCAGTTGTTACCGTCATCACTTGTTTGGTACCGATCCCAAATTCCATGGTTAT
TCTTAAGATCTTGTGCACTCTTAAACAGGTATTGTTTCAGGCGCTTTATAAGG
GGCATTAAACCAACCCAAACCGTGAGAAACAGTAACAGGTTGACCTGACACA
TGGTCACTTACTCAACCCCAACAACACCCCTGGGCATGCACCCTTCTACCCG
ACATAGGGTTCATAAATCATTACATAGGGTTCATAAATCAGACTTGGGTCATC
AATCATTAACGGCCTGTCAAATGGACCCTTACTCACCCCATAGCCCCCACCT
AACCAGGCTTGCCTATCAGGCTTGGGTCATCAATCATTAACGGCCTGTCAA
TGGACCCTTACTCACCCCATAGCCCCACCTAACCAGGCTTGCCTGACCAGA
AGACATGCACACGTCATCACTACATAGGGTTCACATAGCGTTCACATAGGTT
CACATAGGGGCATCAATCAAAATTTTGACACGTGACATCTACTTTAATCTCT
CCTCCCTCTACATGTACAGTGGTTCCTCAATTAAGTTTGTGAGATTATGCT
GTGGGATTTAGAGGTAATTTGTGGTTTGGTACGGTACCCTACGTCCTGCTT
CATTGCTCCAGACCACCACAAGGGGGTGTAAAGCGCTGATTATGCTTTTGGG
TCTCAAGGCGCTAATGTGTCTCGAACTGACAATTAATGTGCGATATAAACCA
AATAGAAACAACCTTCAAATCGAATGAAGAAGGTGATTGAATTTATAACAA
TAGTGTAAGAATTACTATTCCTCTGTCTGCACGTACACCTGAAAAAGACAC
TTATTTGTTTGTCTACTTGGCCAGAAGAAGCTGTAAGTGGACTGTAGCAT
ATTACTAACTAAAACGGTTGTTAAGCTAAGGTTTTTATTCCAAGATAAACGG
AAACGTTCAATTATATTCCTAGATATTCTTAAAATATATGTGTGGACTGATT
TTAAGAAAGTGATGTCTGCCAAATAATCAAGTTGATGGCGCGGTCATATAG
CCTTGGATCCTACATAAAGCTGAGTGACTCACTCATTTCATGGCATTGGATAA
AAAGATTTAACCTTTTCAGCGCAGCACGCAGATTNCCAGATTGCCTTTGTCAA
TCGCTCATCATCTTCAACCATCAGTGAGTCGATGGCTTGAATCGTCTCGCTG
GAAATTGAATACCCACGGTAGATGC

1.2 En el Capítulo “Resultados de Asociación” se solicitó efectuar un breve análisis de los resultados expuestos en la Tabla 5.3

Un locus marcador muestra asociación con un rasgo, en este caso fecha de desove, debido a su proximidad con los genes que determinan este carácter, esta proximidad hace que las combinaciones de algunos alelos con la presencia del carácter no sean independientes y por lo tanto uno de los alelos se presentará con mayor frecuencia que la esperada por simple azar en uno de los fenotipos contrastantes para el carácter bajo estudio, en este caso desove temprano o tardío. Siguiendo este razonamiento, en la Tabla 5.3 se observa claramente el año 2001 que el Alelo 2 del SCAR *Oki075* es mas frecuente en la población de desove temprano, mientras que el Alelo 1 lo es en la población de desove tardío. Algo similar se observa con los Alelos 2 y 3 del mismo SCAR, para las poblaciones de desove temprano y tardío del año 1995, respectivamente.

1.3 También se solicitó calificar el tipo de probabilidad a la que hace referencia el texto

El análisis de asociación utilizado pone a prueba la hipótesis nula (H_0) de que la distribución del marcador es homogénea entre los grupos de desove temprano y tardío, es decir, que no existe asociación entre el marcador SCAR y la fecha de desove. La hipótesis alternativa (H_1) es que uno de los alelos del marcador se encuentra altamente representado en uno de los grupos y pobremente representado en el otro, por lo que existiría asociación entre el marcador SCAR y la fecha de desove. El resultado del análisis estadístico entrega un valor de probabilidad bajo el supuesto de que la hipótesis nula sea verdadera, mientras más bajo es esta probabilidad con mayor seguridad se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa de que existe asociación entre el marcador SCAR y la fecha de desove. El valor límite para rechazar la hipótesis nula es el valor de significación estadística seleccionado, normalmente $\alpha = 0,05$. Sin embargo para evitar el error estadístico tipo I (rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera) hemos seleccionado un nivel α mucho más estricto ($\alpha = 0,001$). Cualquier valor de probabilidad inferior a α indica un rechazo de la hipótesis nula y la aceptación de la alternativa, en este caso la aceptación de la asociación entre el marcador SCAR y la fecha de desove.

1.4 Se solicitó entregar los resultados obtenidos con los marcadores ^{SCAR} ~~SACR~~ y Microsatélites en las poblaciones 2002, 2003, 2004 y 2005.

El proyecto se inició analizando muestras de una población de salmón coho tomada el año 2001, perteneciente por lo tanto a una la línea de año impar. Inicialmente se pensó utilizar una población posterior generada por sucesivos cruzamientos divergentes para verificar una asociación a fecha de desove que esperábamos se produjera en ese lapso de tiempo, para lo cual se realizaron muestreos de cruzamientos de los años 2003 y 2005. Al encontrarse que la asociación con fecha de desove ya era evidente en la población 2001 se requirió una población control anterior sin divergencia en fecha de desove, para lo cual se recurrió a muestras guardadas de una población de 1995. No se justificó por lo tanto, analizar las muestras de 2003 y 2005 por el consiguiente costo económico y de tiempo y que sólo corroboraría lo encontrado con la población 2001.

Otro planteamiento al inicio del proyecto fue averiguar si las asociaciones que se encontraran en la línea año impar se encontrarían también en una línea año par que es genética y evolutivamente independiente de la año impar ya que nunca es posible cruzar ambas líneas porque se reproducen en años separados y los reproductores mueren luego del desove. Por esta razón se realizaron cruzamientos y se aseguraron muestras en los años 2002 y 2004. Por razones de tiempo y costo se analizaron las muestras del año 2004 y dado que allí no se encontró asociación de los marcadores en estudio con fecha de desove, menos probable era encontrarla en la población 2002, por lo que esa no se analizó.

2. Capítulo “Calendario de Ejecución programado/real”

Se solicitó entregar el cronograma de actividades reales realizadas informando el grado de cumplimiento conforme al cronograma de trabajo programado al inicio.

	ACTIVIDADES PROGRAMADAS	Inicio	Término
1.1.1	Selección muestras sangre CMG01	02Enc2002	18Enc2002
1.1.2	Extracción ADN. Confección pooles ADN.	02Enc2002	30Abr2002
1.1.3	Experimentos RAPD	02May2002	30Sep2002
1.1.4	Cruzamientos líneas divergentes año par	01Abr2002	28Jun2002
1.1.5	Confección de marcadores SCAR	01Jul2002	31Dic2002
1.1.6	Clonación, secuenciación, caracterización de SCAR	01Sep2002	30Abr2003
1.1.7	Información microsátélites. Síntesis Oligos	01Mar2002	30Abr2002
1.1.8	PCR con 40 partidores microsátélites	01May2002	31Ago2002
1.1.9	Partidores fluorescentes	01Sep2002	31Dic2002
1.1.10	PCR con partidores fluorescentes. Microsátélites asociados al rasgo	02Ene2003	30Abr2003
1.1.11	Cruzamientos recíprocos Inducción machos TA. Muestras sangre	02Abr2003	30Jun2003
1.1.12	Cruzamientos para F1	02Abr2003	30Jun2003
1.1.13	Cruzamientos líneas divergentes año par	01Abr2004	30Jun2004
1.1.14	Evaluar Marcadores en clase año par	01Jul2004	30Oct2004
1.1.15	Evaluación de cruzamientos	01May2005	30Jun2005
2.1.1	Seminario Interno Bioinformática	05Ene 2004	09Ene2004
2.1.2	Curso Capacitación y Asesoría en Bioinformática	02Mar2003	30Jun2003
2.1.3	Análisis Bioinformáticos	01May2003	31Dic2003
3.1.1	Difusión y Talleres	01Mar2005	30Ago2005
	RESULTADOS COMPROMETIDOS		
	Identificar y disponer de marcadores SACR		2003
	Identificar y disponer de marcadores Microsátélites		2004
	Desarrollar Infraestructura Bioinformática-Software		2003
	Desarrollar Infraestructura Bioinformática-Análisis		2005
	Transferencia Publicación técnica		2004,2005
	Transferencia taller		2004,2005

En términos generales la programación de actividades se cumplió en los plazos programados, excepto casos puntuales como la actividad 1.1.9, que a su vez implicó retrasar la 1.1.10 y la 2.1.3, sin que esto implicará modificar la fecha final del proyecto ya que los tiempos fueron luego recuperados. También las actividades 2.1.2 y 3.1.1 se hicieron en fechas posteriores a las programadas inicialmente, sin modificar los plazos finales. Se lograron todos los resultados comprometidos.

3. Capítulo "Conclusión"

3.1. Se solicitó explicar las implicancias para futuros trabajos de mejoramiento genético que en la población de salmones 2004 no se encontrara ninguna asociación significativa entre la fecha de desove y los marcadores utilizados.

En la siguiente Tabla se anota los valores de asociación obtenidos con marcadores en la población 2004, en que los valores de (X^2) ninguno resulta significativo, descartándose por lo tanto asociación con fecha de desove.

Análisis de asociación entre alelos microsatélites y temporada de desove en salmón coho (19 enero 2006) población CMG-2004.

Locus	N° Alelos	Asociación	Alelo	L _D	Probabilidad (X^2)
One2	12	No	205	2,96	0,085137
One6	10	No	269	8,66	0,003256
One19	9	No	236	10,63	0,001115
Oki10	11	No	138	4,22	0,039898
Omy34	5	No	143	2,81	0,093825
Oki229	14	No	208	6,49	0,010870
OmyPuPuPyDU	5	No	405	1,31	0,000355

Se considera asociación si Probabilidad es menor a 0,001

Se considera asociación fuerte si Probabilidad es menor que 0,0002

Con excepción del locus OmyPuPuPyDU, que presentó un valor próximo al límite de la significancia, por lo que no da certeza de asociación, el hecho que no se encontrara asociación significativa entre la fecha de desove y los marcadores utilizados se explica por las diferencias entre los peces de las clases año par e impar, que como se explicó, son estocs que no se cruzan entre sí porque maduran en años distintos y por ello han acumulado diferencias genéticas.

Esto implica que los marcadores relacionados a un determinado carácter deben ser validados en las diferentes cepas o estocs de peces previo a su incorporación en un programa de mejoramiento genético.

4. Documentos Anexos

- 4.1 Se solicitó adjuntar todo el material distribuido durante el curso de Bioinformática de Enero de 2004 y en el Taller "Uso de marcadores genético-moleculares en el mejoramiento genético de peces" realizado en Diciembre de 2005, sin incluir la Publicación técnica que ya fue rendida en el informe final.

En el Curso de Bioinformática se trabajo en:

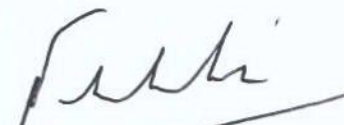
- Introducción a recursos básicos del Internet, terminología, bases de datos y formatos de secuencias
- Búsquedas de literatura
- Búsqueda y alineación de secuencias I
- Manipulación de secuencias
- ESTs
- Mapeo de genes y bases de datos de mapeo
- Identificación de genes candidatos
- Comparaciones genómicas

Los que fueron realizados directamente en la web en el sitio NCBI Entrez, PubMed, SRS, por lo que no se entregó material impreso o en archivos digitales.

- 4.2 Se solicitó entregar en formato digital todos los documentos distribuidos entre los alumnos del curso de Bioinformática, del Taller, y de la Publicación técnica. También archivos digitales de presentaciones en Power point presentados en Congresos.

Se adjunta CD-ROM que contiene las presentaciones en power point realizadas y el archivo electrónico de la Publicación técnica.

Le saluda atentamente



Nelson F. Díaz
Director Proyecto FIA BIOT 01-AC-21

Santiago, 18 de Agosto de 2006

The *One2ASC* locus showed significantly higher frequencies of alleles 214 and 242 (30% and 37.5%, respectively) in late spawning females, as compared to early spawning females (0% and 5%, respectively).

The *One19ASC* locus showed a high frequency (50%) of the 232 allele in late spawning females, compared with only a 10% frequency in early spawning females. Furthermore, in this locus the group of early spawners presented an exclusive allele (222) in high proportion (35%).

On the *Ok10* locus, two alleles exclusive to the late spawning group (223 and 231) presented high frequencies (20% and 27.5%), while allele 129 was exclusively observed in the early spawning group, and also occurred at a high frequency (20%).

In the *PuPuPyDU* locus the group of early spawners presented an exclusive allele (399) while the most frequent allele in this group was the allele 385 (40%); the allele 410 was exclusive to the late spawning group, in which the most frequent allele was the allele 408 (25%). Finally, in the *OkCAT229UCH* locus, the most frequent alleles were the allele

274 (15%) in the early spawning group, and the allele 232 (16,3%) in the late spawning group; 6 alleles (202, 208, 262, 272, 276, 286) were exclusives in the early group, and 5 in the late group (220, 238, 260, 290,306).

When the association of this six microsatellite alleles with Early or Late spawning date was measured using the L_D statistic, significant association of some alleles with spawning date was demonstrated (Table 2).

The association analysis with the control group, samples from 1995 population, reveals that alleles of only two microsatellites shows significant association, *OmyFGT34TUF* (allele153 with late spawners, $L_D=12.12$), and *One19ASC* (allele 232 with late spawners, $L_D=14.05$; and allele 234 with early spawners $L_D=13.09$)

Discussion

The finding of tetrasomic genotypes for the *Ogo2UW* locus is not unexpected given that all salmonids share a tetraploid ancestry (Allendorf and Thorgaard 1984). Furthermore, in rainbow trout this locus also shows a tetrasomic inheritance pattern (O'Malley et al. 2003), their duplicated presence in both coho salmon and rainbow trout supports the conservation of chromosome segments between these species.

Our results shows strong evidence of associations between six microsatellite loci and the trait of interest (i.e. spawning date) in coho salmon (Table 2). It should be noted that four of these loci (*OmyFGT34TUF*, *One2ASC*, *One19ASC*, *OmyPuPuPyDU*) were previously associated with QTL for the same characteristic in rainbow trout (Sakamoto et al. 1999, O'Malley et al. 2003). A microsatellite, *Ots4BML*, closely linked to *One2ASC*, *One19ASC* and related to spawn date in this species (Sakamoto et al. 1999) was not associated to spawn date in coho salmon according our result; O'Malley et al. (2003) mentioned this microsatellite as associated to a QTL affecting body size

Our findings provide strong evidence of the presence of at less two QTLs affecting spawning date in coho salmon. One of these QTLs is likely located near the *OmyFGT34TUF* locus. The second QTL is likely next to the *One2ASC* and *One19ASC*, which are closely linked in rainbow trout in the same linkage group were the microsatellite *OmyPuPuPyDU* is located (Sakamoto et al. 1999).

The proposed position of these QTLs is based on assumed synteny between the chromosomes of coho salmon and rainbow trout.

The association values calculated with ten microsatellites (*Ogo2UW* excluded) using 1995 DNA samples reveals that the *OmyFGT34TUF* locus associates to late spawn before selection for this trait, but the allele involved (153) is different than in 2001 (185) and the association value is lower. For the *One19ASC* locus also there is association to spawning date in 1995 population, but the association values are lower, and there is alleles associated with late spawners (allele 232) and with early spawners (allele 234), both different to allele 222 associated to early spawners in 2001.

The Oki10 and OkiCAT229UCH loci, which has not even been located on the genetic maps of rainbow trout or Atlantic salmon also showed a strong association with spawning date in coho salmon; nevertheless, this association requires confirmation from further studies. Based on the evidence presented here, we could predict that both loci are also linked with a QTL for spawning date in other salmonids, especially if this QTL was present in ancestral genome from which the different species of salmon originated.

The conservation of chromosome segments between salmon species is becoming well-documented as a result of the construction of new genetic maps for rainbow trout (Nichols et al. 2003), Atlantic salmon (Gilbey et al. 2004) and Arctic char (Woram et al. 2004). In addition, comparative QTL mapping is actively being carried out for salmon species belonging to different genera. This approximation has recently been used to identify QTL for upper temperature tolerance among rainbow trout and Arctic char (Somorjai et al. 2003) as well as for body weight and Fulton's condition factor between the genera *Oncorhynchus*, *Salvelinus* and *Salmo* (Reid et al. 2004). Further evidence of the antiquity and conservation of the different priming sites for these microsatellite markers in the salmonid genome is the feasibility of using these primers to amplify microsatellite loci accross different species of salmon.

All of the evidence obtained from comparative QTL mapping indicates that the chromosome regions affecting the quantitative variation of several fitness-related traits in salmon (e.g. spawning time, body weight, growth rate, temperature tolerance) must have been present before the separation of the lineages that gave origin to the modern species of salmonids (Sumorjai et al. 2003, O'Malley et al. 2002, Reid et al.2005).

Presently there is no genetic map available for coho salmon, nevertheless, our use of a comparative approach for identify microsatellite loci associated with QTLs can be a powerfull means of locating QTLs in species that not have their genomes mapped. Revealing the variability underlying the quantitative variation in this species, at least in genome regions conserved from the beginning of salmon speciation.

Acknowledgements

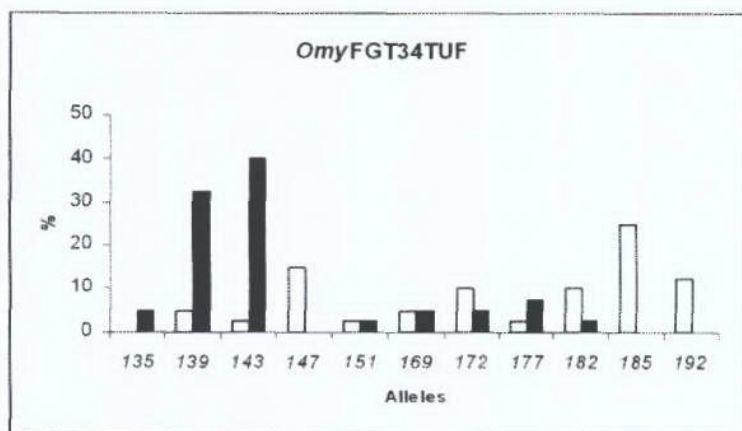
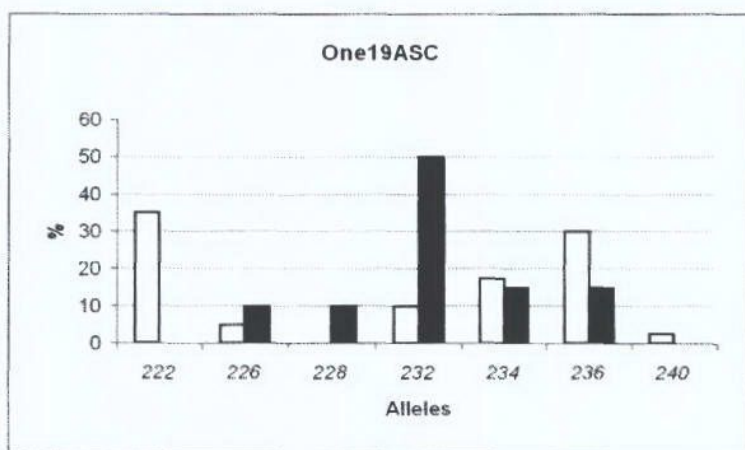
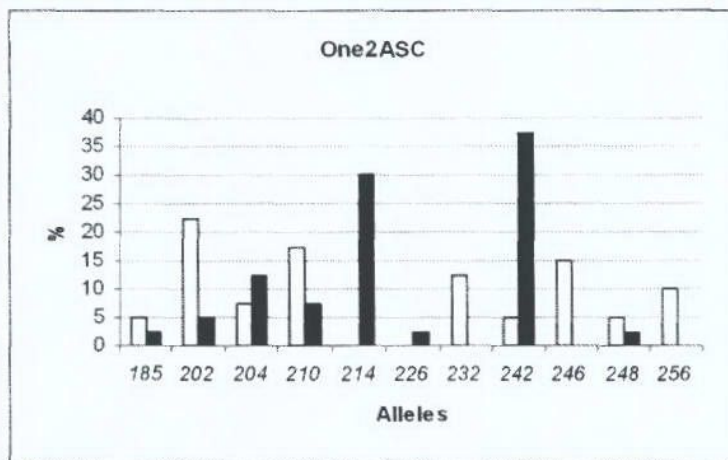
This work was supported by the FIA BIOT-01-AC-21 and FONDAP OBM Peces grants. We wish to thank the staff at the Coho Breed Improvement Program, especially Alejandro Alert, Rodrigo Manterola, Jean Paul Lhorente, Claudio Urrejola and Carlos Soto for data collection and management of the fish populations. We are especially grateful to Roberto Neira for assistance in obtaining historical records of spawning date for the Early and Late coho populations.

References

- Allendorf, F.W., and Thorgaard, G.H. 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. *In* Evolutionary genetics of fishes. *Edited by* B.J. Turner. Plenum Press, New York. pp. 1-53.
- Banks, M.A., Blouin, M.S., Baldwin, B.A., Rashbrook, V.K., Fitzgerald, H.A., Blankenship, S.M., and Hedgecock, D. 1999. Isolation and inheritance of novel microsatellites in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Hered.* **90**: 281-288.
- Choulakian, V., and o Madhi S. 2000. A new statistics for the analysis of association between trait and polymorphic marker loci. *Math. Biosci.* **164**: 139-145.
- Fishback, A.G., Danzmann, R.G. and Ferguson M.M. 2000. Microsatellite allelic heterogeneity among hatchery rainbow trout maturing in different seasons. *J. Fish Biol.* **57**: 1367-1380.
- Gall, G.A.E., and Neira, R. 2004. Genetic analysis of female reproduction traits of farmed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* **234**: 143-154.
- Gallardo, J.A., García, X., Lhorente, J.P., and Neira, R. 2004. Inbreeding and inbreeding depresión of female reproductive traits in two populations of Coho salmon selected using BLUP predictors of breeding values. *Aquaculture* **234**: 111-122.
- Gilbey, J., Verspoor, E., McLay, A., and Houlihan, D. 2004. A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Anim. Genet.* **35**: 98-105.
- Jackson, T.R., Ferguson, M.M., Danzmann, R.G., Fishback, A.G., Ihssen, P.E., O'Connell, M. and Crease, T.J. 1998. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. *Heredity* **80**:143-151.
- Martínez, V., Neira, R., and Gall, G.A.E. 1999. Estimation of genetic parameters from pedigreed populations: lessons from analysis of alevin weight in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* **180**: 223-236.

- Morris, D.B., Richard, K.R. and Wright, J. 1996. Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* **53**:120-126.
- Neira, R., Díaz, N.F., Gall, G.A.E., Gallardo, J., Lhotente, J.P. and Alert, A. 2006. Genetic Improvement in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). II. Selection response for early spawning date. *Aquaculture*. In press.
- Nichols, K.M., Young, W., Danzmann, R.G., Robison, B., Rexroad, C., Noakes, M., Phillips, R.B., Bentzen, P., Spies, I., Knudsen, K., Allendorf, F.W, Cunningham, B.M., Brunelli, J., Zhang, H., Ristow, S., Drew, R., Brown, K.H., Wheeler, P.A., and Thorgaard, G.H. 2003. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Genet.* **34**: 102–115.
- Olsen, J.B., Bentzen, P., and Seeb, J.E. 1998. Characterization of seven microsatellite loci derived from pink salmon. *Mol. Ecol.* **7**: 1083 -1090.
- O'Malley, K.G., Sakamoto, T., Danzmann, R.G. and Ferguson, M.M. 2003. Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes. *J. Hered.* **94**: 273-284.
- Perry, G.M. Danzmann, R.G., Ferguson, M.M, and Gibson, J.P. 2001. Quantitative trait loci for upper thermal tolerance in outbreed strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity* **86**:333-341.
- Quinn, T.P., Peterson, J.A., Gallucci, V.F., Hershberger, W.K., and Brannon, E.L. 2002. Artificial selection and environmental change: countervailing factors affecting the timing of spawning by coho and chinook salmon. *T. Am. Fish. Soc.* **131**: 591-598.
- Reid, D.P., Szanto A., Glebe, B., Danzmann, R.G., and Ferguson, M.M. 2005. QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Heredity* **94**:166-172.
- Sakamoto, T. 1996. Study for the introduction of positional cloning method using DNA markers in fisheries science. Ph.D. thesis, University of Fisheries, Department of Aquatic Biosciences, Tokyo, Japan.

- Sakamoto, T., Danzmann, R.G., Okamoto, N., Ferguson, M.M. and Ihssen, P.E. 1999. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **173**: 33-43.
- Sakamoto, T., Danzmann, R.G., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Kean Khoo, S., Woram, R.A., Okamoto, N., Ferguson, M.M., Holm, L., Guyomard, R., and Hoyheim, B. 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* **155**: 1331-1345.
- Scribner, K.T., Gust, J.R., and Fields, R.L. 1996. Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**: 833-841.
- Siitonen, L. and Gall, G.A.E. 1989. Response to selection for early spawn date in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* **78**: 153-161.
- Smith, C.T., Koop, B.F., and Nelson, R.J. 1998. Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids. *Mol. Ecol.* **7**: 1613-1621.
- Somorjai, I.M.L., Danzmann, R.G., and Ferguson, M.M. 2003. Distribution of temperature tolerance quantitative trait loci in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and inferred homologies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genetics* **165**: 1443-1456.
- Su, G.-S., Liljedahl, L.-E., and Gall, G.A.E. 1999. Estimates of phenotypic and genetic parameters for within-season date and age at spawning of female rainbow trout. *Aquaculture* **171**: 209-220.
- Winkler, F., Bartley, D. and Díaz, N.F. 1999. Genetic differences among year classes in a hatchery population of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792) in Chile. *Aquaculture* **173**: 425-433.
- Woram, R.A., McGowan, C., Stout, J.A., Gharbi, K., Ferguson, M.M., Hoyheim, B., Davidson, E.A., Davidson, W.S., Rexroad, C., and Danzmann, R.G. 2004. A genetic linkage map for Arctic char (*Salvelinus alpinus*): evidence for higher recombination rates and segregation distortion in hybrid versus pure strain mapping parents. *Genome* **47**: 304-315.



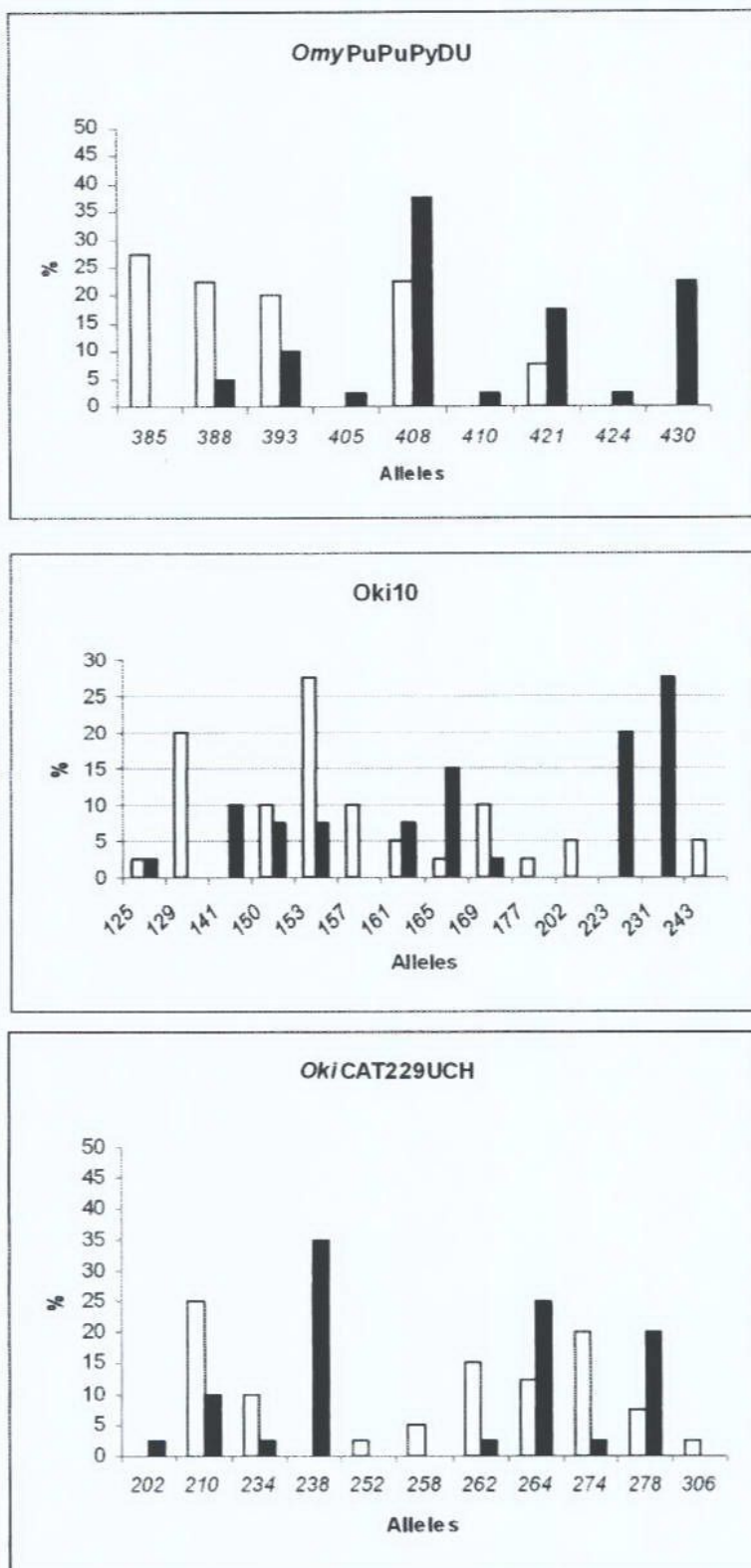


Figure 1.

Distribution of alleles in all six microsatellites loci that shown association with spawning time in coho salmon, white bars correspond to allelic frequencies from early spawning females and black bars indicate allelic frequency from late spawning females.

Table 1. Primer sequences, annealing temperatures and evidence of linkage with QLT for 11 microsatellite loci used for QTL screening in coho salmon females with early or late spawning date.

Locus	Primer Sequences (5'-3')	Annealing Temperature	References	QTL Linkage in Rainbow trout **
Ogo1UW	F: GATCTGGGCCTAAGGGAAAC R: ACTAGCGGTTGGAGAACCC	59 °C	Olsen <i>et al.</i> , 1998	Yes
Ogo2UW	F: ACATCGCACACCATTAAGCAT R: TCGTTCTCTGTTTACGTCCACT	58 °C	Olsen <i>et al.</i> , 1998	No
One2ASC	F: GGTGCCAAGGTTTCAGTTTATGTT R: CAGGAATTTACAGGACCCAGGTT	62 °C	Scribner <i>et al.</i> , 1996	Yes
Oneµ6	F: CAGAGTGGCCTAGATGCTTTAAT R: CCACACACCCAAATCCTACCCCTTA	60 °C	Scribner <i>et al.</i> , 1996	No
One19ASC	F: CTGGAAGACACAGAGAGAGCCTT R: TCCAAACAGTCTAACAGTCTAACCA	57 °C	Scribner <i>et al.</i> , 1996	Yes
OmyFGT22TUF	F: AGTGAACCTCCAGTGTTCGG R: CTATGACGCGGCAGGAAC	70 - 60 °C *	Sakamoto, 1996	No
OmyFGT34TUF	F: ACAGTAAGATGTGGGGCTG R: TAAATTGACTGAGCAGCTGCC	64 - 58 °C *	Sakamoto, 1996	Yes
OmyPuPuPyDU	F: ATGCAGCGGATGTAGGGGA R: TTAAGTGAAAAGACGTAACTTACC	52 °C	Morris <i>et al.</i> , 1996	Yes
Ots4BML	F: GACCCAGAGCACAGACAA R: GGAGGACACATTTTCAGCAG	58 °C	Banks <i>et al.</i> , 1999	Yes
Oki10	F: GGAGTGCTGGACAGATTGG R: CAGCTTTTACAAATCCTCCTG	60 - 54 °C *	Smith <i>et al.</i> , 1998	No
OkiUCH229	F: TGT TGG AGC CAA CCT CTT TC R: CAC ACC TTG AAG CGAGTG C	58 °C	Araneda <i>et al.</i> , 2005 ***	No

* Include a "touchdown" profile of 8 cycles of -1,0 per cycle prior to the final annealing temperature.

** According Sakamoto *et al.* (1999) or O'Malley *et al.* (2003).

*** Submitted to Acta Zool.Sinica

Table 2. Association analysis between 10 microsatellite loci and spawning time in females of coho salmon selected for early and late spawning date.

Locus	Number of Alleles	Association, Allele, Trait	L_D	Probability	LOD value (+)	score
Ogo1UW	2	No	0.208	0.6480		0.05
One2ASC	11	Yes, 214, Late spawn	14.117	0.000170 **		3.07
One μ 6	11	No	8.889	0.0029		1.93
One19ASC	7	Yes, 222, Early spanw	16.970	0.000038 **		3.69
OmyFGT22TUF	11	No	7.679	0.0056		1.67
OmyFGT34TUF	12	Yes, 143, Late spawn	16.807	0.000041 **		3.65
OmyPuPuPyDU	9	No	12.75	0.00036		2.77
Ots4BML	4	No	4.073	0.04357		0.89
Ok110	14	Yes, 211, Late spawn	16.229	0.000056 **		3.53
Ok1CAT229UCH	11	Yes, 238, Late spawn	12.75	0.000038 **		2.77

** Indicate a strong association with QTL ($P < 0.0002$ or LOD score > 3.0)

(+) Estimated as L_D value/4.6

Identification, development, and characterization of three molecular markers associated to spawning date in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).

Cristian Araneda¹, Nelson F. Díaz¹, Roberto Neira¹, Soledad Cortez², Claudio Pérez¹, and Patricia Iturra³.

¹ Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Casilla 1004, Santiago, Chile.

² Instituto de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Casilla 567, Valdivia, Chile.

³ Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Casilla 70061-7, Santiago, Chile.

Corresponding author: Cristian Araneda (craraned@uchile.cl) Phone: +56-2-978 5854

ABSTRACT

In salmonids, spawning date is an important productive and life-history trait determining the time of fertilization, date of progeny emergence, and even the probability of survival and the growth rate of the small fry. Recent evidences support a polygenic bases with several Quantitative Trait Loci (QTLs) affecting the phenotypic expression of this characteristic in salmon species. Utilizing females from two populations of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) produced by divergent selection for early and late spawning date we have identified three RAPD markers amplified with primers UBC-075, UBC-229 and UBC-249 associated with spawning date. Polymorphic fragments were characterized and converted in two co-dominant and one dominant SCAR PCR-base markers *Oki075* (AY926350), *OkiCAT229UCH* (AY926352) and *Oki249* (AY929856). We identify a 52 pb repetitive motif minisatellite like on marker *Oki075* and a microsatellite dinucleotide TG/AC motif on marker *OkiCAT229UCH*. This three SCAR shows significant association with spawning date in Coho salmon. BLAST analysis shows that *Oki075* have homology with follicle stimulating hormone beta subunit gene (*FSHbeta*) of chinook salmon (Score = 182, E value = 9e-43).

Keywords: Coho salmon, spawning date, RAPD, SCAR, Microsatellite, Minisatellite.

INTRODUCTION

In salmonids spawning date (ovulation) is an important productive and life-history trait determining the moment of fertilization, date of progeny emergence, and even the probability of survival and the growth rate of the small fry (Quinn et al. 2002). In salmon farming extending the reproductive period allows for better management of fish production according to season, as well as increase the period during which ovas are available in the market (Gall and Neira 2004).

In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spawning date is a trait with high additive genetic variation ($0.53 \leq h^2 \leq 0.65$, Siitonen and Gall 1989, Su et al. 1999) for which on the base a genetic map it have been identified sixteen microsatellite loci on six linkage groups, linked with Quantitative Trait Loci (QTLs) affecting spawning date (Sakamoto et al. 1999, Fishback et al. 2000, O'Malley et al. 2002). Current evidence supports polygenic inheritance of this trait, together with the action of chromosome regions, which greatly affect the phenotypic variability of this character.

The nonexistence of the genetic maps for studying the genetic determinants of the phenotypic expression had driven to searching association between polymorphism in anonymous dominant markers (RAPD or AFLP) with monogenic or polygenic traits in several animal species, including salmons. This approach is an alternative to use a classical QTL mapping, and basically it used a Bulk Segregant Analysis (BSA, Michelmore et al. 1991) or Selective DNA pooling (Darvasi and Soller 1994) using the more extreme individuals on the distribution of quantitative trait or contrasting phenotypes of monogenic trait, delimiting the markers screening on those more informative individuals (Darvasi and Soller 1992). In salmons, these strategies have permitted to develop molecular marker associated with albino dominant phenotype (Nakamura et al. 1991) or *SEX* locus in

rainbow trout (Iturra et al. 1998, 2001) and other pacific salmon (Brunelli et al. 2004), or for flesh colour in Coho salmon (Araneda et al. 2005).

In this paper we describe the identification and development of three new PCR based markers associated with spawning date in Coho salmon, using selective DNA pooling approach and RAPD screening with 400 arbitrary 10-mer primers. Two of these new RAPD markers carry repetitive motif of mini- and microsatellite that had permitted the develop of single locus co-dominant SCAR markers with potential application in mapping, selective breeding, marker assisted selection or stock identification.

MATERIAL AND METHODS

Experimental population. Fish used in this study were reared at the facilities of the Coho Breed Improvement Program (Centro de Mejoramiento Genético) placed in Coyhaique, Region XI in southern Chile. In this center, a breeding program for coho salmon under two years life cycle started with two year classes during 1992 and 1993, selecting for harvest weight and early spawning time using an hierarchical mating system consisting of 30-35 males and 100 females (for details of this breeding program see Martínez et al. 1999, Gallardo et al. 2004). As part of this program, in 1995 it was initiated a divergent selection experiment using two sets of fish as breeders: those that spawned during the first third of the spawning season (hereafter, Early spawning population) and those that spawned during the last third of the spawning season (hereafter, Late spawning population). Both populations were selected for three generations, reaching in 2001 a differences of 80 days in spawning date between both stocks; spawning date was measured as the number of days from December 31 to spawning (Gall and Neira 2004).

DNA pool construction. The year 2001, blood samples for DNA extraction were obtained from the first 20 early spawning females from the early population, and from the last 20 late spawning females from the late population. Forty DNA samples of females of the Base population before divergence (1995 year class) were obtained at the beginning of experiment. DNA extraction was performed from the blood samples using phenol/chloroform protocol from Medrano et al. (1990) and quantified with a spectrophotometer (Hewlett Packard, Model 8452A). In the selective DNA pooling only individuals from both 2001 year class populations were used. The early spawning DNA pool (E) was prepared with 5 ng/ μ L of genomic DNA from each of eight females from the Early population, while the late spawning DNA pool (L) was prepared in similar way using eight females the Late population.

RAPD screening. RAPD analysis was performed with 400 10-mer primers of arbitrary sequence obtained from the NAPS Unit of the University of British Columbia (primer sets 1 to 300) and Operon Technologies Inc. (primer sets: A, B, G, K, and M). PCR was performed in 15 μ L volumes which contained 1.5 μ L of 10x PCR buffer, 100 μ M of each dNTP, 0.4 μ M primer, 1.8 mM $MgCl_2$, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 20 ng of DNA from each spawning pool. The thermal profile was 94 °C for 2 min, followed by three cycles at 94 °C (1 min), 35 °C (1 min), 72 °C (2 min), then 32 cycles at 94 °C (10 s), 35 °C (30 s) and 72 °C (1 min) with a final 5 min extension step at 72 °C. PCR reactions were performed using a MJ Research PTC-100 96-V thermal cycler. PCR products of both DNA pools were size separated in adjacent lanes by electrophoresis in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. To determine the degree of association between polymorphic RAPD markers and spawning date, primers that amplified fragments in only one DNA pool were examined in all 40

individuals of both pools from of 2001 generation. The significance of associations were evaluated with Pearson's chi-square test (Choulakian and Mahdi, 2000).

Cloning and sequencing of RAPD markers. DNA from RAPD markers associated with spawning date was recovered from agarose gel with a QIAquick gel extraction kit (Qiagen). The recovered DNA fragments were ligated in the plasmid vector pCR2.1TOPO using the TOPO-TA cloning kit (Invitrogen) and were used to transform competent *E. coli* One Shot TOP-10 cells (Invitrogen). For every marker, four clones were fully sequenced in an automated DNA ABI Prism 310 Sequencer System (Applied Biosystem).

SCAR primer design and general PCR conditions. For every cloned RAPD fragment, a pair of specific oligonucleotide primers was designed, converting the RAPD marker into a single locus PCR based marker of a sequence-characterized amplified region (SCAR, Param and Micheltore 1993). These specific pairs primers were designed to contain the original 10 bases of the RAPD primer and the next 12 internal bases, or using online Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.) directly from obtained sequences (Table 1). Initially SCAR PCR conditions were 2 μ L 10xPCR Buffer, 100 μ L dNTPs, 0.25 μ M of each specific primer, 1.8 mM MgCl₂ and 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) in a final volume of 20 μ L. The thermal profile was 94 °C for 2 min, followed by 29 cycles at 94 °C (1 min 30 s), 60 °C (1 min 30 s), 72 °C (2 min) with a 5 min extension step at 72 °C. These PCR condition and thermal profile was standardized according to the specific T_m of the specific primer pair (Table 1). The PCR products were resolved by electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light, or using a forward primer dye labeled for marker

containing a microsatellite motif and the amplicons analyzed on an automated sequencer with Genscan software (Applied Biosystems).

Association Analysis. The association of alleles for both codominant markers with Early or Late spawning populations was evaluated using the L_D statistic, a multiple comparison approach based on contingency tables between a marker with multiples alleles and populations (Choulakian and Mahdi 2000). This procedure tests the null hypothesis that two populations are homogeneous with respect to the probability distribution of alleles in one locus v/s the alternative hypothesis of at least one allele is excessively associated with a particular population. After every comparison the highest value of L_D across alleles is contrasted with the chi-squared value of 13.8 with one degree of freedom equivalent to an LOD score of 3.0, which corresponds to a type I error rate $\alpha = 0.0002$ (Choulakian and Mahdi 2000). For dominant marker the association analysis was performed using Pearson's χ^2 statistic with one degree of freedom to test the null hypothesis that spawning time populations were homogeneous with respect to the probability distribution of the present of the RAPD or SCAR marker (Araneda et al., 2005).

Genetic Variability. For co-dominant marker allele frequencies, number of alleles and observed and expected heterozygosities were estimated in the three populations (1995 and 2001), using CERVUS 2.0 (Marshall et al. 1998).

In Silico Analysis. An *in silico* approach was used to identify homologies between the three SCAR sequence obtained and Genbank nucleotide or protein sequences (Faber and Medrano 2003). Identification of repetitive motifs inside of each sequence were made using first Dot-matrix analysis (Mount 2002) for detected repetitive sequences and in a

second stage using Repeat Masker and Tandem Repeat Finder (www links in Ellegren 2004) to identify specific motifs and number of repeats.

RESULTS

RAPD screening. The initial screening with 400 RAPD primers identified ten potential polymorphic markers with association to spawning date between 2001 pools. After individual amplification of 20 individual from both 2001 population (including the eight individuals of pools), three RAPD primers UBC-075, UBC-229 and UBC-249 amplified fragments positively associated with spawning date in coho salmon (Figure 1). Two RAPD marker amplified with UBC-075 and UBC-229 primers exhibited higher frequency in early spawning population, and one RAPD maker amplified by UBC-249 primer was present in a 100% of late spawning salmons and with low frequency in early spawning population (Table 2).

SCAR developed. The DNA fragments corresponding to RAPD markers were cloned, fully sequenced and a specific primer pair designed (Table 1) converting the RAPD markers in single locus SCARs markers *Oki075* (Genbank Accession No. AY926350), *OkiCAT229UCH* (AY926352) and *Oki249* (AY929856). Analysis of sequences of *Oki075* marker reveals a 52 bp repetitive motif and it shows co-dominant pattern of inheritance with three amplified alleles of 630, 780 and 830 bp approximately, identified as alleles 1, 2 and 3 in Figure 2. Besides, there is evidence for a fourth null allele due to some individual, failed to consistently amplify this marker (Table 3). The marker *OkiCAT229UCH* carry a di-nucleotide GT/CA motif with 80 repeats in the Genebank sequence, and the size fragments amplified ranging from 202 to 310 bp (Table 3, Figure 2). Finally the marker *Oki249* shows an amplification present/absent pattern (Figure 2),

however we can identify a two internal repeats of 83 bp between nucleotides 450 and 615 of its sequence.

Genetic variability. In general marker *OkiCAT229UCH* showed a little reduction of observed and expected heterozygosity between the Base population (1995) and Early or Late populations (2001), it is more pronounced in the Late population. This heterozygosity reduction is consistent with a reduction in the number of alleles (Table 3). The marker *Oki075* showed important changes in observed heterozygosity with a high value in Early population in comparison with the Base and Late populations (Table 3). Expected heterozygosity was in general in the same range of the Base, Early and Late populations (Table 3).

Association Analysis. Association analysis shows that like the original RAPD markers the two new co-dominant markers shows allele heterogeneity after three generation of divergent selection (Table 4).

For the SSR marker *OkiCAT229UCH* there are specific alleles strongly represented in the Late population but not so in the Early population, for example the 238 bp allele was not present in the Early population however it had the higher frequency (35%) in the Late population. An inverse pattern was observed with the 274 pb allele having a high frequency in the Early population (20%) but not in Late population (2.5%). Similarly, a low frequency of the allele 3, SCAR *Oki075* is highly represented in Early population but not in the Late population. The dominant SCAR *Oki249* exhibited a very high frequency in the Late population (95%) in relation to the Early population (only 25%).

Heterogeneity was different between the Late and the Base populations, but there was not difference between the Early population and the Base population (Table 4).

In Silico Analysis.

Blast-n search using the non-redundant data base shows that on the marker *Oki075* a region span between the nucleotide 622 and 731 share homology with four interesting genes: follicle stimulating hormone beta sub-unit (*FSHBeta*, AY493564) of *Oncorhynchus tshawytscha* (Score = 182, % Identity = 96, Expect = 9e-43), IgH.A locus (AY872256S2, Score = 159, % Identity = 93, Expect = 1e-35,) and MHC class I a region gene (AB162342.1, Score = 111, % Identity = 88, Expect = 3e-21) both from *Oncorhynchus mykiss*; and zonadhesin-like gene (AY785950.1, Score = 115, % Identity = 88, Expect = 2e-22) from *Salmo salar*. The other two markers *OkiCAT229UCH* and *Oki249* didn't show significant homology with any sequence in the NCBI database.

DISCUSSION

In this study we have developed three molecular markers associated with spawning date in coho salmon, two of them showing a codominant pattern of inheritance. This is the first evidence of molecular markers associated with this trait in this species. In other salmonid fish like rainbow trout there are strong evidences of at least sixteen SSR loci associated with QTLs influencing spawning date, anchored on six different linkage groups (Sakamoto et al. 1999; O'Malley et al. 2002). Loci associated to with spawning date in rainbow trout shows allelic heterogeneity between trout strains spawning in different year's season (spring and fall) in relation with SSR loci unlinked with QTL (Fishback et al. 2000). Similar result has been presented in this study for the marker *OkiCAT229UCH*

which had specific alleles more represented in one but no in the other spawning population after divergent selection; besides little changes in heterozygosity in this marker between females of the Base population and each divergent populations in 2001 (Early and Late). The marker *Oki075* exhibited a suggestive level of allelic heterogeneity between Early and Late populations, possibly due to the null allele presence in higher frequency in the Late population (Table 3). Amplification of the dominant SCAR *Oki249* shows a clear significant association with late spawning females (Table 4).

Lack of genetic heterogeneity between the Base and Early populations could be explained as result of a previous early spawning selection performed on the stock where this population was originated, this has been a regular practice in the salmon coho aquaculture (Quinn et al. 2002, Neira et al. 2005). This same phenomenon could explain the strong genetic heterogeneity observed in the Late population in relation to the base population.

Spawning date is an important trait for salmon breeding, it has a median to low heritability level ($h^2 = 0.24 \pm 0.07$). In the coho salmon populations under study therefore this is an interesting trait to develop a strategy of marker assisted selection (MAS) due to its lower heritability and its sex limited expression (Dekkers and Hospital, 2002). The markers developed in this study need to be confirmed in different populations of coho salmon or in other species of salmon.

In silico analysis shows that four salmonid sequences share similarity with the 212 last nucleotides on the 3'OH end of the annotated sequence of *Oki075*. Interestingly two of these sequences have clearly reproductive function (*FSHBeta* and zonadhesin-like gene). The beta subunit of follicle stimulating hormone is the monomer that confers specificity of FSH to one of the several multimer pituitary hormones. This hormone is related with the maturation of ovary and in fish, studies in trout or salmon revealed that

FSH increases during early stages of vitellogenesis and spermatogenesis followed by an increase in LH during the final stages of maturation, however any study has been specifically performed using pulses of FSH on the female maturation in salmonid fish (Dickey and Swanson 1998, 2001). Zonadhesins are membrane proteins related with the interaction among extracellular oocyte matrix and spermatozoid in the fecundation. The other two similitude detected are genes related with the immunologic functions (MHC class I and IgH A genes), this result it isn't unexpected because recent studies of gene expression shows that several immunoregulators are expressed over twofold in the mature ovary in relation with immature gonad, several of this genes are MHC class I genes and immunoglobulin genes (Schalburg et al. 2005). This findings support the association between Oki075 and spawning related traits in coho salmon.

Acknowledgements: This work was supported by the grants: FONDECYT 2000-058, Beca PG/27/99 Departamento de Postgrado y Postítulo Universidad de Chile, and FIA BIOT-01-AC-21.

REFERENCES

- Araneda C, Neira R, Iturra P, 2005. Identification of a dominant SCAR marker associated with colour traits in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 247:67-73 (In English)
- Brunelli J, Thorgaard G, 2004. A New Y-Chromosome-Specific Marker for Pacific Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 133: 1247–1253 (In English).
- Choulakian V, Madhi S, 2000. A new statistics for the analysis of association between trait and polymorphic marker loci. *Mathematical Biosciences* 164: 139-145 (In English).
- Darvasi A, Soller M, 1992. Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and quantitative trait locus. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 353-359 (In English).
- Darvasi A, Soller M, 1994. Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics* 13: 1365-1373 (In English).

Dekkers C, Hospital F, 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Review Genetics* 3: 22 – 32.

Dickey J, Swanson P, 1998. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Molecular Endocrinology* 21: 291-306

Dickey J, Swanson P, 2000. Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology* 118: 436-449 (In English).

Ellegren H, 2004. Microsatellites: Simple sequence with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5:435-437 (In English).

Faber C, Medrano JF, 2003. Putative *in silico* mapping of DNA sequences to livestock genome maps using SSLP flanking sequences. *Animal genetics* 34:11-18 (In English).

Fishback A, Danzmann R, Ferguson M, 2000. Microsatellite allelic heterogeneity among hatchery rainbow trout maturing in different seasons. *Journal of Fish Biology* 57: 1367-1380 (In English).

Gall G, Neira R, 2004. Genetic analysis of female reproduction traits of farmed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 234: 143-154 (In English).

Gallardo J, García X., Lhorente JP, Neira R, 2004. Inbreeding and inbreeding depression of female reproductive traits in two populations of Coho salmon selected using BLUP predictors of breeding values. *Aquaculture* 234: 111-122 (In English).

Iturra P, Medrano J, Bagley M, Lam N, Vergara N, Marin J, 1998. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent *in situ* hybridization in rainbow trout. *Genetica* 101: 209–213 (In english).

Iturra P, Bagley M, Vergara N, Imbert P, Medrano JF, 2001. Development and characterization of DNA sequence OmyP9 associated with the sex chromosomes in rainbow trout. *Heredity* 86: 412– 419 (In English)..

Martínez V, Neira R, Gall G, 1999. Estimation of genetic parameters from pedigreed populations: lessons from analysis of alevin weight in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 180: 223-236 (In English).

Medrano JF, Aasen E, Sharrow L, 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *BioTechniques* 8: 43 (In English).

Michelmore R, Param I, Kesseli R, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832 (In English).

Marshall T, Slate J, Kruuk L, Pamberton J. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7:639-655 (In English).

Mount DW, 2001. Bioinformatics, sequence and genome analysis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 564 p.

Nakamura K, Ozaki A, Akutsu T, Iwai K, Sakamoto T, Yoshizaki G, Okamoto N, 2001. Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Genet Genomics* 265:687-693 (In English).

Neira R, Díaz N, Gall G, Gallardo J, Lhorente J, Alert A, 2005. Genetic improvement in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) II: Selection response for early spawning date. (in press *Aquaculture*)

O'Malley K, Sakamoto T, Danzmann R, Ferguson M, 2002. Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes. *Journal of Heredity* 94: 273-284 (In English).

Paran I., Micheltore R, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85, 985-993 (in English).

Quinn T, Peterson J, Gallucci V, Hershberger W, Brannon E, 2002. Artificial selection and environmental change: countervailing factors affecting the timing of spawning by coho and chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 131: 591-598 (In English).

Sakamoto T, Danzmann R, Okamoto N, Ferguson M, Ihssen P, 1999. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 173: 33-43 (In English).

Shalburg K, Rise M, Brown G, Davidson W, Koop B, 2005. A comprehensive survey of the genes involved in maturation and development of the rainbow trout ovary. *Biology of Reproduction* 72: 687-699 (In English)..

Siitonen L, Gall G, 1989. Response to selection for early spawn date in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 78: 153-161 (In English).

Su G-S, Liljedahl L-E, Gall G, 1999. Estimates of phenotypic and genetic parameters for within-season date and age at spawning of female rainbow trout. *Aquaculture* 171: 209-220 (In English).

Table 1. Primer sequences, annealing temperatures and evidence of linkage with QTL for three SCAR markers associated with spawning date in Coho salmon.

Marker	Primer Sequences (5'-3')	Tm (°C)	Type of polymorphism
<i>Oki075</i>	Forward: CACGTCCAGAGGAAGATCTCTT Reverse: TGACGTCCAGAGTAGTGATGT	59	Minisatellite
<i>OkiCAT229UCH</i>	Forward: TGTGGAGCCAAACCTCTTTC Reverse: CACACCTTGAAGCGAGTGC	58	Microsatellite
<i>Oki249</i>	Forward: GCATCTACCGTATAGAGGGTCA Reverse: CATCTACCGTGGGGTATTCA	60	Present/absent

Table 2. Association analysis of three RAPD markers with spawning date in Coho salmon populations (2001).

Primer	Polymorphic Fragment Size (bp)	Frequency in Early Population (n=20)	Frequency in Late Population (n=20)	χ^2 1 df	(P-value)
UBC-075	700	0.65	0.15	10.980	(0.0009)
UBC-229	980	0.90	0.05	27.997	(0.0000)
UBC-249	1450	0.20	1.00	24.024	(0.0000)

Table 3. Allelic frequencies and genetic variability on co-dominant marker across three population of coho salmon.

Maker/Allele	Base (1995) N = 40	Early (2001) N = 20	Late (2001) N = 20
<i>OkiCAT229UCH:</i>			
202	0.0125	-	0.0250
208	0.0625	-	-
210	0.1625	0.2500	0.1000
220	0.0125	-	-
232	0.1625	-	-
234	-	0.1000	0.0250
238	0.0125	-	0.3500
252	0.0625	0.0250	-
258	-	0.0500	-
262	0.0625	0.1500	0.0250
264	0.1125	0.1250	0.2500
274	0.1500	0.2000	0.0250
278	0.0625	0.0750	0.2000
286	0.0250	-	-
290	0.0500	-	-
306	0.0125	0.0250	-
310	0.0375	-	-
H_{obs}	0.900	0.850	0.700
H_{exp}	0.903	0.862	0.782
<i>Oki075:</i>			
1	0.1526	0.1842	0.172
2	0.1150	0.5789	0.0917
3	0.3395	0.2368	0.0727
Null	0.3928	-	0.6632
H_{obs}	0.256	0.579	0.125
H_{exp}	0.585	0.590	0.623

Table 4. Association analysis, L_D (Probability), for three markers between Base population and Early and Late spawning populations in coho salmon.

Marker	Base v/s Early	Base v/s Late	Early v/s Late
<i>Oki075</i>	10.72 (0.00106)	13.84 (0.00019)*	9.72 (0.00182)
<i>OkiCAT229UCH</i>	8.28 (0.00402)	27.77 (0.00000)*	16.97 (0.00004) *
<i>Oki249</i>	0.89 (0.35521)	35.11 (0.00000)*	20.42 (0.00001) *

* Indicates allelic heterogeneity ($P < 0.0002$)

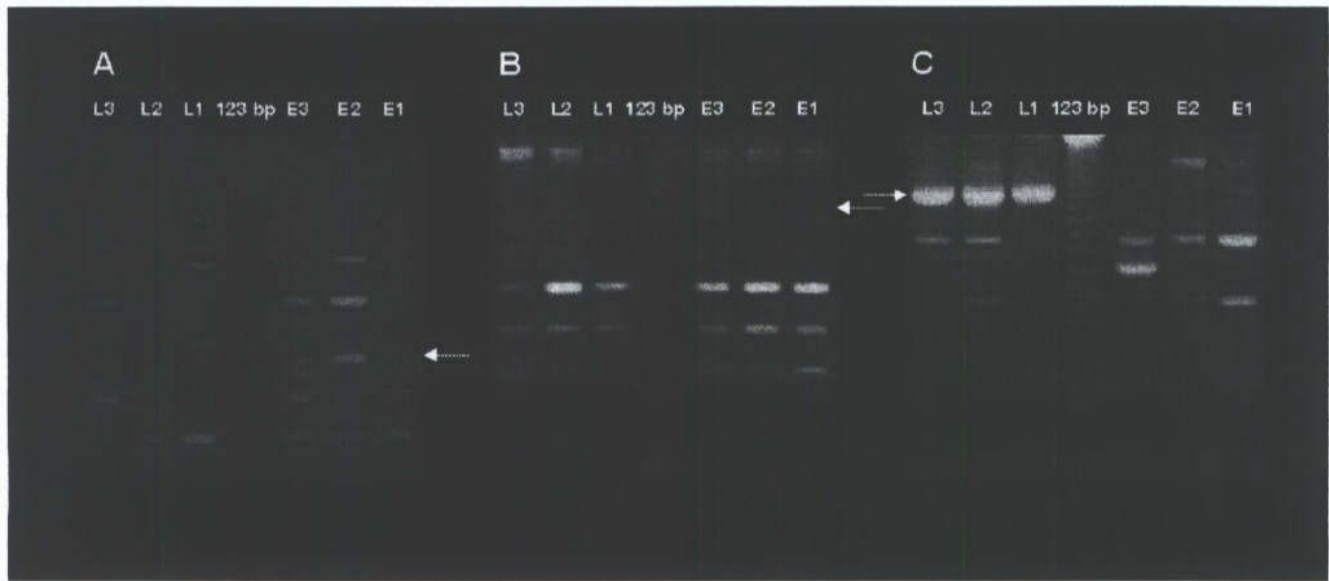


Figure 1. RAPD polymorphism detected with primers UBC075 (A), UBC229 (B) and UBC249 (C) between three late spawning females (L) and three early spawning females (E). Arrows indicate RAPD markers associated with spawning date.

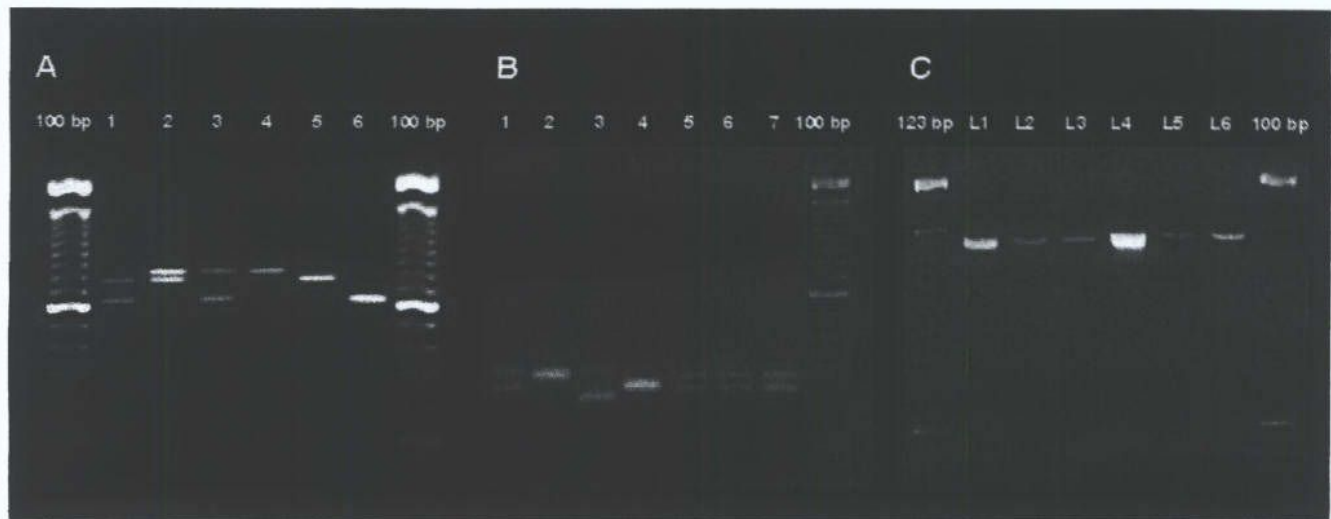


Figure 2. (A) Amplification of SCAR marker *Oki075* RAPD in different individual of coho salmon, lanes 1 to 3 shows heterozygous 1/2, 2/3 and 1/3, respectively; and lanes 4 to 6 shows homozygous 3/3, 2/2 and 1/1. (B) Amplification of SSR marker *OkiCAT229UCH* in seven individual, lanes 2 and 3 shows heterozygous, this amplicons were resolves in 2.5% of agarose. (C) Amplification of SCAR marker *Oki249* in six late spawning females, early spawning individuals does not show amplification of this marker.

TALLER:

**EL USO DE MARCADORES GENETICO MOLECULARES
EN EL MEJORAMIENTO GENETICO DE PECES.**

Hotel Don Vicente. Puerto Montt.
2 de Diciembre de 2005
Informaciones: ndiaz@uchile.cl

08:30 INSCRIPCIONES

09:15 – 09:45. INTRODUCCION:
MARCADORES GENÉTICO MOLECULARES
Nelson F. Díaz

09:45 – 10:15. MARCADORES GENETICOS BASADOS en PCR
Cristian Araneda T.

10:15 – 10:45. APLICACIONES DE MARCADORES GENETICOS EN ACUICULTURA
Patricia Iturra C.

10:45 CAFÉ

11:00 – 11:30. RESULTADOS CON MARCADORES SCAR EN SALMON COHO
C. Araneda, N.F. Díaz, P. Iturra, R. Neira, S. Cortéz, G. Gómez, C. Pérez

11:30 – 12:00. RESULTADOS CON MARCADORES MICROSATELITES EN SALMON COHO
C. Araneda, N.F. Díaz, P. Iturra, R. Neira, S. Cortéz, G. Gómez, C. Pérez

12:00 – 12:30. USO DE MARCADORES GENETICOS EN SELECCIÓN ASISTIDA
Roberto Neira

12:30 – 13:00 DISCUSION

TALLER : USO DE MARCADORES GENETICO MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO GENETICO DE PÉCES.

PUEERTO MONTT 2 de DICIEMBRE 2005

FERNANDO MUJICA

U. AUSTRAL

RAMON JARA

Ing en Acuíc

U Austral

MARCELA ASTORGA

U. AUSTRAL

ROBERT DEERMBERG INNERTEC

ALEJANDRO ALERT

Landcatch

CRISTIAN MALDONADO

I. Prod La Araucana

FRANCISCO SCHWENTER

"

ELIZABETH BRINTRUP

"

PAMELA MAUTZ

Ing en Acuíc

U AUSTRAL

SERGIO LOYOLA

Ing en Acuíc

U AUSTRAL

PATRICIA BERISTAIN

U de Los LAGOS

MARCELO VALENZUELA

U. de los Lagos

Patricio López

U de los Lagos

KARIN OELCKERS G.

" "

Eduardo de la Fuente

SGS Aquatic Health

Javier Sontela

Ewos Innovation

[Handwritten signatures and notes on the right side of the page, including names like 'J. Mautz', 'Patricio López', and 'Karín Oelckers G.']