

INTERCIENCIA

Revista de Ciencia y Tecnología de América

Interciencia

Asociación Interciencia

interciencia@ivic.ve

ISSN (Versión impresa): 0378-1844

VENEZUELA

2006

Karla Montaña Pérez / Enrique Villalpando Canchola / Francisco Vargas Albores
AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) Y SU APLICACIÓN EN
ACUICULTURA

Interciencia, agosto, año/vol. 31, número 008

Asociación Interciencia

Caracas, Venezuela

pp. 563-569

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Universidad Autónoma del Estado de México


LA MEMORIA CIENTÍFICA EN LÍNEA
<http://redalyc.uaemex.mx>

AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) Y SU APLICACIÓN EN ACUICULTURA

KARLA MONTAÑO-PÉREZ, ENRIQUE VILLALPANDO-CANCHOLA
y FRANCISCO VARGAS-ALBORES

RESUMEN

La acuicultura, como actividad económica en crecimiento, requiere el empleo de técnicas y estrategias que le permitan solucionar problemas para ser eficiente. Dentro del contexto de mejoramiento genético de los organismos cultivables, se requiere de la selección de organismos reproductores que posean las mejores características en tasa de crecimiento, de conversión alimenticia y de resistencia a enfermedades, entre otras. Hoy en día se dispone de la metodología que permite identificar a nivel genómico las características requeridas para seleccionar a los mejores pies de cría, además de determinar la diversidad gené-

tica entre familias y poblaciones, establecer líneas de pedigrí y determinar paternidad. La técnica denominada AFLP (amplified fragment length polymorphism) ha sido exitosa para generar marcadores moleculares que son aplicados en estudios genéticos en una amplia gama de disciplinas, incluyendo genómica de organismos cultivables, donde ha aportado importantes avances para la domesticación de especies acuícolas. Este trabajo revisa los hallazgos y usos más relevantes de la aplicación de AFLP en acuicultura.

Introducción

La acuicultura es una actividad económica que, en las últimas décadas, se ha expandido, diversificado e intensificado, logrando e incluyendo avances tecnológicos. De acuerdo a las estadísticas de la FAO (2004), la contribución de la acuicultura en el mercado de productos acuícolas se ha incrementado del 3,9% en 1970 al 29,9% en 2002. Esto significa una producción mundial de 51,4 millones de toneladas, con valor de más de 60 billones de USD. Esta rápida expansión ha colocado a la acuicultura, dentro de los sectores productivos de alimentos de origen animal, como una de las ramas con mayor crecimiento.

Como se puede apreciar en la Tabla I y en la Figura 1, la mayor

parte de la producción acuícola esta representada por peces, crustáceos y moluscos de agua dulce (57,7% en cantidad y 48,4% en valor); seguida por la maricultura que contribuye con 36,5% de la producción y 35,7% del valor total. Aunque la producción por acuicultura de agua salobre solo representa 5,8% del volumen, aporta casi el 16% del valor total y esta constituida principalmente por crustáceos y peces (FAO, 2004). Debido a su importancia económica, principalmente para países en vías de desarrollo, se ha enfatizado en la necesidad de que el sector acuícola continúe desarrollándose y alcance su máximo potencial en un esquema sustentable y sostenible, como se menciona en el Documento de Bangkok de la Declaración y Estrategias para el Desarrollo de la Acuicultura mas allá del 2000 (NACA/FAO, 2000).

Como todas las industrias, para lograr rentabilidad la acuicultura busca una mayor producción a menor costo y minimizar los factores de riesgo. El mayor riesgo que la acuicultura tiene es la diseminación y brotes de enfermedades, facilitado en gran parte por la introducción de especies exóticas y por el traslado de animales sin las precauciones adecuadas. Al igual que en la ganadería, también se buscan organismos con alto rendimiento, mejor asimilación de nutrientes, y que sea menos sensible a cambios ambientales y situaciones de manejo. Esto ha propiciado, por un lado, la búsqueda de mejores alimentos y de técnicas para la detección y control de patógenos. Por otro lado, se está utilizando la selección y el mejoramiento genético con la intención de producir organismos con mejores rendimientos y con una

PALABRAS CLAVE / Marcadores Moleculares / Mejoramiento Genético / Polimorfismo / QTL /

Recibido: 26/08/2005. Aceptado: 07/07/2006.

Karla Montaña-Pérez. Licenciatura, Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey. Maestría y Doctorado en Biotecnología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Hermosillo, México. Investigadora, Acualarvas, S.A. Huatambito, Sonora, México. e-mail: kmontanop@gmail.com

Enrique Villalpando-Canchola. Licenciatura, Maestría y estudiante de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. Investigador, CIAD, Hermosillo, México. e-mail: evillal@cascabel.ciad.mx

Francisco Vargas-Albores. Licenciatura, Maestría y Doctorado, UNAM, México. Profesor Investigador, CIAD, México. Dirección: CIAD. PO Box 1735; Hermosillo, Sonora 83000, México. email: fvargas@cascabel.ciad.mx

TABLA I
MUESTRA LAS PRINCIPALES FAMILIAS DE PECES CULTIVABLES
Y SUS RESPECTIVOS HABITATS

Familia	Nombre científico	Nombre común	Medio ambiente		
			Agua dulce	Agua salobre	Marino
Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i>	Anguila japonesa			
Chanidae	<i>Chanos chanos</i>	Sabalote	X	X	X
Cyprinidae	<i>Aristichthys nobilis</i>	Carpa cabezona	X	X	
	<i>Parabramis pekinensis</i>	Brema blanca	X	X	
	<i>Catla catla</i>	Catla	X		
	<i>Labeo rohita</i>	Rohu	X		
	<i>Carassius carassius</i>	Carpín	X		
	<i>Cirrhinus molitorella</i>	Carpa de lodo	X		
	<i>Cirrhinus mrigala</i>	Carpa Mrigal	X		
	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Carpa herbívora	X		
	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común	X		
	<i>Mylopharyngodon piceus</i>	Carpa negra			
	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Carpa plateada	X		
	Ictaluridae	<i>Ictalurus punctatus</i>	Bagre de canal	X	
Cichlidae	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia nilótica	X	X	
Carangidae	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Japanese amberjack			X
Salmonidae	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmón Coho	X	X	X
	<i>Oncorhynchus mykiss*</i>	Trucha arcoiris	X	X	X
	<i>Salmo salar</i>	Salmón del Atlántico	X	X	X
Serranidae	<i>Sineperca chuatsi</i>	Pez Mandarín			X

Fuentes: FAO, 2004; Garibaldi, 1996.

mayor resistencia a enfermedades y otros factores estresantes. La introducción de técnicas moleculares, incluyendo la técnica denominada AFLP, acrónimo del inglés por *amplified fragment length polymorphism*, ha contribuido al incremento en producción acuícola a nivel mundial. La habilidad para identificar genes relevantes para un fenotipo de interés ha abierto grandes posibilidades en la biotecnología acuícola, incluyendo mejoramiento en las tazas de crecimiento y efectividad en costo, aumentando la resistencia a estresantes y patógenos, y mejo-

rando la calidad de los pies de cría (Melamed *et al.*, 2002).

Selección Genética

La selección artificial, tanto de plantas como animales de importancia comercial, ha contribuido en gran medida a incrementar los índices de productividad en los últimos 50 años. Sin embargo, la mayor parte de la selección se había realizado, casi exclusivamente, con base en las características observables, sin conocimiento de la arquitectura genética de los rasgos elegidos (Erickson *et al.*, 2004). Es decir, sin conocer la secuencia del gen, modo de acción, grado de dominancia, epistasis (cómo es afectado por otros rasgos) y pleiotropía (si afecta a otros rasgos). En ausencia de cualquier dato molecular, las cruza dentro de los programas de mejoramiento genético o producción de híbridos se basaron en ensayos extensivos de prueba y error. Aunque se consiguieron avances importantes, la optimización de la especie como producto alimentario tomó mucho tiempo, ya que solamente se consideraban características morfológicas, grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos (alozimas).

Hoy en día, casi toda la agricultura se realiza con líneas de plantas que han sido genéticamente modificadas para mejorar su desempeño comer-

cial, y por lo general tienen poca similitud con sus ancestros. Esto mismo está ocurriendo en la ganadería, logrando animales con alto rendimiento. Sin embargo, pocas de estas metodologías han sido aplicadas a especies acuícolas. Para mantener la competitividad la acuicultura debe lograr, a corto plazo, la domesticación de especies, donde la aplicación de la genética y sus herramientas puede acelerar el proceso al basar la selección de los organismos aptos para cultivo en sus verdaderas capacidades heredables. Así, con el mejoramiento genético se busca mayor eficiencia en la producción, calidad del producto, disponibilidad y reducción de costos (Davis y Hetzel, 2000).

Actualmente, la genómica se aplica para discernir la naturaleza genética (heredabilidad, varianza y correlaciones) de los rasgos deseables mediante la identificación de genes o regiones cromosomales que directamente influyen sobre dichas características (Dekkers y Hospital, 2002). Se están llevando a cabo estudios para encontrar estos loci polimórficos y usarlos como marcadores en la selección de organismos reproductores, que permitan apoyar a los programas tradicionales de selección y cruza. El desarrollo de marcadores moleculares ha tenido un impacto revolucionario en la genética animal permitiendo un rápido progreso en trabajos sobre variabilidad y cruzamiento, identificación de parentesco, de especies y líneas y construcción de mapas genómicos de especies acuáticas. Estos estudios, a su vez, aceleran la identificación de genes involucrados en un rasgo característico de interés, los QTLs (de *quantitative trait locus*), para que la selección de los progenitores sea asistida por marcadores moleculares (Liu y Cordes, 2004; Masojc, 2002).

La selección asistida por marcadores (MAS, de *marker-assisted selection*) podría incrementar en más del 20% la producción en los siguientes 2-3 años (Fjalestad *et al.*, 2003; Schrooten *et al.*, 2005). Este incremento se puede deber a una mayor resistencia y mejor salud de los organismos, a la capacidad de tener rápido crecimiento o por una combinación de ambos atributos.

Marcadores moleculares

Todos los organismos están sujetos a presentar mutaciones como resultado de las funciones normales de las células o por interacciones con el medio, incluyendo enfermedades, parásitos, competidores, predadores, contaminación, cambios climáticos, radiación solar y cósmica. Como consecuencia, van surgiendo diferencias entre individuos, lo que a nivel

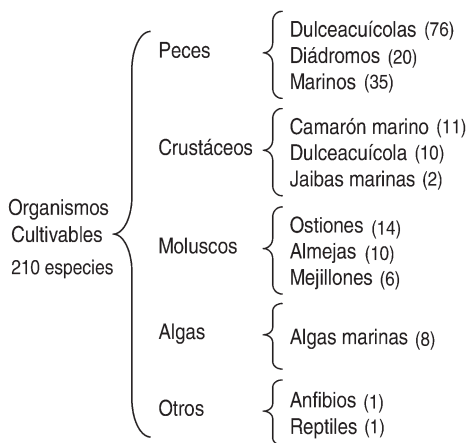


Figura 1. Número de especies cultivables de diferentes grupos de organismos.
Fuentes: FAO, 2004; Garibaldi, 1996.

molecular repercute en una variación génica o polimorfismo (Frankham, 2003). Muchas, posiblemente la mayoría, de estas mutaciones se localizan en las partes no funcionales del genoma, es decir, no pueden ser reveladas por la secuenciación de la proteína codificada, por lo que tienen que ser reveladas como marcadores moleculares, más que como isoformas de la proteína. Los buenos marcadores son aquellos que, en la misma región del genoma, muestran variación entre organismos de la misma especie. Esto permite determinar diversidad entre familias y poblaciones; establecer líneas de pedigrí; servir como base para la identificación de especies, cepas, híbridos y recursos genéticos; establecer paternidad y realizar el mapeo genómico aplicable en genética de poblaciones, biología evolutiva, ecología molecular y genética conservacionista, entre otros (Liu y Cordes, 2004).

Existen varias técnicas para definir marcadores moleculares y detectar polimorfismos, pero ninguna de ellas es ideal. Por ello, se debe tomar en cuenta la finalidad y la resolución genética deseada, así como los costos, antes de elegir una técnica (Müller y Wolfenbarger, 1999). Entre las técnicas más utilizadas en la última década están los microsatélites o SSR (*simple sequence repeat*), las amplificaciones al azar de ADN polimórfico ó RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción ó RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) y el polimorfismo del largo del fragmento amplificado o AFLP.

Los microsatélites son repeticiones de secuencias nucleotídicas cortas, no codificantes y al variar el número de repeticiones dan origen a variantes (alelos) dentro de una población. Los microsatélites han sido ampliamente utilizados, ya que son muy informativos y, como son heredados en forma mendeliana, son capaces de seguir la segregación de loci genéticos multialélicos en diferentes cruces. Los microsatélites han sido empleados en estudios de mapeo, genética de poblaciones y pruebas de paternidad. Sin embargo, el desarrollo de marcadores microsatélites es un proceso costoso basado en secuenciación y diseño de *primers* específicos para cada locus. Además, se requiere tener información, generalmente la secuencia completa, de la región genómica donde se localiza el microsatélite.

Los marcadores generados por RAPD también han sido muy utilizados. La técnica se basa en amplificaciones por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de *polimerase chain reaction*), de ADN genómico utilizando

primers o iniciadores arbitrarios, en condiciones de baja astringencia. Es una técnica simple, no requiere un conocimiento previo del genoma, es relativamente barata y ha tenido muchas aplicaciones (Chong *et al.*, 2000). Sin embargo, la técnica es muy sensible a cambios pequeños en las condiciones de amplificación, lo que ocasiona problemas en su reproducibilidad. Además, solamente detecta los polimorfismos dominantes y la información obtenida es limitada. Por otro lado, posiblemente menos utilizados, los marcadores RFLP se obtienen al digerir el ADN (genómico o mitocondrial) con enzimas de restricción, las cuales cortan

en sitios con una secuencia específica. Si existen modificaciones en la secuencia del ADN se apreciarán cambios en el número y tamaño de los fragmentos generados, como resultado de la desaparición o aparición de nuevos sitios de corte. La presencia y tamaño de los fragmentos se puede determinar por hibridación con una sonda (*probe*) marcada o amplificando la región de interés por PCR utilizando *primers* específicos. (Dodgson *et al.*, 1997; Klinbunga *et al.*, 2001)

La AFLP aparece como una nueva estrategia para la generación de marcadores moleculares relativamente barata, sencilla, rápida y confiable. Por ello se ha convertido en la herramienta molecular más adecuada para establecer la huella génica de cualquier origen o complejidad, analizando simultáneamente muchos loci y detectando un mayor número de marcadores de ADN polimórfico que cualquier otro medio basado en la PCR. La técnica de AFLP detecta los cambios de tamaño de las distintas regiones o loci en el genoma y no se requiere conocer la secuencia de éste. Debido a que estos marcadores se generan en condiciones de alta selectividad (astringencia) es menos probable que se presenten falsos positivos, como los generados fre-

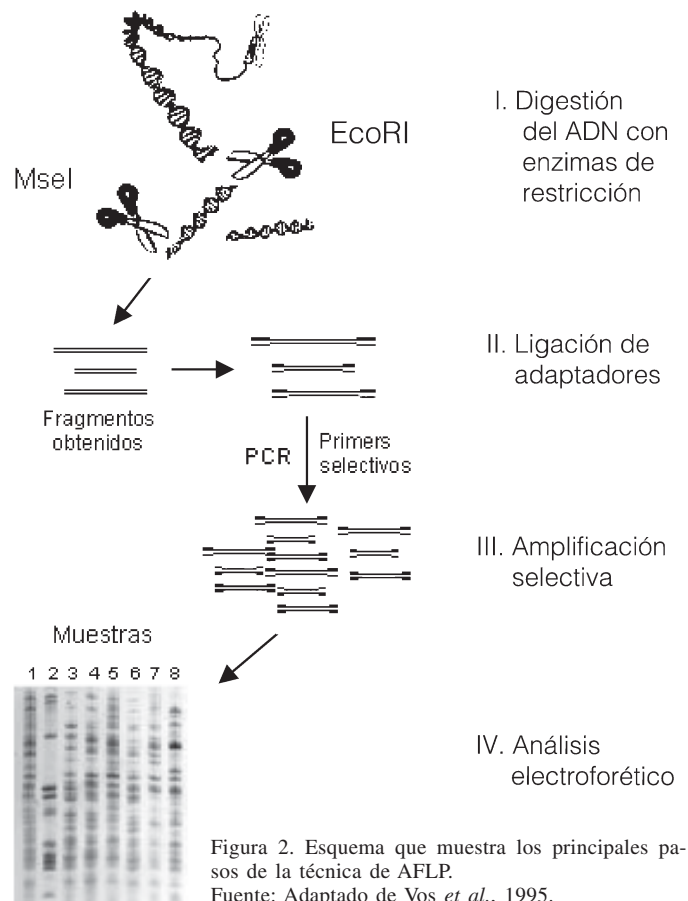


Figura 2. Esquema que muestra los principales pasos de la técnica de AFLP. Fuente: Adaptado de Vos *et al.*, 1995.

cuentemente por RAPD-PCR, por ejemplo. Básicamente la técnica consta de la digestión parcial del ADN utilizando enzimas de restricción. A los fragmentos se les unen en cada extremo adaptadores complementarios y posteriormente se amplifican por PCR y los productos son separados por tamaños utilizando electroforesis (Figura 2).

Por ello, la AFLP ha encontrado mucha aplicación en el monitoreo de heredabilidad de características deseables tanto en plantas como animales, diagnóstico de enfermedades hereditarias, análisis de pedigríes, tipificación forense, análisis de paternidad, monitoreo de poblaciones silvestres, identificación de familias, medición de variabilidad genética, construcción de mapas genéticos (localización genes en los cromosomas), búsqueda de marcadores de ADN ligados a rasgos genéticos y tipificación microbiana, entre otros. La única desventaja de AFLP es la dificultad que tiene para discernir co-dominancia. Es decir, un locus homocigoto (AA) y uno heterocigoto (Aa) pueden verse iguales, ya que A es amplificado y se aprecia una banda en ambos casos. Para poder distinguirlos se requiere un equipo altamente sensible y/o software especializado (Moen *et al.*, 2004c).

Marcadores AFLP

Por su alto grado de resolución, versatilidad y reproducibilidad, así como su costo relativamente bajo, los marcadores moleculares generados por AFLP están siendo empleados con mayor frecuencia en diversas áreas, incluyendo estudios sistemáticos, tipificación, genética de poblaciones, huella genética y mapeo de rasgos cuantitativos o fenotípicos (QTL).

El método de AFLP se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN genómico digerido con enzimas (Figura 2). En forma general, el ADN genómico es incubado con dos endonucleasas o enzimas de restricción que producen fragmentos de diferentes tamaños. Para AFLP, por un lado, comúnmente se usan *EcoRI*, *AseI*, *HindIII*, *ApaI* y *PstI*, las cuales requieren 6-8 bases en secuencia específica para poder hidrolizar, lo que genera fragmentos muy grandes debido a la baja frecuencia de estos sitios de corte. Para aumentar el número de cortes, por otro lado, la digestión se lleva a cabo en combinación con otra enzima (*MseI* ó *TaqI*) que solamente necesita 4 bases y que, por lo tanto, genera mayor número de fragmentos. En ambos casos, las enzimas tienen alta especificidad, garantizando la reproducibilidad del patrón de fragmentos de ADN.

A los fragmentos generados se les acopla unos "adaptadores" (oligonucleótidos sintéticos) de doble cadena, de 10-30pb, en los extremos, utilizando la enzima T4 ADN ligasa. Estos "adaptadores" de secuencia conocida, son utilizados para la amplificación por PCR, utilizando *primers* complementarios. Los *primers* contienen además una extensión de 1 a 3 nucleótidos en el extremo 3' y, si es necesario para su detección, una marca radioactiva o fluorescente. Con estos *primers*, solamente se amplificarán los fragmentos que contengan los nucleótidos extras, además de aquellos del "adaptador". Esto permite llevar a cabo la amplificación bajo condiciones astringentes, dándole selectividad y reproducibilidad al método. Los productos amplificados son separados en un gel de poliacrilamida y el polimorfismo se identifica por la presencia o ausencia de una banda determinada (Vos *et al.*, 1995).

Aunque existe una correlación casi lineal entre el número de fragmentos amplificados y el tamaño del genoma (Vos *et al.*, 1995), también influye la complejidad de éste, las enzimas seleccionadas y el número y tipo de nucleótidos selectivos de los *primers*. La técnica permite probar diferentes *primers* que se diferencian solamente por los

nucleótidos extras del extremo 3', los cuales dan diferente número de bandas. En algunos casos el número de bandas es muy grande y no permite el análisis, o no es confiable. Por eso, se ha propuesto que lo ideal es amplificar entre 50 y 100 fragmentos por cada juego de *primers* (Bleas *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 1995).

AFLP en Acuicultura

Dos retos muy importantes en la producción acuícola son reducir el impacto de las enfermedades y mejorar la tasa de conversión alimenticia. Es por eso que los genetistas actualmente trabajan en determinar la arquitectura genética de los rasgos de resistencia a enfermedades o de conversión alimentaria. Dentro de sus ventajas y aplicaciones, los marcadores moleculares generados por AFLP se han utilizado para identificar los genes que codifican para una característica deseable o QTL (*qualitative trait locus*) y tomarlos como indicadores para programas de mejoramiento genético (Hulata, 2001). Por otro lado, muchas de las especies cultivables no solo son estudiadas por la producción de alimentos, sino que además se están utilizando como modelo de investigación en desarrollo, reproducción, evolución, ecología, inmunología, etc., donde los AFLP son ampliamente utilizados.

En peces

Los peces son posiblemente los organismos cultivables de mayor importancia en la industria alimentaria, con una producción mundial de 41,9 millones de toneladas en 2003 (FAO, 2004), por lo que su estudio se ha intensificado. Dentro de los peces de cultivo más estudiados están los salmónidos (trucha y salmón), tilapia, bagre, cabrilla y mero, entre otros.

Salmónidos. Salmón y trucha son especies importantes para la acuicultura comercial, tanto como alimento y como atractivo turístico y deportivo. Además, el genoma del salmón (*Salmo salar*) está siendo utilizado como un modelo para estudiar el proceso evolutivo por duplicación de genes (Ohno, 1970; Force *et al.*, 1999). Por su parte, la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) ha sido estudiada desde el punto de vista biomédico principalmente en carcinogénesis, toxicología e inmunología comparada (Thorgaard *et al.*, 2002).

Empleando AFLP se han construido mapas genéticos del salmón Atlántico (Moen *et al.*, 2004c) y se están buscando los genes que confieren resisten-

cia a la anemia del salmón (ISA) (Moen *et al.*, 2004b), un avance que incrementará el rendimiento en el cultivo de esta especie. En la trucha, AFLP se ha aplicado para construir mapas genéticos y buscar diversos QTLs (Nichols *et al.*, 2003), incluyendo los genes involucrados en la resistencia al virus de la necrosis hematopoiética (IHNV; Rodríguez *et al.*, 2004), los que controlan actividad celular asesina (*NK-like activity*; Zimmerman *et al.*, 2004), de genes involucrados en eficiencia alimenticia y crecimiento (Zimmerman y Wheeler, 2005) y de marcadores relacionados al sexo (Felip y Young, 2005). Además, se ha utilizado AFLP para el análisis de impacto ecológico en trucha arco iris, detectando biomarcadores de impacto de tóxicos y otros agentes antropogénicos (Bagley *et al.*, 2001).

Tilapia. Es una de las especies cuyo consumo ha ido aumentando rápidamente y donde la acuicultura tiene gran participación al proveer la mayor parte. Las tilapias pertenecen a la familia Cichlidae, con cerca de 3000 especies, por lo que han sido modelo para estudios evolutivos y especiación genética, entre otros (Albertson *et al.*, 2003a, b; Hofmann y Fernald, 2001). En estas especies AFLP se ha utilizado para la construcción de mapas genéticos de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*; Kocher *et al.*, 1998) y para la búsqueda de QTLs de tolerancia al frío y ganancia de peso corporal en híbridos (Moen *et al.*, 2004a). También han sido útiles para monitorear cruces entre diferentes especies con intención de obtener una tilapia mejorada, con mayor tolerancia al frío y a la salinidad (Agresti *et al.*, 2000), así como para el seguimiento de la inducción de ginogénesis (método tradicional de producción de líneas puras de peces) y para poder monitorear marcadores ligados o específicos del sexo (Ezaz *et al.*, 2004).

Bagre. Es el pez cultivado de mayor consumo en EEUU. Actualmente se realizan estudios con bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) utilizando AFLP para analizar la diversidad genética en stocks de organismos domesticados, obtención de la huella genética como criterio para selección de pies de cría y manejo para futuros análisis de interacción entre poblaciones de bagre domesticados y salvajes (Mickett *et al.*, 2003). Los marcadores AFLP también se han utilizado para construcción del mapa genético (Liu *et al.*, 2003) y análisis genético del bagre de canal y del

bagre azul (*I. furcatus*) y de sus híbridos (Liu *et al.*, 1998). Los AFLP también se han empleado para la construcción del mapa genético del bagre caminador (*Clarias macrocephalus*; Poompuang y Na-Nakorn, 2004) y del bagre de río malayo (*Mystus nemurus*), y para determinar la variación genética entre 5 poblaciones silvestres (Chong *et al.*, 2000).

Cabrilla y Mero. El cultivo de estas especies alcanza gran éxito en EEUU y Australia, sobresaliendo la cabrilla rayada (*Morone saxatilis*), la lobina blanca (*M. chrysops*) y sus híbridos, preferidos para el cultivo comercial. Estas especies han sido utilizadas como modelos en estudios inmunológicos (Gauthier *et al.*, 2003), de respuesta a contaminantes ambientales (Regala y Rice, 2004) y en fisiología reproductiva (Hiramatsu *et al.*, 2004), entre otros. En estas especies se ha utilizado AFLP para verificación de ginogénesis (Felip *et al.*, 2000) y para detectar variación genética en los géneros *Morone* y *Thunnus* (Han y Ely, 2002).

Otros peces. El pez arowana asiático (*Scleropages formosus*), también llamado pez dragón, es una especie de ornato que está altamente amenazada. Mediante AFLP se ha estudiado la diversidad genética y estructura de población en tres reservas de animales en cautiverio, con miras a un programa de cría con fines de conservación y repoblación (Yue *et al.*, 2004). Los AFLP también se han usado en estudios filogenéticos en anguila eléctrica africana (Mormyroidea; Sullivan *et al.*, 2005).

En crustáceos

Sin lugar a dudas, el camarón es el crustáceo que más se cultiva. La camaronicultura aporta más del 30% del volumen de camarón consumido mundialmente. Sin embargo, esta industria adolece de cuantiosas pérdidas debido a la diseminación de patógenos como los virus de la Mancha Blanca (WSSV), Cabeza Amarilla (YHV) y Taura (TSV). Esto ha hecho necesario conocer la relación entre el camarón, el medio ambiente marino y los patógenos emergentes. Dado que tiene un sistema inmune (Montañó-Pérez *et al.*, 2005) y respuestas antivirales innatas (Robalino *et al.*, 2004), se ha propuesto el desarrollo de herramientas genéticas aplicables a estudios de salud y enfermedad del camarón. Existen técnicas moleculares para reconocimiento y control de enfermeda-

des, así como para el control efectivo de la reproducción y el desarrollo de líneas resistentes domesticadas (Benzie, 1998).

Los AFLP han sido muy útiles en camaronicultura (Montañó-Pérez *et al.*, 2004) para establecer pedrigies, construcción de mapas genéticos e identificación de QTLs que influyen rasgos comerciales específicos, como se ha realizado en *Penaeus japonicus* (Moore *et al.*, 1999); para mapeo genómico de *P. monodon* (Wilson *et al.*, 2002), *P. japonicus* (Li *et al.*, 2003), mapa de genes ligados al sexo en *L. vannamei* (Pérez *et al.*, 2004) y selección de reproductores en *P. chinensis* (Zhang *et al.*, 2004), y para identificación y estudios filogenéticos de 6 especies de camarones penidos (Wang *et al.*, 2004). Los marcadores AFLP también se han aplicado para estudiar otros crustáceos relacionados con la camaronicultura; como es el caso de la búsqueda de diversidad y diferenciación genética en especies de *Artemia* (Sun *et al.*, 1999), cangrejos comestibles (Gómez-Uchida *et al.*, 2003) y langostinos (Fetzner y Crandall, 1999). En el mismo contexto, los AFLP se han utilizado para la tipificación de bacterias, lográndose diferenciar las que actúan como probióticos y aquellas que son patógenos para el camarón (Vandenbergh *et al.*, 1998, 1999). Además, el método ha sido aplicado para la identificación de nuevas especies de *Vibrio* (Thompson *et al.*, 2003).

Moluscos

Entre los moluscos más cultivados están el ostión del Este (*Crassostrea virginica*) y del Pacífico (*C. gigas*), los cuales, además del interés comercial, son objetos de estudio en aspectos evolutivos y reproductivos. Estos organismos también tienen un importante papel ecológico en los ambientes costeros y estuarios que rápidamente se han ido degradando.

Los AFLP se han aplicado para la construcción del mapa genómico de los ostiones *C. gigas* y *C. virginica* (Yu y Guo, 2003) y de la almeja china *Chlamys farreri*. Estos mapas son de utilidad en los programas de selección de reproductores (Li *et al.*, 2005) y específicamente se están utilizando en el análisis genético de líneas selectas de *C. virginica* (Yu y Guo, 2004). Por otro lado, también utilizando AFLP, se determinó el origen y el vector de invasión del mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*),

considerado nocivo e introducido en aguas irlandesas (Pollux *et al.*, 2003).

Perspectivas

Para mantener sus ventajas productivas y ser competitiva, la acuicultura deberá aplicar y mantener programas de mejoramiento genético, principalmente asistida con marcadores moleculares ya que, en los próximos 30 años, la presión se intensificará por varias razones:

- El crecimiento poblacional demandará más de lo que las pesquerías podrán satisfacer. La pesca oceánica se ha estabilizado en aproximadamente 100 millones de toneladas al año, por lo que los volúmenes demandados deberán ser satisfechos por la acuicultura.

- Los sistemas acuícolas que manejan organismos silvestres de linaje desconocido reportan mayores pérdidas económicas por brotes epidémicos. La solución que se ha propuesto es el desarrollo de cepas genéticamente resistentes a patógenos o con mayor resistencia.

- El crecimiento de la producción se verá enfocado a la intensificación dada por la eficiencia en la producción por unidad de área y no al incremento de las áreas de producción. Mediante el mejoramiento genético se logran producir animales domesticados con mejor desempeño en el cultivo.

Así, el mejoramiento genético a través de la cruce selectiva brinda la capacidad de cultivar una mejor calidad de organismos en menor tiempo, con mayor supervivencia y el menor costo. En este contexto, el uso de AFLP como herramienta molecular ha demostrado sus ventajas, y su aplicación permitirá lograr estos objetivos en menor tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), la Secretaría de Economía del Gobierno del Estado de Sonora y la empresa Acualarvas, S.A., a través del proyecto SON-2004-C03-021.

REFERENCIAS

Agresti JJ, Seki S, Cnaani A, Poompuang S, Hallerman EM, Umiel N, Hulata G, Gall GAE, May B (2000) Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture* 185: 43-56.

- Albertson RC, Streelman JT, Kocher TD (2003a) Directional selection has shaped the oral jaws of Lake Malawi cichlid fishes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100: 5252-5257.
- Albertson RC, Streelman JT, Kocher TD (2003b) Genetic basis of adaptive shape differences in the cichlid head. *J. Heredity* 94: 291-301.
- Bagley MJ, Anderson SL, May B (2001) Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints. *Ecotoxicology* 10: 239-244.
- Benzie JAH (1998) Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture* 164: 23-47.
- Blears MJ, De Grandis SA, Lee H, Trevors JT (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 99-114.
- Chong LK, Tan SG, Yusoff K, Siraj SS (2000) Identification and characterization of Malaysian River catfish, *Mystus nemurus* (C&V): RAPD and AFLP analysis. *Biochem. Genet.* 38: 63-76.
- Davis GP, Hetzel DJS (2000) Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. *Aquacult. Res.* 31: 3-10.
- Dekkers JCM, Hospital F (2002) The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Rev. Genet.* 3: 22-32.
- FAO (2004) *The state of the world fisheries and aquaculture*. FAO Fisheries Department. Roma, Italia. 185 pp.
- Dodgson JB, Cheng HH, Okimoto R (1997) DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Sci.* 76: 108-1114.
- Erickson DL, Fenster CB, Stenøien HK, Price D (2004) Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. *Mol. Ecol.* 13: 2505-2522.
- Ezaz MT, Harvey SC, Boonphakdee C, Teale AJ, McAndrew BJ, Penman DJ (2004) Isolation and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Mar. Biotechnol.* 6: 435-445.
- Felip K, Young WP (2005) An AFLP approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 247: 35-43.
- Felip A, Martínez-Rodríguez G, Piferrer F, Carrillo M, Zanuy S (2000) AFLP analysis confirms exclusive maternal genomic contribution of meiotogonetic sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Mar. Biotechnol.* 2: 301-306.
- Fetzner JW, Crandall KA (1999) Genetic variability within and among populations of the golden crayfish (*Orconectes luteus*) determined using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Freshwat. Crayfish* 12: 396-412.
- Fjalestad KT, Moen T, Gómez-Raya L (2003) Prospects for genetic technology in salmon breeding programmes. *Aquacult. Res.* 34: 397-406.
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan UL, Postlethwait J (1999) Preservation in duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531-1545.
- Frankham R (2003) Genetics and conservation biology. *Comp. Rend. Biol.* 326: 22-29.
- Garibaldi L (1996) *List of Animal Species Used in Aquaculture*. FAO Fisheries Circular 914. Roma, Italia. 38pp.
- Gauthier DT, Rhodes MW, Vogelbein WK, Kator H, Ottinger CA (2003) Experimental mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis*. *Dis. Aquat. Org.* 54: 105-117.
- Gómez-Uchida D, Weetman D, Hauser L, Galleguillos R, Retamal M (2003) Allozyme and AFLP analyses of genetic population structure in the hairy edible crab *Cancer setosus* from the Chilean Coast. *J. Crust. Biol.* 23: 486-494.
- Han K, Ely B (2002) Use of AFLP analyses to assess genetic variation in *Morone* and *Thunnus* species. *Mar. Biotechnol.* 4: 141-145.
- Hiramatsu N, Chapman RW, Lindzey JK, Haynes MR, Sullivan CV (2004) Molecular characterization and expression of vitellogenin receptor from white perch (*Morone americana*). *Biol. Reprod.* 70: 1720-1730.
- Hofmann HA, Fernald RD (2001) What cichlids tell us about the social regulation of brain and behavior. *J. Aquaricult. Aquat. Sci.* 9: 1-15.
- Hulata G (2001) Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetics* 111: 155-173.
- Klinbunga S, Siludjai D, Wudthijinda W, Tassanakajon A, Jarayabhand P, Menasveta P (2001) Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. *Mar. Biotechnol.* 3: 428-438.
- Kocher TD, Lee W-J, Sobolewska H, Penman D, McAndrew B (1998) A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148: 1225-1232.
- Li L, Xiang J, Liu X, Zhang Y, Dong B, Zhang X (2005) Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. *Aquaculture* 245: 63-73.
- Li Y, Byrne K, Miggiano E, Whan V, Moore S, Keys S, Crocos P, Preston N, Lehnert S (2003) Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture* 219: 143-156.
- Liu ZJ, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Liu ZJ, Nichols A, Dunham RA (1998) Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids. *Mol. Gen. Genet.* 258: 260-268.
- Liu ZJ, Karsi A, Li P, Cao D, Dunham R (2003) An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. *Genetics* 165: 687-694.
- Masoje P (2002) The application of molecular markers in the process of selection. *Cel. Mol. Biol. Lett.* 7: 499-509.
- Melamed P, Gong Z, Fletcher G, Hew CL (2002) The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture* 204: 255-269.
- Mickett K, Morton C, Feng J, Li P, Simmons M, Cao D, Dunham RA, Liu ZJ (2003) Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. *Aquaculture* 228: 91-105.
- Moen T, Agresti JJ, Cnaani A, Moses H, Famula TR, Hulata G, Gall GAE, May B (2004a) A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23. *Aquacult. Res.* 35: 893-904.
- Moen T, Fjalestad KT, Munck H, Gómez-Raya L (2004b) A multi-stage testing strategy for detection of quantitative trait loci affecting disease resistance in Atlantic salmon. *Genetics* 167: 851-858.
- Moen T, Hoyheim B, Munck H, Gómez-Raya L (2004c) A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. *Anim. Genet.* 35: 81-92.
- Montaño-Pérez K, Villalpando-Canchola E, Vargas-Albores F (2004) Ventajas del uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético en camarón. *Panorama Acuicola*: 18-22.
- Montaño-Pérez K, Gómez-Gómez A, Vargas-Albores F (2005) Different expression of *Litopenaeus vannamei* (Boone) haemocytes to *Vibrio* and abiotic particle inoculation. *Aquacult. Res.* 36: 912-919.
- Moore SS, Whan V, Davis G, Byrne K, Hetzel DJ, Preston N (1999) The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 173: 19-32.
- Müeller UG, Wolfenbarger LL (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14: 389-394.
- NACA/FAO (2000) Report of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium. En *Aquaculture in the Third Millennium*. FAO. Bangkok, Tailandia. 120 pp.
- Nichols KM, Young WP, Danzmann RG, Robison BD, Rexroad C, Noakes M, Phillips RB, Bentzen P, Spies I, Knudsen K, Allendorf FW, Cunningham BM, Brunelli J, Zhang H, Ristow S, Drew R, Brown KH, Wheeler PA, Thorgaard GH (2003) A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Genet.* 34: 102-115.
- Ohno S (1970) *Evolution by gene duplication*. Springer. Nueva York, EEUU. 160 pp.
- Pérez F, Erazo C, Zhinaula M, Volckaert F, Calderón J (2004) A sex-specific linkage map of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. *Aquaculture* 242: 105-118.
- Pollux B, Minchin D, Van Der Velde G, Van Alen T, Moon-Van Der Staay SY, Hackstein J (2003) Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in Ireland, AFLP-fingerprinting and boat traffic both indicate an origin from Britain. *Freshwat. Biol.* 48: 1127-1139.
- Poompuang S, Na-Nakorn U (2004) A preliminary genetic map of walking catfish (*Clarias macrocephalus*). *Aquaculture* 232: 195-203.

- Regala RP, Rice CD (2004) Mycobacteria, but not mercury, induces metallothionein (MT) protein in striped bass, *Morone saxatilis*, phagocytes, while both stimuli induces MT in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, phagocytes. *Mar. Envir. Res.* 58: 719-23.
- Robalino J, Browdy C, Prior S, Metz A, Parnell P, Gross P, Warr G (2004) Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.* 78: 10442-10448.
- Rodríguez MF, LaPatra S, Williams S, Famula T, May B (2004) Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. *Aquaculture* 241: 93-115.
- Schrooten C, Bovenhuis H, van Arendonk JAM, Bijma P (2005) Genetic Progress in Multi-stage Dairy Cattle Breeding Schemes Using Genetic Markers. *J. Dairy Sci.* 88: 1569-1581.
- Sullivan JP, Lavoue S, Arnegard ME, Hopkins CD (2005) AFLPs resolve phylogeny and reveal mitochondrial introgression within a species flock of african electric fish (Mormyroidae: Teleostei). *Evolution* 58: 825-841.
- Sun Y, Song W-QZ, Y-C., Zhang R-S, Abatzopoulos TJ, Chen R-Y (1999) Diversity and genetic differentiation in *Artemia* species and populations detected by AFLP markers. *International J. Salt Lake Res.* 8: 341-350.
- Thompson FL, Li Y, Gómez-Gil B, Thompson CC, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Rupp GS, Pereira A, De Bem MM, Sorgeloos P, Swings J (2003) *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov., and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 245-252.
- Thorgaard GH, Bailey GS, Williams D, Buhler DR, Kaattari SL, Ristow SS, Hansen JD, Winton JR, Bartholomew JL, Nagler JJ, Walsh PK, Vijayan MM, Devlin RH, Hardy RW, Overturf KE, Young WP, Robison BD, Rexroad C, Palti Y (2002) Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 133: 609-646.
- Vandenbergh J, Li Y, Verdonck L, Li J, Sorgeloos P, Xu HS, Swings J (1998) Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture* 169: 121-132.
- Vandenbergh J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, Rivera G, Bolland A, Balladares M, Gómez-Gil B, Calderón J, Sorgeloos P, Swings J (1999) Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl. Envir. Microbiol.* 65: 2592-2597.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijers M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Wang ZY, Tsoi KH, Chu KH (2004) Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. *Biochem. Syst. Ecol.* 32: 399-407.
- Wilson K, Li Y, Whan V, Lehnert S, Byrne K, Moore S, Pongsomboon S, Tassanakajon A, Rosenberg G, Ballment E, Fayazi F, Swan J, Kenway M, Benzie J (2002) Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. *Aquaculture* 204: 297-309.
- Yu Z, Guo X (2003) Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Biol. Bull.* 204: 327-38.
- Yu Z, Guo X (2004) Genetic analysis of selected strains of eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) using AFLP and microsatellite markers. *Mar. Biotechnol.* 6: 575-586.
- Yue GH, Li Y, Lim LC, Orban L (2004) Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. *Aquaculture* 237: 89-102.
- Zhang L, Kong X, Yu Z, Kong J, Chen L (2004) A survey of genetic changes and search for sex-specific markers by AFLP and SAMPL in a breeding program of Chinese shrimp (*Penaeus chinensis*). *J. Shellfish Res.* 23: 897-901.
- Zimmerman AM, Evenhuis JP, Thorgaard GH, Ristow SS (2004) A single major chromosomal region controls natural killer cell-like activity in rainbow trout. *Immunogenetics* 55: 825-835.
- Zimmerman AM, Wheeler PA (2005) Composite interval mapping reveals three QTL associated with pyloric caeca number in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 247: 85-95.

AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) AND ITS APPLICATION IN AQUACULTURE

Karla Montaña-Pérez, Enrique Villalpando-Canchola and Francisco Vargas-Albores

SUMMARY

Aquaculture, as a growing economical activity, requires the employment of techniques and strategies that permit to solve problems in order to be efficient. Regarding genetic improvement of aquatic species, a meticulous selection of the broodstock looking for specific traits must take place. Nowadays it is possible to identify at a genomic level the desirable broodstock traits as well as determination of the genetic diversity in and between families and populations, to establish pedi-

gree lines, and paternity tests. The technique called amplified fragment length polymorphism (AFLP) has been successfully used for the generation of genetic markers that are applied in genetic studies disciplines including genomics of aquatic species, where it has contributed in the domestication of many important species for aquaculture. The present review covers the most relevant uses and findings of AFLP in aquaculture.

AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) E SUA APLICAÇÃO EM AQUICULTURA

Karla Montaña-Pérez, Enrique Villalpando-Canchola e Francisco Vargas-Albores

RESUMO

A aqüicultura, como atividade econômica em crescimento, requer o emprego de técnicas e estratégias que lhe permitam solucionar problemas para ser eficiente. Dentro do contexto de melhoramento genético dos organismos cultiváveis, se requer da seleção de organismos reprodutores que possuam as melhores características em taxa de crescimento, de conversão alimentícia e de resistência a enfermidades, entre outras. Hoje em dia se dispõe da metodologia que permite identificar a nível genômico as características requeridas para selecionar aos melhores reprodutores, além de determinar a diversidade genética

entre famílias e populações, estabelecer linhas de pedigree e determinar paternidade. A técnica denominada AFLP (amplified fragment length polymorphism) tem sido exitosa para gerar marcadores moleculares que são aplicados em estudos genéticos em uma ampla gama de disciplinas, incluindo genômica de organismos cultiváveis, onde tem aportado importantes avanços para a domesticação de espécies aqüícolas. Este trabalho revisa as descobertas e usos mais relevantes da aplicação de AFLP em aqüicultura.