

Identificación de genes a partir de transcriptomas en peces de extensivo uso comercial. Aplicaciones para acuicultura

Juan M. Cabrera*; Carla Bacchetta**; Darío E. Elías*; Eva C. Rueda*

Autores: *Facultad de Ingeniería Universidad Nacional de Entre Ríos. Ruta provincial 11 km 10 Oro Verde, Entre Ríos, Argentina. ** Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL)
Contacto: eva.carolina.rueda@gmail.com y/o eva.rueda@uner.edu.ar

ARK: <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/0qrz6rx4v>

RESUMEN

La acuicultura, y dentro de ella la piscicultura, son alternativas productivas que además de generar ingresos económicos, se utilizan como alternativa para disminuir el impacto de la explotación de los recursos ictícolas. El objetivo principal del proyecto es identificar genes importantes para el uso en la acuicultura a partir del análisis de transcriptomas en especies de uso comercial de nuestra región como el sábalo y el pacú (*Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus*). Se pretende identificar genes que estén regulados y/o modulados por estresores ambientales, que afectan a los sistemas de piscicultura de la región, estudiando tejidos específicos (branquias, hígado, músculo). Asimismo, se intentará identificar marcadores de tipo SNPs (*Single Nucleotide Polimorphisms*) que pueden ser de utilidad en los programas de selección de reproductores y para medir la variabilidad genética en sistemas naturales. Todos estos análisis pretenden ser concomitantes con la generación de una plataforma bioinformática de análisis y descripción de los marcadores de las especies de estudio, en el marco del Sistema Nacional de Datos Biológicos del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Palabras clave: peces migradores; marcadores moleculares; acuicultura

MARCO TEÓRICO Y METODOLÓGICO

Marco teórico

La acuicultura comprende el cultivo de diferentes organismos acuáticos. La piscicultura es la crianza de peces, término bajo el que se agrupan una gran diversidad de cultivos muy diferentes entre sí, en general denominados en función de la especie o la familia. Existen muchas técnicas genéticas (Z. J. Liu & Cordes, 2004) que permiten que la piscicultura se lleve adelante en muchos países, seleccionando reproductores e individuos a partir de una caracterización genética definida mediante marcadores moleculares, a los fines de obtener mejores resultados productivos.

El continuo avance en las metodologías de secuenciación de genomas ha desarrollado nuevas estrategias de análisis conocidas como GWAS (*Genome-wide Association Studies*), donde es posible analizar la variabilidad genética a lo largo de todo el genoma del organismo con el objetivo de identificar su asociación a un rasgo observable, como también identificar genes concretos. Para ello, existen varias alternativas conocidas como “-ómicas” (transcriptómica, metabolómica, entre otras). Los análisis de GWAS están empezando a aplicarse en organismos llamados “no modelo” (Ellegren, 2013; Mastrochirico-Filho et al., 2016) a los fines de generar información que, por un lado, sea aplicable a la solución de problemas concretos de impacto productivo o de otra índole, y por otro, realice aportes al conocimiento del genoma de las especies, enriqueciendo las bases de datos genómicos. En estos últimos tiempos, se han secuenciado genomas de organismos “no-modelo” (es decir, aquellos que no son utilizados como modelo de estudios científicos, pero que tienen cierto interés biológico, ecológico), así como en especies modelo y de interés comercial, con múltiples aplicaciones (Cheng et al., 2018; Deschamps et al., 2012; Ekblom & Galindo, 2010; S. Liu et al., 2016; Vignal & Eory, 2019).

De esta manera, con el correr de los años, se han generado entonces, millones de datos genéticos que representan recursos de importancia para la investigación en biología. El análisis de estos “datos genómicos” tiene implicancia en diversos aspectos que abarcan desde la evolución hasta la asociación de determinados *loci* (sitios o ubicaciones físicas en un genoma, un gen u otro segmento de ADN de interés) con características fenotípicas específicas. Esto es debido a que además de “conocer” la secuencia, uno puede entender cómo está organizado el genoma. Este último aspecto está relacionado con el tipo y abundancia de elementos transponibles, cuánto está empaquetado el genoma, la genómica del “espacio” y otras características tales como la composición de bases, los ARNs no codificantes, la estructura de la cromatina, así como las modificaciones en los nucleótidos. En este contexto, de aparición de nuevas disciplinas devenidas de la genómica, surge la “genómica de poblaciones”, donde los marcadores SNPs generados a partir de NGS (Next Generation Sequencing, en castellano, Secuenciación de Nueva Generación) permiten el análisis amplio del genoma con énfasis en el estudio de variaciones genéticas entre poblaciones de organismos no modelo permitiendo investigar diferentes preguntas (evolutivas, fisiológicas, estructurales) a partir del mismo lote de datos (Bertorelle et al., 2022; Butlin, 2008; Camak et al., 2021; da Fonseca et al., 2016; Ellegren, 2014; Hohenlohe et al., 2018; Rajora, n.d.).

Los agentes estresantes ambientales, naturales o antropogénicos, afectan inicialmente a nivel de organización celular y tisular, y si el efecto del estresor continua lo suficiente en duración y magnitud, los efectos de estos niveles más bajos eventualmente se manifestarán a niveles mayores de organización biológica (individuo, población, comunidad) afectando finalmente al ecosistema que habita. Las primeras respuestas (biomoleculares/bioquímicas) ocurren inmediatamente después del disturbio (desde minutos a horas), mientras que los cambios a nivel de ecosistema llevan años o décadas hasta manifestarse claramente.

Los peces también han sido ampliamente utilizados para ensayar y evaluar efecto de agentes estresores, debido a que son organismos particularmente sensibles a perturbaciones naturales o antropogénicas, manifestando respuestas bioquímicas, fisiológicas y conductuales ante una amplia gama de

estímulos. Estas respuestas biológicas, denominadas biomarcadores, resultan herramientas valiosas que permiten evaluar la calidad de los ambientes acuáticos, proporcionando un sistema de alerta temprana a nivel de organismo, antes de que ocurran cambios a mayores niveles de organización (Laurén & Wails, 2018; Long & Buchman, 2018; McCarthy & Shugart, 2019; Ransberry et al., 2015). Entre los biomarcadores más utilizados se encuentran aquellos que reflejan respuestas hematológicas, inmunológicas, metabólicas y relacionados al estrés oxidativo, entre otros (Ale et al., 2021; Bacchetta et al., 2014, 2020; Cazenave et al., 2014; Fantón et al., 2021; Rossi et al., 2017).

De acuerdo a lo publicado en la base de datos de NCBI, al año 2017, existen 75 genomas secuenciados y ensamblados de la clase peces, producto de consorcios internacionales, y varios trabajos muestran la utilidad de los SNPs (obtenidos por NGS o a partir de bibliotecas de ESTs –*Expressed Sequenced Tags*–) en peces utilizados comercialmente como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el bacalao (*Gadus morhua*) o el pacú (*Piaractus mesopotamicus*), salmón (*Salmo sp.*), entre otras especies (Drywa et al., 2014; Martinsohn & Ogden, 2009; Poćwierz-Kotus et al., 2015; Wenne et al., 2016)

En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación (Rosso et al., 2018; Rueda et al., 2013, 2016), se ha generado información apreciable acerca de estructura y variabilidad genética para peces de agua dulce sometidos a explotación económica, es que planteamos profundizar los análisis mediante el desarrollo de nuevos marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) a partir del análisis de transcriptomas. Los marcadores obtenidos serán utilizados además, para identificar genes específicos en generar respuestas fisiológicas a estresores típicos de la acuicultura. Estudiar el genoma a partir del transcriptoma, proporciona una forma eficaz de reducir los costos y tiempo de trabajo para obtener información relevante en relación con la variación de caracteres cuantitativos. Al usar datos de secuencias expresadas es posible estudiar no sólo patrones de marcadores SNPs, sino asociaciones de eventos de *splicing* alternativo o cambios de expresión génica y entender el trasfondo genético que causa estos patrones (de Wit et al., 2015). Para poder llevar a cabo estas aproximaciones, es necesario obtener los SNPs a partir del análisis de transcriptomas mediante la técnica “*RNASeq*”; esta metodología se utiliza para obtener y analizar transcriptomas (material genético que es expresado en un tipo celular bajo unas condiciones dadas) a los fines de obtener datos de variación genética en genes que se expresan (Lemopoulos et al., 2019; Liao & Lee, 2010). Los marcadores desarrollados serán de utilidad tanto para detectar variaciones en la expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta a estresores (temperatura, exposición a patógenos) que suelen afectar a los sistemas de acuicultura, como también, para en un futuro, realizar un conjunto de marcadores que permitan la identificación de stocks pesqueros.

Marco metodológico

1) Ensayos biológicos: A modo de enfocar los análisis, se decidió realizar la evaluación del efecto de la “Temperatura”, estresor considerado clave en la piscicultura, en ejemplares de *Piaractus mesopotamicus*. Se compraron ejemplares juveniles de *P. mesopotamicus* de longitud estandar 7.0 ± 0.5 cm y peso inicial de 12.24 ± 2.98 g. Se colocaron en condiciones controladas durante 14 días, alimentados con alimento base y alimento suplementado durante 60 días. Posteriormente, 36 ejemplares de pacú de cada lote fueron trasladados a la incubadora para realizar los ensayos de exposición a bajas temperaturas. Los ensayos se realizaron de acuerdo con los protocolos de (Madeira et al., 2016; Schofield et al., 2010). Los tratamientos se llevaron a cabo en una incubadora frío-calor, en la cual se realizó el cambio de la temperatura del acuario de forma paulatina (1°C h^{-1}) hasta alcanzar las temperaturas deseadas. Se realizó el ensayo con temperatura baja ($14 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$). Los grupos controles se mantuvieron a $24 (\pm 0.1)^{\circ}\text{C}$. Luego de 14 días de exposición se realizó el sacrificio de los ejemplares y la toma de muestras de tejidos de al menos 5 individuos (hígado, intestino, músculo, cerebro y branquias), los cuales se conservaron a -80°C hasta sus análisis bioquímicos.

2) Extracción de ARN y secuenciación de los transcriptomas:

- a. Se realizó la extracción de ARN total siguiendo el siguiente protocolo: en 1 ml de Trizol, se procesaron 50 mg de tejido utilizando un vástago 8G. El homogenato se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se agregaron 200 μ l de cloroformo (1/5). Se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 14.000 rpm, 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 500 μ l de isopropanol para precipitar el ARN. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm, 15 minutos a 4°C. El pellet obtenido se lavó con etanol 80% y se repitió el paso de centrifugar a 14.000 rpm, 15 minutos a 4°C. Las muestras se secaron a 37°C durante 5 minutos y el pellet se resuspendió en 30 μ l de agua libre de RNAsas. Posteriormente se midió la concentración de ARN en las muestras obtenidas.
- b. Para facilitar la logística y enviar a secuenciar los transcriptomas, se realizó la retrotranscripción de las muestras de modo de obtener ADNc (ADN copia) a partir de ARN lo que permite enviar las muestras a temperatura ambiente. La retrotranscripción de todas las muestras se realizó utilizando 2 μ g de muestra, Random hexamer primers/Oligos dT ($\frac{1}{2}$) 0,5 mM en un volumen final de 10 μ l. Las muestras se incubaron en un termociclador IVEMA, durante 5 minutos a 70 °C. Luego se agregaron 20 μ l de la siguiente mastermix con la concentración final de: 1X de Buffer; 0,625 mM de dNTPs; 1U de MMLV-RT -enzima retrotranscriptasa reversa-; RNA-out -inhibidor- 20 U; agua hasta completar 20 μ l. La reacción se llevó a cabo en un termociclador IVEM con el siguiente programa: 90 min. a 37°C; 15 min. a 42°C; 5 min a 80°C; 30 seg. a 95°C. Finalmente se agregaron 30 μ l de agua Mq a cada tubo.
- c. Se seleccionaron 8 muestras (Hígado, Branquias, Intestino y Cerebro; tratados con bajas temperaturas y controles) y se enviaron a secuenciar a la empresa MACROGEN Inc., debido a que tenía el mejor precio, en relación con otros servicios ofrecidos (nacionales e internacionales).

OBJETIVOS PROPUESTOS Y CUMPLIDOS

Objetivos del proyecto:

1. Analizar comparativamente los datos transcriptómicos obtenidos con los disponibles en bases de datos genéticos.
2. Analizar las variaciones genéticas de *Prochilodus lineatus*, asociadas con estresores ambientales característicos en los sistemas de acuicultura, a partir de ensayos fisiológicos realizados en estas especies.
3. Desarrollar marcadores SNPs a partir del análisis de transcriptomas para *Prochilodus lineatus*.
4. Identificar variantes (alelos, genotipos) que podrían utilizarse como SNPs en estudios poblacionales en cada una de las especies.
5. Generar una plataforma bioinformática de análisis y descripción de SNPs de las especies de estudio, en el marco del Sistema Nacional de Datos Biológicos.
6. Obtener el equipamiento mínimo indispensable, para desarrollar el área de genómica funcional en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos.

SÍNTESIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los ensayos biológicos se realizaron con la especie *Piaractus mesopotamicus* (pacú), según la metodología descrita. Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Limnología (INALI-UNL-CONICET) por la Dra. Carla Bacchetta, referente en la temática y colaboradora del proyecto.

Para la realización de análisis bioquímicos, se extrajo hígado, intestino, branquias, cerebro y músculo

y se evaluó la actividad enzimática antioxidante, como marcadores de estrés oxidativo. La respuesta antioxidante fue diferente entre los tejidos. Se encontró una disminución significativa de la actividad enzimática en intestino (SOD- superoxide dismutase), en branquias (GST-glutathione S-transferase) y en hígado (CAT- Catalase) en los peces que fueron alimentados con dieta suplementada. Además de niveles más bajos de LPO que fueron observados en cerebro e hígado. Mientras que no se encontraron diferencias significativas en músculos. Estos análisis fueron realizados testeando el efecto de la temperatura y también teniendo en cuenta un alimento suplementado; esta última variable no se tuvo en cuenta para el desarrollo del proyecto.

Teniendo en cuenta estos resultados que sugieren que podrían existir cambios a nivel de la expresión génica, se procedió a la extracción de ARN total de las muestras de los tejidos por duplicado. El resultado de la concentración de ARN se presenta en la siguiente tabla:

Muestra	µg/µl	Muestra	µg/µl	Muestra	µg/µl	Muestra	µg/µl
1 (Hígado-C)	0.93	6 (Músculo-C)	1.32	11 (Branquias - T)	1.90	16 (Intestino - T)	1.67
2 (Hígado-C)	1.00	7 (Músculo-T)	0.85	12 (Branquias - T)	2.00	17 (Cerebro - C)	1.71
3 (Hígado-T)	1.83	8 (Músculo-T)	1.16	13 (Intestino - C)	2.09	18 (Cerebro - C)	1.57
4 (Hígado-T)	1.14	9 (Branquias-C)	1.17	14 (Intestino - C)	2.20	19 (Cerebro-T)	1.97
5 (Músculo-C)	0.90	10 (Branquias-C)	1.61	15 (Intestino - T)	2.00	20 (Cerebro - T)	1.32

C= Control; T= Tratada; R 260/280 >1.9 en todos los casos.

Como podemos ver, se obtuvieron valores bajos de concentración de ADN, aunque aceptables para continuar. Por otro lado, la calidad de este (medido por el valor de la relación 260nm/280nm medida en el espectrofotómetro) es superior a 1.9 en todos los casos, lo cual es un indicador de calidad que nos permite avanzar en el paso siguiente.

A continuación, se realizó la retrotranscripción del ARN a ADNc. Se utilizó la metodología explicada, y se enviaron las muestras para secuenciar los transcriptomas. El primer resultado obtenido, fueron fragmentos de 100-150 pares de bases, que todos corresponden a ARN ribosómico. Esto resultó ser un efecto del paso previo, dado que la retrotranscripción se realizó con oligos random. Por este motivo, realizamos nuevamente la retrotranscripción pero con oligos-dT, de manera de asegurarnos de que haya más concentración de ADNc, correspondiente a ARN mensajero. Volvimos a enviar para secuenciar los transcriptomas, pero esto no fue posible dado que por dificultades de la técnica (falla en la función de la enzima) se obtuvieron solamente fragmentos de 50 pares de bases. La bibliografía indica que es sugerido que las bibliotecas de ADNc tengan al menos 100 bp (Costa-Silva et al., 2017; Lowe et al., 2017; Wang et al., 2009). Dada la información previa, y los resultados de las reuniones que se mantuvieron con el equipo de MacroGen Inc. resolvimos no secuenciar esas muestras.

Respecto del número de muestras vale la pena hacer un paréntesis, dado que en este tipo de ensayos siempre está presente “número de ensayos”, “número de muestras”, y “profundidad de secuenciación”. La bibliografía sugiere que mientras mayor sea el número de muestras biológicas los resultados tienen más robustez (Liu et al. 2014). En nuestro caso solo tenemos un número limitado de réplicas biológicas por lo tanto para aumentar la significancia de nuestros resultados tenemos que aumentar la profundidad de secuenciación. Si bien esta metodología está validada (aumenta la significancia), el aumento de rendimiento tiene un tope máximo (llega a una meseta) para una cierta profundidad. Dado a que no fue posible obtener los transcriptomas, hubo que volver atrás y revisar la metodología previa. Para poder

obtener nuevas muestras a enviar, debíamos realizar nuevas extracciones de ARN de los tejidos y nuevos ensayos biológicos (ya que no contábamos con más muestras de cerebro ni de hígado). Estas actividades serían realizadas durante el año 2020, lo cual no fue posible debido a la situación de emergencia sanitaria provocada por la pandemia de SARS-Cov-2 (COVID-19).

La secuenciación de genomas de los organismos es un área que avanza constantemente y en los últimos años, la velocidad de secuenciación, las plataformas de análisis y el acceso a las nuevas tecnologías han permitido que diversos grupos en todo el mundo puedan generar datos genómicos. A su vez los costos, también han disminuido permitiendo que cada vez más equipos de investigación, orientados a diferentes líneas, puedan utilizar estas tecnologías. En particular, se nota el avance en la secuenciación de genomas de organismos eucariotas, donde además se van incluyendo los llamados “organismos no-modelo”. Según el trabajo de Ellegren (2014), durante el año 2013, se habían secuenciado 644 genomas de organismos eucariotas, según la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI); en el mismo trabajo, se menciona la importancia de trabajar en genómica de organismos “no-modelo” ya que brindan una información importante y complementaria a la que se obtiene de los organismos modelo (*Drosophila sp.*, *Arabidopsis thaliana*, *C. elegans*, etc). En la actualidad, se encuentran anotados en el mismo sitio (considerado de referencia) más de 800 genomas eucariotas (Figura 1).

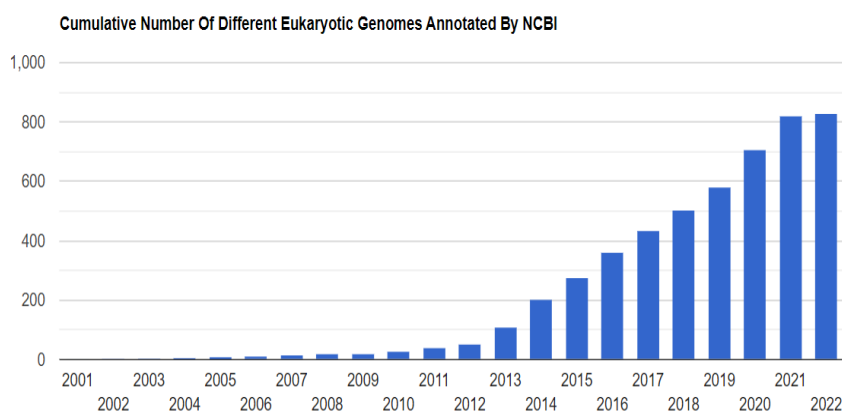


Figura 1. Número de genomas eucariotas secuenciados y anotados.
Fuente: [Eukaryotic Genome Annotation at NCBI \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/)

Para poder seleccionar qué herramientas de software utilizar, se realizó una comparación de varios programas para análisis de transcriptomas; la conclusión de la búsqueda bibliográfica es que la elección de los programas para realizar el mapeo del transcriptoma con el genoma de referencia tiene un impacto mínimo en la detección de genes (todos los programas producen resultados similares); asimismo, cuando se compararon los resultados de diferentes herramientas de análisis de expresión diferencial, se concluye que la manera de obtener mejores resultados es una combinación de los métodos de análisis (Costa-Silva et al., 2017).

También era importante contar con un “genoma de referencia” para poder obtener información de calidad durante el ensamblado de las secuencias. Realizando una búsqueda de publicaciones sobre transcriptomas de Pacú encontramos que el mismo está descrito como un organismo “no modelo” por lo que al realizar los ensayos de ensamblado de los productos de la secuenciación de las muestras utilizaban una aproximación *de novo* (sin genoma de referencia). Este es un aspecto importante de considerar, al momento de realizar el pedido de secuenciación.

A pesar de esta vasta disponibilidad de recursos para acceder a datos genómicos, resulta importante no descartar las primeras etapas de cualquier estudio científico: la pregunta que buscamos resolver y la

calidad de los ensayos biológicos que se realizan. Este proyecto propuso un enfoque de estudio particular: el uso de NGS, para generar marcadores moleculares que sean útiles en acuicultura; esto implicaba realizar ensayos biológicos y no sólo obtener transcriptomas que nos permitan estudiar la respuesta frente a posibles estresores, sino también continuamente indagar en las bases de datos genéticos y genómicos de peces de agua dulce, de nuestra región.

El proyecto comenzó a llevarse a cabo tal cual fuera previsto, con los ensayos biológicos correspondientes. Los mismos dieron los primeros indicios de cambios bioquímicos, probablemente adaptativos a un estresor típico de la acuicultura como lo es la temperatura. Los pasos siguientes se corresponden con el trabajo molecular, que también fue llevado a cabo. Simultáneamente, se pretendía comenzar a montar en la cátedra de Genética, un laboratorio de genética molecular con el equipamiento mínimo (ver en ítem “n” ejecución de presupuesto). Lamentablemente, las bruscas devaluaciones económicas y la situación de emergencia sanitaria impidieron continuar con la ejecución del proyecto.

Sin embargo, es importante mencionar que la interrupción de la ejecución del proyecto por la pandemia COVID-19, no desvaloriza el trabajo realizado hasta esta instancia, teniendo en cuenta que se pudieron comenzar lo que podríamos considerar “inicios” de una línea de investigación innovadora, y de importancia para el desarrollo de una economía regional como es la acuicultura.

INDICADORES DE PRODUCCIÓN

El software TEGA (*Tools for Evolutionary and Genetic Analysis*) publicado, es una propuesta que pretende simplificar el análisis de marcadores genéticos en una única plataforma. Este desarrollo fue realizado conjuntamente con el proyecto y pretendía ser una herramienta para ser utilizada una vez obtenidos los marcadores SNPs.

Es una plataforma WEB diseñada para la gestión y análisis de datos biológicos, con énfasis en los estudios de genética de poblaciones, con posibilidades de expandirse a la genómica de poblaciones. Fue desarrollada en la Facultad de Ingeniería de la UNER, y sus objetivos principales son: facilitar la gestión de los datos genéticos y ambientales; proveer una vía de ejecución para las herramientas de análisis habituales; brindar un medio para la publicación tanto de los datos analizados como de los resultados de los análisis. “*Rabid Fish*” es la primera implementación de TEGA.

Elias, D. E., & Rueda, E. C. R. (2020). “*Tools for Evolutionary and Genetic Analysis (TEGA): A new platform for the management of molecular and environmental data*.” *Genetics and Molecular Biology*, 43(2). doi: [10.1590/1678-4685-gmb-2018-0272](https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2018-0272)

Bacchetta, C.; Ale, A.; Rossi, A.; Karakachoff, M.; Cazenave, J. (2020). “*Effects of cold stress on juvenile Piaractus mesopotamicus and the mitigation by β -carotene*.” *Journal of Thermal Biology*, 88, 102497.

BIBLIOGRAFÍA

Ale, A., Bacchetta, C., Rossi, A. S., Scarabotti, P. A., & Cazenave, J. (2021). Low temperature stress in a cultured fish (*Piaractus mesopotamicus*) fed with *Pyropia columbina* red seaweed-supplemented diet. *Fish Physiology and Biochemistry* 2021 47:4, 47(4), 829–839. <https://doi.org/10.1007/S10695-021-00944-7>

Bacchetta, C., Ale, A., Rossi, A. S., Karakachoff, M., & Cazenave, J. (2020). Effects of cold stress on juvenile *Piaractus mesopotamicus* and the mitigation by β -carotene. *Journal of Thermal Biology*, 88, 102497. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2019.102497>

Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M. J., & Cazenave, J. (2014). Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecological Indicators*, 36, 532–538. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2013.09.016>

Bertorelle, G., Raffini, F., Bosse, M., Bortoluzzi, C., Iannucci, A., Trucchi, E., Morales, H. E., & van Oosterhout,

- C. (2022). Genetic load: genomic estimates and applications in non-model animals. *Nature Reviews Genetics* 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00448-x>
- Butlin, R. K. (2008). Population genomics and speciation. *Genetica* 2008 138:4, 138(4), 409–418. <https://doi.org/10.1007/S10709-008-9321-3>
- Camak, D. T., Osborne, M. J., & Turner, T. F. (2021). Population genomics and conservation of Gila Trout (*Oncorhynchus gilae*). *Conservation Genetics* 2021 22:5, 22(5), 729–743. <https://doi.org/10.1007/S10592-021-01355-0>
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., & Parma, M. J. (2014). Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecological Indicators*, 38, 104–112. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2013.10.029>
- Cheng, H., Wang, Y., & Sun, M. an. (2018). Comparison of Gene Expression Profiles in Nonmodel Eukaryotic Organisms with RNA-Seq. *Methods in Molecular Biology*, 1751, 3–16. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7710-9_1
- Costa-Silva, J., Domingues, D., & Lopes, F. M. (2017). RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLOS ONE*, 12(12), e0190152. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0190152>
- da Fonseca, R. R., Albrechtsen, A., Themudo, G. E., Ramos-Madrugal, J., Sibbesen, J. A., Maretty, L., Zepe-da-Mendoza, M. L., Campos, P. F., Heller, R., & Pereira, R. J. (2016). Next-generation biology: Sequencing and data analysis approaches for non-model organisms. *Marine Genomics*, 30, 3–13. <https://doi.org/10.1016/J.MARGEN.2016.04.012>
- de Wit, P., Pespeni, M. H., & Palumbi, S. R. (2015). SNP genotyping and population genomics from expressed sequences – current advances and future possibilities. *Molecular Ecology*, 24(10), 2310–2323. <https://doi.org/10.1111/MEC.13165>
- Deschamps, S., Llaca, V., & May, G. D. (2012). Genotyping-by-Sequencing in Plants. *Biology* 2012, Vol. 1, Pages 460–483, 1(3), 460–483. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY1030460>
- Drywa, A., Poćwierz-Kotus, A., Dobosz, S., Kent, M. P., Lien, S., & Wenne, R. (2014). Identification of multiple diagnostic SNP loci for differentiation of three salmonid species using SNP-arrays. *Marine Genomics*, 15, 5–6. <https://doi.org/10.1016/J.MARGEN.2014.03.003>
- Eklblom, R., & Galindo, J. (2010). Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 2011 107:1, 107(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.152>
- Ellegren, H. (2013). Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. *Trends in Ecology & Evolution* Xx, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.09.008>
- Ellegren, H. (2014). Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2013.09.008>
- Fantón, N., Cazenave, J., Michlig, M. P., Repetti, M. R., & Rossi, A. (2021). Biomarkers of exposure and effect in the armoured catfish *Hoplosternum littorale* during a rice production cycle. *Environmental Pollution*, 287. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117356>
- Hohenlohe, P. A., Hand, B. K., Andrews, K. R., & Luikart, G. (2018). *Population Genomics Provides Key Insights in Ecology and Evolution*. 483–510. https://doi.org/10.1007/13836_2018_20
- Laurén, D. J., & Wails, D. (2018). Liver Structural Alterations Accompanying Chronic Toxicity in Fishes: Potential Biomarkers of Exposure. *Biomarkers of Environmental Contamination*, 17–57. <https://doi.org/10.1201/9781351070263-4>
- Lemopoulos, A., Prokkola, J. M., Uusi-Heikkilä, S., Vasemägi, A., Huusko, A., Hyvärinen, P., Koljonen, M. L., Koskiniemi, J., & Vainikka, A. (2019). Comparing RADseq and microsatellites for estimating genetic diversity and relatedness — Implications for brown trout conservation. *Ecology and Evolution*, 9(4), 2106–2120. <https://doi.org/10.1002/ECE3.4905>
- Liao, P. Y., & Lee, K. H. (2010). From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology appli-

- cations. *Biochemical Engineering Journal*, 49(2), 149–158. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2009.12.021>
- Liu, S., Palti, Y., Gao, G., & Rexroad, C. E. (2016). Development and validation of a SNP panel for parentage assignment in rainbow trout. *Aquaculture*, 452, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.001>
- Liu, Z. J., & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1–4), 1–37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.027>
- Long, E. R., & Buchman, M. F. (2018). A comparative evaluation of selected measures of biological effects of exposure of marine organisms to toxic chemicals. *Biomarkers of Environmental Contamination*, 355–394. <https://doi.org/10.1201/9781351070263>
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLOS Computational Biology*, 13(5), e1005457. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005457>
- Martinsohn, J. T., & Ogden, R. (2009). FishPopTrace-Developing SNP-based population genetic assignment methods to investigate illegal fishing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 294–296. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGSS.2009.08.108>
- Mastrochirico-Filho, V. A., Hata, M. E., Sato, L. S., Jorge, P. H., Foresti, F., Rodriguez, M. V., Martínez, P., Porto-Foresti, F., & Hashimoto, D. T. (2016). SNP discovery from liver transcriptome in the fish *Piaractus mesopotamicus*. *Conservation Genetics Resources* 2016 8:2, 8(2), 109–114. <https://doi.org/10.1007/S12686-016-0521-3>
- McCarthy, J. F., & Shugart, L. R. (2019). Biological Markers of Environmental Contamination. *Biomarkers of Environmental Contamination*, 3–14. <https://doi.org/10.1201/9781351070263>
- Poćwierz-Kotus, A., Kijewska, A., Petereit, C., Bernaś, R., Wi caszek, B., Arnyasi, M., Lien, S., Kent, M. P., & Wenne, R. (2015). Genetic differentiation of brackish water populations of cod *Gadus morhua* in the southern Baltic, inferred from genotyping using SNP-arrays. *Marine Genomics*, 19, 17–22. <https://doi.org/10.1016/J.MARGEN.2014.05.010>
- Rajora, O. P. (n.d.). *Population genomics : concepts, approaches and applications*.
- Ransberry, V. E., Morash, A. J., Blewett, T. A., Wood, C. M., & McClelland, G. B. (2015). Oxidative stress and metabolic responses to copper in freshwater- and seawater-acclimated killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology*, 161, 242–252. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2015.02.013>
- Rossi, A., Bacchetta, C., & Cazenave, J. (2017). Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). *Ecological Indicators*, 79, 361–370. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2017.04.042>
- Rosso, J. J., Rueda, E. C., Sanchez, S., Bruno, M. C., Casciotta, J., Aguilera, G., Almirón, A. E., Ruiz Díaz, F. J., Cancino, D. F., Bugeau, B., Mabrugaña, E., González-Castro, M., Delpiani, M., & Díaz de Astarloa, J. M. (2018). Basin-scale distribution and haplotype partitioning in different genetic lineages of the Neotropical migratory fish *Salminus brasiliensis*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(2), 444–456. <https://doi.org/10.1002/aqc.2830>
- Rueda, E. C., Carriquiriborde, P., Monzón, A. M., Somoza, G. M., & Ortí, G. (2013). Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. *Genetica*, 141(7–9). <https://doi.org/10.1007/s10709-013-9739-0>
- Rueda, E. C., Mullaney, K. A., & Ortí, G. (2016). Displacement of native Patagonian freshwater silverside populations (*Odontesthes hatcheri*, Atherinopsidae) by introgressive hybridization with introduced. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1295-y>
- Vignal, A., & Eory, L. (2019). Avian Genomics in Animal Breeding and the End of the Model Organism. *Avian Genomics in Ecology and Evolution*, 21–67. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16477-5_3
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 2008 10:1, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wenne, R., Drywa, A., Kent, M., Sundsaasen, K. K., & Lien, S. (2016). SNP Arrays for Species Identification in Salmonids. *Methods in Molecular Biology*, 1452, 97–111. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3774-5_6

PID 6177

Denominación del Proyecto

Identificación de genes a partir de transcriptomas en peces de extensivo uso comercial. Aplicaciones para la acuicultura.

Directora

Eva Carolina Rueda

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Ingeniería -UNER

Cátedra/s, área o disciplina científica

Genética

Contacto

eva.rueda@uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Becarios: Cabrera, Juan Manuel y Elías, Darío Ezequiel.

Integrante externo: Carla Bacchetta (investigadora adjunta CONICET – Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL)

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

15/03/2018 y 15/12/2021

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 351/21 (15/12/2021)