

## APLICACIÓ DE LA BIOTECNOLOGIA A L'AQÜICULTURA

FRANCESC PIFERRER,<sup>1</sup> LLUÍS TORT,<sup>2</sup> ANA GÓMEZ<sup>3</sup> I ANTONIO FIGUERAS<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Ciències del Mar, Consell Superior d'Investigacions Científiques, Barcelona.*

<sup>2</sup>*Departament de Biologia Cel·lular i de Fisiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.*

<sup>3</sup>*Institut d'Aqüicultura Torre de la Sal, Consell Superior d'Investigacions Científiques, Ribera de Cabanes, Castelló.*

<sup>4</sup>*Instituto de Investigaciones Marinas, Consell Superior d'Investigacions Científiques, Vigo.*

Adreça per a la correspondència: Francesc Piferrer. Institut de Ciències del Mar, Consell Superior d'Investigacions Científiques. Passeig Marítim, 37-49. 08003 Barcelona. Adreça electrònica: [piferrer@icm.csic.es](mailto:piferrer@icm.csic.es).

### RESUM

L'aqüicultura és cada cop més important en el proveïment de proteïna d'origen aquàtic en un món en què la pesca ha tocat sostre en el nombre de captures anuals a causa de la sobreexplotació dels oceans. A més, hi ha un augment continuat tant de la població humana com del requeriment d'aquesta proteïna d'aliments d'origen marí. En aquest context, l'aqüicultura esdevé un procés de producció d'aliments fortament tecnificat i industrialitzat. La contribució de la biotecnologia a aquest sector de l'alimentació és encara incipient però molt prometedora. Aquí es repassen les aplicacions de la biotecnologia a l'aqüicultura, algunes ja en explotació, altres encara en fase experimental. Aquestes aplicacions inclouen el control de la reproducció —selecció del sexe, producció de poliploides i línies clonals i xenotrasplantaments de la línia germinal—; el control del creixement —producció d'animals transgènics de ràpid creixement o adaptats a ambients extrems—; la prevenció de malalties —vacunes de DNA i detecció de la presència de patògens—; i el proveïment d'unes condicions de cria òptimes —monitorització de l'estat d'estrès i de les variables ambientals. Aquestes aplicacions han d'assegurar el benestar dels animals i la qualitat del producte que s'espera, tot en un context de producció sostenible i respectuosa amb el medi ambient.

**Paraules clau:** biotecnologia, aqüicultura, control de la reproducció, transgènesi, patologia i benestar animal.

## APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY TO AQUACULTURE

### SUMMARY

Aquaculture is increasingly becoming more relevant for the supply of animal protein of aquatic origin in a world where capture fisheries has reached an all-time maximum in annual landings due to overfishing of the oceans. Furthermore, there is a sustained increase in both the human population and the requirement of this population for food supplies of aquatic origin. In this context, aquaculture is becoming a food sector increasingly technified and industrialized. The contribution of biotechnology to aquaculture is still incipient but it holds a great deal of promise. Here, several applications of biotechnology to aquaculture are reviewed, some of them already being applied commercially, others still in the development phase. These applications include the control of reproduction—sex control, production of polyploids and clonal lines, and xenotransplantation of the germinal line; growth control—production of transgenics for superior growth or adapted to extreme environments—; disease prevention—DNA vaccines and pathogen detection—; and the providing of optimal growth conditions—stress and environment monitoring. These applications must ensure the welfare of the farmed animals and the quality products that one expects from aquaculture, all in a context of sustainable production respectful with the environment.

**Key words:** biotechnology, aquaculture, control of reproduction, transgenesis, pathologies and animal welfare.

### INTRODUCCIÓ

La continuada sobrepesca en els darrers decennis ha tingut com a conseqüència que actualment una bona part dels caladors estiguin esgotats o en vies d'esgotament. Això es tradueix en el fet que malgrat que cada cop l'esforç pesquer és més gran, el nombre de captures s'ha estancat en els darrers anys al voltant dels noranta-tres milions de tones, segons les darreres dades disponibles a través de la FAO ([www.fao.org](http://www.fao.org)). Paral·lelament a aquest fenomen hi ha hagut, especialment en el darrer quart de segle, l'aparició d'una aqüicultura industrial i globalitzada, amb fortes inversions de capital, que ha permès fer front a la incessant demanda de productes aquàtics a tot el món. No es pot oblidar que aproximadament una sisena part de la població humana depèn de la producció

aquàtica com a principal font de proteïnes d'origen animal. En els darrers anys, l'aqüicultura ha estat i és el sector agroalimentari amb una taxa anual de creixement més elevada. Actualment subministra ja més d'un 30 % de tota la proteïna aquàtica consumida. Segons estimacions de la FAO la producció de l'aqüicultura igualarà a la de la pesca cap a l'any 2027.

Beneficiant-se dels avenços en altres camps de la ciència i la tècnica, en els darrers anys s'ha començat a aplicar la biotecnologia a l'aqüicultura. Aquí és convenient esmentar que la FAO defineix la biotecnologia en dos sentits. En un sentit restringit, la defineix com 'un ventall de diverses tecnologies moleculars, tals com la manipulació genètica, la transgènesi i el clonatge de plantes i animals'. En un sentit més ampli, i seguint les recomanacions proposades per

la Convenció sobre la Diversitat Biològica (CBD, [www.biodiv.org](http://www.biodiv.org)), del Programa de Medi Ambient de les Nacions Unides, la defineix com 'qualsevol aplicació tecnològica que fa servir sistemes biològics, organismes vius o els seus derivats per fer o modificar processos per a usos específics'. En l'aqüicultura s'aplica el concepte de biotecnologia en aquest sentit més ampli. Tot i que en peixos s'han aplicat algunes modificacions per produir, per exemple, peixos ornamentals transgènics que poden emetre fluorescència segons amb la llum amb què s'illuminen, aquí es repassen les aplicacions biotecnològiques fonamentalment encaminades a augmentar la producció d'animals aquàtics destinats al consum humà. Aquestes aplicacions biotecnològiques incideixen en diversos aspectes del cicle productiu com són, entre d'altres, el control de la reproducció, el creixement, la prevenció de malalties i el benestar animal.

## APLICACIONS BIOTECNOLÒGIQUES PER AL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓ

L'aqüicultura moderna intensiva implica poder tancar el cicle vital d'una espècie en captivitat per independitzar-se del medi natural com a font de cries o juvenils per a l'engreix. Això possibilita poder controlar els diferents aspectes relacionats amb la producció. Aquests inclouen la gestió dels reproductors, l'obtenció de postes i cria larvària, el subministrament d'una dieta que permeti un bon creixement, la prevenció i control de les malalties i proporcionar un ambient que minimitzi l'estrès i asseguri el millor benestar possible als animals de producció. És precisament durant la reproducció que hi ha la possibilitat d'aplicar tot un reguitzell de biotecnologies per controlar-ne diversos aspectes, que van des de la inducció hormonal a la maduració i posta

dels gàmetes mitjançant l'administració d'hormones barrejades en una matriu artificial que en permet l'alliberació lenta, la criopreservació dels gàmetes, així com la generació de línies d'un sol sexe, la inducció de poliploidies i la selecció genètica ajudada per marcadors moleculars (Lee i Donaldson, 2001). De totes aquestes possibilitats, a continuació se n'escullen i comenten breument algunes, en funció del seu grau d'implantació i de les seves possibilitats futures.

### Selecció del sexe

En moltes espècies de peixos, un sexe creix significativament més que l'altre i arriba a talles més grans. Encara que hi ha espècies molt importants en el context de l'aqüicultura mundial, com ara les tilàpies (*Oreochromis* sp.), en què els mascles creixen més, és cert que per a la majoria d'espècies cultivades, com ara el salmó de l'Atlàntic (*Salmo salar*), la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*), el llobarro (*Dicentrarchus labrax*), el turbot (*Scophthalmus maximus*) i el llenguado (*Solea* sp.), són les femelles el sexe de major creixement. Això ha propiciat que s'hagin desenvolupat protocols per a la feminització de més d'una cinquantena d'espècies d'interès comercial, en què es dona el fenomen del creixement diferencial a favor de les femelles (Piferrer, 2001). Per a aquest fi es poden emprar tractaments amb esteroïdes sexuals administrats durant breus períodes a l'inici del desenvolupament, quan les gònades estan ja formades però encara sexualment indiferenciades. Amb això s'aconsegueixen peixos del sexe fenotípic que es desitja, independentment del sexe genotípic dels animals tractats. Si bé aquests tractaments directes estan perfectament regularitzats i se sap que qualsevol resta hormonal s'elimina en un termini aproximat d'unes tres setmanes després del tractament, cosa que succeeix típicament

uns 20 mesos abans de que els peixos vagin a parar als consumidors, també és cert que per evitar qualsevol tipus de rebuig dels consumidors, les empreses, almenys en el context europeu, no fan servir aquest mètode directe de feminització. Per aquest motiu, es desenvolupà el que s'anomena *mètode indirecte de feminització*, el qual només es pot aplicar en espècies que presenten un sistema de determinació sexual del tipus XX (femelles) i XY (mascles) que, tot i que és bastant comú en els peixos, no és ni molt menys l'únic que presenten (Devlin i Nagahama, 2002). En aquest cas, es comença per tractar amb andrògens un grup d'animals sexualment indiferenciats durant les etapes inicials del desenvolupament, amb la qual cosa s'aconsegueix la masculinització de tota la població. Entre els mascles presents, n'hi ha que ho haguessin estat igualment a causa de la seva constitució cromosòmica (XY), però també n'hi ha, aproximadament, la meitat, que genotípicament són femelles (XX). A aquests darrers se'ls anomena *neomasclcs*. Mitjançant un test de progènie o, en alguns casos, mitjançant l'ús de sondes moleculars específiques per a regions del cromosoma Y, es poden identificar els neomasclcs entre tots els mascles produïts. Passat un temps, quan aquests neomasclcs creixen i maduren sexualment produeixen esperma que és portador exclusiu de cromosomes X, per la qual cosa, en fer-lo servir per fecundar ous produïts per femelles normals, la descendència és exclusivament formada per femelles, tant genotípicament com fenotípicament, mai tractades amb esteroides i destinades a la producció. Actualment aquest mètode s'empra, per exemple, en la producció de salmons del Pacífic (*Oncorhynchus tshawytscha*) al Canadà o bé de truites irisades a Escòcia i França.

## Generació d'auto i alloploïdides

Un altra tècnica interessant és la generació d'animals estèrils per millorar certs aspectes de la producció. Això s'aconsegueix amb la inducció de la poliploïdia, és a dir, la producció d'animals amb un cert nombre addicional de jocs sencers de cromosomes, en lloc del nombre habitual diploide ( $2n$ ). La poliploïdia més comunament induïda és la triploïdia. Els triploïdides s'obtenen normalment mitjançant l'aplicació d'un xoc tèrmic o hidrostàtic administrat en els minuts immediatament posteriors a la fecundació dels ous, fet que impedeix l'extrusió del segon corpuscle polar de l'ou acabat de fecundar (Felip *et al.*, 2001). Els animals triploïdides ( $3n$ ) tenen tres jocs sencers de cromosomes homòlegs, cosa que no impedeix la divisió cel·lular per mitosi però sí que bloqueja la formació de gàmetes, ja que els tres jocs de cromosomes esmentats no poden aparellar-se correctament durant la profase I de la meïosi, i això atura la progressió de la línia germinal durant la gametogènesi. Com que el creixement gonadal implica una certa sincronització entre el desenvolupament de la línia germinal i la somàtica, els animals triploïdides no solament tenen un desenvolupament gonadal molt minvat en comparació del dels diploïdides, sinó que també són estèrils. Això permet un millor aprofitament de l'energia obtinguda a través de l'alimentació, ja que no han d'emprar-la per a la formació de les gònades. Per tant, amb la inducció de la triploïdia s'eliminen els problemes associats a la maduració sexual, que en molts peixos cultivats acostumen a ser un menor creixement durant l'època de posta, una major susceptibilitat a les malalties i un empobriment de la qualitat de les parts comestibles. Tal com succeeix en l'agricultura moderna, la inducció de la poliploïdia s'empra com més va més en l'aqüicultura, ja sigui per augmentar la fracció comestible, tal i com es fa amb alguns mol-

luscs com l'ostra japonesa (*Crassostrea gigas*), o bé per eliminar la maduració sexual en la truita irisada i altres peixos (Hulata, 2001). Així mateix, la inducció de la triploïdia serveix també per augmentar la viabilitat d'híbrids interespecífics que en la condició diploide presenten interessants propietats respecte a les línies parentals, però pateixen una baixa supervivència, com és el cas de l'encreuament entre el peix gat tailandès (*Clarias macrocephalus*) i el peix gat africà (*Clarias gariepinus*) (Na-Nakorn *et al.*, 2004), i s'ha proposat com a mètode per evitar l'impacte genètic dels escapaments d'animals cultivats sobre les poblacions naturals (Piferrer *et al.*, 2008).

### Producció de línies clòniques

Els mateixos xocs tèrmics o hidrostàtics emprats per induir la triploïdia s'usen també per restablir la diploïdia si l'activació dels ous s'ha realitzat amb esperma prèviament irradiat amb llum ultraviolada. D'aquesta manera s'obtenen peixos ginogenètics diploides amb un cert grau d'homozigotitat, depenent del grau de creuament entre cromàtides homòlogues durant la profase I (meioginogenètics). Si, per contra, el xoc tèrmic o hidrostàtic en ous prèviament fecundats amb esperma irradiat es dona una mica més tard, el que s'aconsegueix és permetre la duplicació cromosòmica del zigot, alhora que s'impedeix la seva primera divisió cel·lular, amb la conseqüent producció d'individus ginogenètics diploides homozigots (mitoginogenètics). La inducció de la meioginogènesi en ous produïts per femelles mitoginogenètiques dona com a resultat l'obtenció de línies clòniques. Això s'ha aconseguit en diverses espècies de peixos com ara la carpa comuna (*Cyprinus carpio*) amb l'objectiu de facilitar l'acceptació de trasplantaments (Komen *et al.*, 1991), en la palaia japonesa (*Paralichthys olivaceus*), per

ajudar en programes de selecció genètica (Yamamoto, 1999), i en el pagre (*Pagrus major*) (Kato *et al.*, 2002) i el llobarro (Bertotto *et al.*, 2005), per estudiar la seva aplicabilitat en la selecció de caràcters d'interès per a la producció.

### Xenotrasplantaments de cèl·lules de la línia germinal

El trasplantament de cèl·lules germinals és una eina potent principalment per a la recerca d'aspectes bàsics de la biologia reproductiva. En peixos s'han aconseguit darreument trasplantaments tant singènics com xenogènics (Takeuchi *et al.*, 2004). Així, s'ha aconseguit el trasplantament d'espermatozoides de tilàpia a tilàpia (gènere *Oreochromis*) i de truita a salmó. El xenotrasplantament pot ser útil per a la producció de cries d'espècies d'interès en aqüicultura o en perill d'extinció, fet que obre possibilitats interessants per al manteniment dels recursos genètics. Així, salmons del Pacífic (*Oncorhynchus masou*) prèviament esterilitzats per inducció de la triploïdia, i que actuaren de receptors, foren trasplantats mitjançant una microinjecció a la cavitat visceral d'una suspensió de cèl·lules germinals primordials obtingudes de truites (*O. mykiss*), que actuaren com a donants. Amb aquest procediment s'ha aconseguit recentment crear animals receptors xenogènics que produeixen cèl·lules germinals només de l'espècie donant (Okutsu i Yoshitaki, 2007). Això significa que les cèl·lules primordials germinals de truita van ser capaces de migrar a la cresta germinal del salmó, colonitzar-la, proliferar i diferenciar-se posteriorment en ous i esperma madurs. Això permeté l'obtenció de descendència viable pertanyent en exclusiva a l'espècie donant a partir de parets implantats, cosa que no s'havia aconseguit abans en cap altre vertebrat.

Aquesta tècnica, amb les modificacions

corresponents, pot tenir aplicacions molt interessants en peixos marins. Per exemple, podria contribuir significativament a la producció controlada de la tonyina (*Thunnus thynnus*). Actualment, la forta demanda d'aquest peix a tot al món en general i al Japó en particular, ha propiciat l'establiment de granges dedicades al seu engreix. Espanya és un dels principals llocs on es du a terme aquesta activitat nova que, per altra banda, té un impacte negatiu sobre l'ecosistema marí, ja que, a causa de la forta demanda, fomenta una sobrepesca de la tonyina a tot el Mediterrani i dels animals dels quals s'alimenta, amb el perill que això suposa per al manteniment sostenible d'un recurs tan important. Poder tancar el cicle de vida de la tonyina en captivitat facilitaria una vertadera aqüicultura, i això alleujaria la pressió sobre les poblacions naturals d'aquesta espècie. Per aconseguir això s'està treballant en el desenvolupament de tècniques per a l'obtenció controlada de gàmetes. El problema el tenim en el manteniment i maneig d'animals tan grans en instal·lacions en terra dedicades a la producció d'alevins, ja que les tonyines poden atènyer 3 m de llargada i 500 quilos de pes. Per aquest motiu ja s'està adaptant amb èxit la tècnica del trasplantament de cèl·lules germinals, originàriament desenvolupada en salmònids, en peixos marins amb ous pelàgics, concretament entre diferents gèneres de corballs (gèneres *Nibe* i *Argyosomus*). L'objectiu últim és aconseguir la producció d'ous i esperma de tonyina a partir de verats (*Scomber scombrus*). Aquests peixos, amb els quals es fan proves per trasplantar-los cèl·lules germinals de tonyina (Takeuchi *et al.*, 2007), pertanyen a la mateixa família que les tonyines (escòmbrids) però només arriben als 30 cm de llargada i, per tant, són molt més fàcils de manipular. Les possibilitats que pot oferir el xenotrasplantament de cèl·lules de la línia germinal per a la pro-

ducció i conservació d'animals marins semblen, doncs, molt prometedores.

## BIOTECNOLOGIES D'APLICACIÓ A LA SALUT I BENESTAR DELS PEIXOS

Una de les àrees relacionades amb l'aqüicultura en què s'ha incrementat de manera rellevant la demanda de biotecnologies és la de la salut i el benestar dels peixos. En els darrers anys, tant des dels organismes reguladors com dels responsables de la indústria alimentària i les cadenes de distribució, augmenta l'exigència de certificacions de procediments de benestar dels peixos, mètodes ètics de sacrifici i qualitat de les instal·lacions. Com a conseqüència, la indústria demanda als investigadors i tècnics aquelles tecnologies que permetin la monitorització dels estats d'estrès, tant pel que fa a les respostes gèniques o moleculars com en les respostes macroscòpiques immediates de comportament i rendiment.

### Indicadors de l'estat d'estrès, immunodepressió i vulnerabilitat als patògens

En l'àmbit de la biologia molecular i la genètica la irrupció de les tecnologies «òmiques» com la genòmica, la transcripciómica o la immunòmica, és molt recent en el camp de l'aqüicultura, però ha generat una entrada molt significativa de grups d'investigadors per intentar utilitzar la capacitat d'aquestes tecnologies per determinar patrons moleculars i genètics indicatius d'estats d'estrès, immunodepressió i vulnerabilitat als patògens. En aquesta direcció, el fet que espècies com el peix de l'arrossar japonès (*Oryzias latipes*), el fugu (*Tetraodon* sp.) o el peix zebra (*Danio rerio*) hagin estat adoptats com a model en els estudis biomèdics (Alestrom *et al.*, 2006), ha significat un



avantatge també per a l'estudi de la fisiologia dels peixos i les aplicacions en l'aquicultura (Blázquez *et al.*, 1998).

Dues aproximacions biotecnològiques són les que s'han desenvolupat darrerament. En primer lloc, s'han desenvolupat diferents consorcis o projectes d'àmbit europeu i americà basats primerament en la generació de genoteques de teixits de diferents espècies d'interès aquícola, amb la construcció posterior de microxips de DNA centrats en la determinació de patrons genètics d'estrès per poder-los aplicar a la detecció i predicció d'aquests estats en aquicultura. Aquesta ha semblat també una de les apostes de la Unió Europea, ja que ha posat fons a disposició dels investigadors en aquesta direcció en el sisè programa marc en diferents projectes i xarxes (Aquafirst, Eurocarp, Stressgenes, Marine Genomics, Aquafunc, Aquagenome), també relacionats amb la determinació del rendiment i el benestar dels peixos; per tant, amb l'aplicació de biotecnologies per a aquesta finalitat (Wealth, Fastfish, Ethiqua, Welfish, Benefish). D'aquests projectes, els més aplicats a l'estudi de l'estrès encara no han aconseguit avenços aplicables en la indústria, encara que sí que s'han començat a publicar resultats científics a partir d'aquests consorcis (Sarropoulou *et al.*, 2005; Douglas, 2006) o per part de grups independents (Mackenzie *et al.*, 2006). Atès que la selecció dels gens que integren el microxip és complexa i que es necessitarien diferents xips adequats a les diferents espècies aquícoles, el sector productiu de l'aquicultura haurà d'esperar un temps abans de poder utilitzar aquests instruments com a diagnòstic, com a eina analítica o com a sistema de predicció d'alteracions en els cultius.

La segona aproximació ha estat la de trobar gens específics que puguin ser indicadors de processos d'estrès, immunodepressió o de mal funcionament. De la mateixa manera que tenim alguns indicadors fisiològics com el cortisol, pel que fa a les hormones, la glucosa o l'osmolalitat, pel que fa al metabolisme, o els valors de lisozim o complement, pel que fa al sistema immunitari, s'estan buscant indicadors genètics que podrien tenir aquest poder predictiu o marcador i que es correlacionarien significativament amb estats alterats com alta densitat, infecció, etc. En aquesta direcció de recerca/descobriments de gens específics els avenços són més tangibles i ja se n'han descrit alguns com l'enolasa, les proteïnes de xoc tèrmic (HsP90 i HsP70) o el citocrom P450, que són susceptibles de marcar alteracions sota condicions molt diverses d'estrès (Ribas *et al.*, 2004; Gornati *et al.*, 2005).

**Qualitat de l'aigua i control de patògens**

En altres àmbits la biotecnologia pot aportar solucions en la qualitat de l'aigua i control de patògens. Des de la biotecnologia ambiental i la toxicològica s'estan desenvolupant sensors capaços de detectar la presència de microorganismes específics especialment patògens o virulents mitjançant microxips específics que es podrien col·locar en els punts crítics de control de l'aigua en instal·lacions d'aquicultura, principalment de recirculació o de flux d'aigua, que permetrien una detecció incipient i una reacció ràpida (Cossins i Crawford, 2005). També respecte a la qualitat de l'aigua, s'estan desenvolupant microsensors capaços d'analitzar les característiques fisicoquímiques de l'aigua (oxigen, temperatura, CO<sub>2</sub>, salinitat, amoníac, nitrats, etc). Malgrat que aquestes són variables que es poden determinar habitualment, els sensors actuals no solen poder-les mesurar totes alhora i requereixen una mida considerable. Els nous sensors, basats en biotecnologies de membrana, permetran mesures simultànies i seran especialment útils en sistemes de recirculació i aquariologia. Addicionalment les

tècniques de radiotransmissió o infraroigs permeten una monitorització integrada i remota d'aquestes variables.

### Monitoratge del medi

Un dels reptes biotecnològics més demanat en la prevenció de l'estrès i el control del benestar dels peixos és el del monitoratge dels animals en el seu medi de cultiu (tancs, gàbies o estanys). En l'aqüicultura pràctica, totes aquelles tècniques que ens permetin aquest monitoratge d'una manera no invasiva seran les que més utilitat aportaran al sector. En aquest aspecte, les tecnologies de la imatge poden representar un gran avenç, perquè permeten un control no invasiu de paràmetres biològics indicadors, com poden ser l'alimentació o el comportament. La monitorització amb dispositius d'imatge submarins ja és utilitzada per al control de la ingesta dels peixos dins de les gàbies, de manera que el sistema d'administració de pinsos en les gàbies és controlat de manera retroactiva, i s'atura quan els dispositius d'imatge indiquen que els animals paren de menjar. En un futur proper es podran utilitzar per registrar comportaments alimentaris que es compararan automàticament amb patrons, siguin alterats o normals, per detectar-ne els canvis. Igualment, la presència de comportaments d'agressió i la seva comparació amb patrons normals o la monitorització eventual de presència de malformacions o ferides a través d'imatges dels peixos en el seu medi, representaran indicadors d'estrès i benestar que es podran obtenir a partir d'anàlisis informàtiques i sistemes experts provinents de registres d'imatges sense necessitat de mostres de sang o teixits, procediments invasius i fonts d'estrès puntual, que alteren inevitablement la població en l'extracció de les mostres, encara que sigui de manera transitòria.

### Prevençió de malalties

En el camp de la prevenció de les malalties i la promoció d'unes condicions de salut més robustes s'estan desenvolupant amb força les biotecnologies relacionades amb la utilització de prebiòtics i probiòtics. Els prebiòtics són substàncies, tals com certs glúcids, que s'introdueixen a través de la dieta i que estimulen el creixement de certs bacteris convenients per a l'animal, els probiòtics. També es poden utilitzar els mateixos probiòtics, que s'introdueixen tant en el medi com a través de la via digestiva, i que desplacen per competència organismes potencialment patògens. Fomentant, doncs, el creixement dels probiòtics, es pot impedir o controlar el creixement de patògens. L'ús de prebiòtics i probiòtics, que comencen a ser habituals en els suplementos alimentaris per als humans, ja s'està utilitzant amb èxit amb alguns cultius de crustacis mitjançant la sembra de bacteris beneficiosos. L'avantatge està en el fet que amb la utilització d'aquesta biotecnologia en zones d'estanys on s'han cultivat gambes utilitzant aquest mètode (per exemple a Indonèsia), s'ha demostrat que disminueix significativament la mortalitat deguda a vibriosis, i al mateix temps, comparat amb estanys on s'utilitzen antibiòtics, la producció augmenta unes cinc vegades a causa d'estalviar-se l'efecte indiscriminat de l'antibiòtic. Els probiòtics poden ser de diferents gèneres bacterians amb capacitat antagonista als patògens, han de ser persistents en la microbiota intestinal i biològicament estables. Actualment s'estan provant microorganismes del tipus *Lactobacillus*, bacteris de l'àcid làctic, el grup del *Bacillus subtilis*, i els grups del *Bacillus cereus* i dels *Vibrio*, encara que aquests dos darrers presenten més dificultats perquè no són biològicament tan estables i poden intercanviar gens més fàcilment i esdevenir patògens (Carnevali *et al.*, 2006; Balcazar *et al.*, 2006).



En aquest àmbit, un dels darrers desenvolupaments incorpora les nanotecnologies per produir nanopartícules en la fabricació de vacunes de nova generació per a peixos, i és probable que la incorporació de les nanotecnologies ajudi en processos com l'administració de molècules immunològicament actives a través de membranes biològiques, de manera que s'eviten processaments o degradacions prèvies.

## TRANSFERÈNCIA GÈNICA ALS PEIXOS

La transferència gènica en eucariotes superiors és un dels màxims assoliments de l'aplicació de les tècniques de DNA recombinant en biotecnologia. Així, els animals transgènics són actualment una eina valuosa tant en estudis bàsics com aplicats. En els peixos els primers experiments de transferència gènica en embrions daten de mitjan anys vuitanta (Chourrout *et al.*, 1986). Des de llavors aquesta tecnologia s'ha aplicat a diferents espècies, moltes importants en aqüicultura. La transferència gènica permet modificar les característiques hereditàries d'un animal, ja sigui introduint gens nous o reemplaçant un gen concret del genoma. Aquesta segona aproximació, coneguda com a *genoanul·lació*, no és factible de moment en peixos.

### Producció de peixos transgènics

La tècnica més utilitzada per a la producció de peixos transgènics consisteix en la introducció directa del DNA exogen en l'ou fecundat (revisat a Sin, 1997). Aquest DNA ha de contenir la seqüència codificant completa del gen a expressar (transgèn), juntament amb les seqüències reguladores necessàries per a una expressió eficient. En el cas d'aplicacions biotecnològiques

és desitjable que totes aquestes seqüències provinguin també d'un peix. El procediment més utilitzat per introduir el DNA és la injecció d'aquest al citoplasma d'una cèl·lula de l'embrió, quan aquest està en estat d'una o dues cèl·lules. S'han assajat altres mètodes que permetin transferir el DNA a molts embrions alhora, com són l'electroporació o el bombardeig de micropartícules recobertes de DNA. Igualment, s'ha usat l'esperma com a portador del transgèn en el moment de la fecundació, ja sigui barrejant simplement el DNA exogen amb l'esperma, o electroporant prèviament l'esperma per introduir-hi el DNA, però en tots els casos els nivells d'integració i expressió del transgèn han estat molt més baixos que els assolits mitjançant microinjecció. Per millorar els nivells d'integració s'ha assajat amb èxit l'ús de retrovirus atenuats com a vectors per introduir el DNA, però aquest mètode no seria acceptable per desenvolupar peixos destinats al consum humà. També s'han emprat elements transponibles de peix com a vector en peix zebra i peix d'arrossar japonès. En qualsevol cas, el seu ús no està molt estès i, per tant, la injecció al citoplasma continua sent el mètode més utilitzat.

Un cop introduït en una de les cèl·lules de l'embrió en desenvolupament, el DNA ha de dirigir-se al nucli i posteriorment integrar-se en el genoma de l'organisme hoste. La integració del DNA és un pas limitant en la producció d'un peix transgènica. Aquesta integració ocorre a l'atzar en qualsevol lloc del genoma; a més, no es produeix immediatament després de la injecció, sinó en etapes tardanes de l'embriogènesi, i només en algunes cèl·lules, de manera que dona lloc a un organisme adult mosaic. Aquest mosaïcisme també s'observa en el patró d'expressió del gen introduït, ja que no totes les cèl·lules de l'organisme expressen el transgèn. A més, les molècules de DNA injectades formen concatèmers abans de la

seva integració, i això dóna lloc a la inserció de múltiples còpies. Això afecta l'expressió del transgèn, ja que la maquinària cel·lular pot acabar desactivant aquest DNA estrany mitjançant metil·lació o formació d'heterocromatina.

En moltes de les aplicacions dels peixos transgènics és desitjable el control temporal o espacial de l'expressió del transgèn, de manera que aquest només s'expressi en determinats teixits. Aquest control es pot aconseguir utilitzant promotors específics de teixit per dirigir l'expressió del gen exogen, tot i que en peixos hi ha encara pocs promotors caracteritzats.

L'últim pas en la generació d'un peix transgènic és aconseguir la presència del gen exogen en les cèl·lules de la línia germinal, per assegurar que el transgèn passarà a la generació següent. La probabilitat que això passi és baixa, a causa de la integració tardana del DNA en el genoma, fet que resulta en una mitjana inferior al 15 % de la descendència que ha incorporat el transgèn. Aquest percentatge de transmissió pot ser fins i tot més baix (2-5 %) en animals amb cicles vitals més llargs. Tanmateix, en la segona generació transgènica ja s'obté una transmissió mendeliana. Tot i així, poden aparèixer fenòmens de silenciament de l'expressió fins i tot després de diverses generacions.

## Aplicacions

La majoria dels estudis de transferència gènica en peixos s'han realitzat amb petits peixos d'aquari com ara el peix zebra o el peix d'arrossar japonès, i en treballs dedicats a la investigació bàsica. La facilitat de cultiu i l'elevada fecunditat d'aquests peixos model, combinat amb un temps curt de generació, els fan molt atractius per a aquest tipus d'estudis. D'altra banda, el fet que la fecundació dels ous i el desenvolupament dels embrions siguin externs, junt amb la transparència dels mateixos, permet el monitoratge del desenvolupament embrionari i els ha convertit en models ideals per a estudis de biologia del desenvolupament (Wittbrodt *et al.*, 2002; Dahm i Geisler, 2006).

En l'àmbit de l'aqüicultura, les aportacions que pot oferir la transferència gènica estan relacionades amb la introducció de caràcters nous o la millora de caràcters d'interès productiu. Els esforços més importants fins al moment s'han destinat a la creació de peixos transgènics amb elevades taxes de creixement. Això s'ha aconseguit mitjançant la introducció de còpies addicionals del gen de l'hormona del creixement (GH) i l'expressió posterior d'alts nivells d'aquesta hormona. Aquesta estratègia s'ha assajat en un gran nombre d'espècies, majoritàriament salmònids. Inicialment es van usar sobretot gens de la GH de mamífers i promotors d'origen víric o de mamífers. Posteriorment, s'han utilitzat construccions de DNA amb seqüències d'origen piscícola, amb les quals s'han obtingut generalment millors resultats, a més de tenir una millor acceptació pública (Zbikowska, 2003; Fletcher *et al.*, 2004; Hallerman *et al.*, 2007).

La resposta a l'acció de la GH ha estat molt dispar en les diferents línies desenvolupades, des d'animals que no han incrementat el seu creixement respecte als seus congèneres no transgènics, fins a augments en el creixement de més de vint vegades. Aquesta variabilitat de resposta és deguda a múltiples factors, com el tipus de construcció de DNA, al lloc d'integració i al nombre de còpies integrades. Així mateix, influeixen l'espècie receptora utilitzada i el seu patrimoni genètic (Devlin *et al.*, 2001), ja que s'ha vist que generalment en els salmònids s'obtenen millors resultats. D'altra banda, amb un impacte tan gran sobre el creixement, cal esperar que l'expressió del gen exogen de la GH tingui altres manifestacions fisiolò-

giques, a més d'influir en el comportament i benestar de l'animal. Aquesta informació és escassa o inexistent en la majoria dels casos, però aquestes qüestions han d'estudiar-se si es pretén la comercialització d'alguna d'aquestes línies (Hallerman *et al.*, 2007).

També s'estan assajant altres aplicacions de la transferència gènica d'interès potencial per a l'aquicultura, encara que aquestes es troben en un estat de desenvolupament menys avançat. Entre aquestes, la producció de salmons capaços de viure a temperatures per sota dels 0 °C, fet que ampliaria la seva àrea de cultiu a la costa atlàntica del Canadà. L'estratègia consisteix a introduir certs gens d'espècies de peixos que habiten a l'Àrtic i que codifiquen proteïnes anticongelants que protegeixen el peix dels efectes de la congelació. Els salmons transgènics produïts fins al moment no mostren resistència a la congelació, a causa dels baixos nivells de proteïna anticongelant que produeixen (Zbikowska, 2003; Fletcher *et al.*, 2004). D'altra banda, l'ús d'aquests gens s'ha assajat amb èxit en la carpa vermella (*Carassius auratus*) per produir espècies tolerants a aigües fredes. Això beneficiaria el cultiu de carpa comuna a la Xina o de la tilàpia a Israel, països on les temperatures hivernals són properes als límits fisiològics d'aquestes espècies (Maclean, 2003).

A causa de la dificultat de generar peixos transgènics en la majoria d'espècies comercials, la tendència actual és usar prèviament espècies model per assajar la viabilitat de certes aplicacions. En aquest sentit s'han fet assaigs per millorar la resistència a patògens bacterians en diferents espècies model, mitjançant l'expressió de certes proteïnes antibacterianes d'ampli espectre, com el lisozim o les cecropines (Yazawa *et al.*, 2006). Igualment, s'ha usat la transferència gènica per modificar el metabolisme dels peixos. Així, s'han desenvolupat peixos d'arrossar japonès amb una fitasa fúngica que, a diferència de les no transgè-

niques, poden aprofitar el fòsfor en forma de fitat contingut als pinsos d'alimentació. En aquesta mateixa línia, s'han desenvolupat peixos zebra transgènics amb els gens codificants de diferents enzims de la ruta de biosíntesi d'àcid eicosapentanoic (EPA) i àcid docosahexanoic (DHA), àcids grassos beneficiosos per a la salut humana, per elevar el contingut d'aquests àcids grassos en aquests animals (Alimuddin *et al.*, 2007).

D'altra banda, la utilització de peixos transgènics com a biofàctories per a la producció de proteïnes amb interès terapèutic o industrial ampliaria considerablement les aplicacions de l'aquicultura. Actualment, Maclean *et al.* (2002) estan treballant amb tilàpies transgèniques per a la producció del factor VII de coagulació humà. Aquesta proteïna s'usa per al tractament de l'hemofília, i la seva obtenció tradicional a partir de plasma humà està en desús. La producció en tilàpies d'aquest factor tindria un menor cost i un major rendiment que el sistema actual *in vitro* (Hwang *et al.*, 2004). A més, s'estan desenvolupant tilàpies transgèniques que expressen insulina humana per utilitzar els seus corpuscles de Brockman en trasplantaments per a diabètics. Els trasplantaments ja realitzats en ratolí han mostrat la viabilitat d'aquesta estratègia (Alexander *et al.*, 2006).

S'ha de destacar que no sempre s'intenta l'expressió elevada d'un gen; també s'ha intentat bloquejar l'expressió d'un gen endògen mitjançant tecnologia antisentit. Aquesta estratègia s'ha aplicat en la truita irisada per bloquejar l'acció de l'hormona alliberadora de la gonadotrofina (GnRH-III), per obtenir animals estèrils. Encara que es va aconseguir disminuir la producció de GnRH-III endògena, aquesta estratègia no va tenir èxit, ja que els peixos igualment van assolir la maduració sexual. Aquesta mateixa aproximació s'està assajant en tilàpia i carpa, sense dades conclouents encara (Maclean, 2003; Zbikowska, 2003).

De l'esmentat anteriorment es desprèn que la majoria de les aplicacions de la transgènesi en peixos està en fase de desenvolupament, i continua relegada exclusivament a la investigació. Això es deu fonamentalment a dues raons: la necessitat de tenir un coneixement més profund de l'acció dels gens, i la falta d'una tècnica veritablement eficaç per a la producció de transgènics, especialment en espècies d'interès en aqüicultura.

Tot i així, ja hi ha al mercat peixos transgènics. L'empresa GloFish comercialitza, com a peixos ornamentals per a aquariofília, peixos zebra transgènics que contenen diferents variants d'una proteïna fluorescent (<http://www.glofish.com>). D'altra banda, Aqua Bounty Technologies Inc. intenta comercialitzar sota el nom de *salmó AquaAdvantage* un salmó atlàntic transgènic per a GH. Aquesta petició es troba en procés de revisió per part de la Food and Drug Administration dels EUA (Fletcher *et al.*, 2004).

Tots aquests treballs han suscitat molt interès, però també han alertat sobre l'aparició de riscos derivats del seu ús. Aquests inclouen riscos mediambientals per la possibilitat d'escapada d'animals transgènics, prevenció per part del consumidor, així com problemes ètics per la manipulació del genoma d'animals (Einsiedel, 2005; Kapuscinski, 2005).

## GENÒMICA, IMMUNOLOGIA I MALALTIES DE PEIXOS EN AQUÍCULTURA

### Sistema immunitari de peixos teleostis

La resposta immunitària implica el reconeixement del patògen o material estrany seguit del desenvolupament d'una resposta per eliminar-lo. Els peixos teleostis són, en termes evolutius, el grup animal més pri-

mitiu amb un sistema immunitari complet. Presenten mecanismes de defensa inespecífics i específics similars als dels mamífers. Malgrat que aquests animals estan en íntim contacte amb el seu ambient, el qual, generalment, té grans concentracions de microorganismes, en condicions normals el peix es manté en bon estat de salut, i es defensa contra aquests invasors potencials mitjançant un sistema complex de mecanismes de defensa.

Aquests mecanismes poden dividir-se en inespecífics o innats i en específics o adaptatius. Encara que és habitual a l'hora de descriure el sistema immunitari fer aquesta divisió, cada vegada hi ha més evidències tant en peixos com en mamífers que ambdós mecanismes es combinen per mantenir un màxim nivell d'immunocompetència. La resposta innata generalment precedeix l'adaptativa, activa i determina la naturalesa d'aquesta última i coopera en el manteniment de l'homeòstasi. Els mecanismes de defensa inespecífics engloben aquells que es desencadenen sense necessitat d'un contacte previ o un reconeixement anterior de l'agent invasor, i donen una resposta ràpida davant una gran varietat d'estímuls. La immunitat innata es caracteritza per presentar una sèrie de receptors de reconeixement de patrons codificats en la línia germinal, els quals reconeixen dos tipus de patrons moleculars (Magnadóttir, 2006), els associats a patògens (PAMP) com les glicoproteïnes i lipopolisacàrids (LPS) de bacteris i fongs, DNA bacterià i RNA víric. Els mecanismes de defensa específics només es troben en els vertebrats i es desencadenen davant un estímul concret amb què l'operador ha tingut contacte anteriorment. Aquesta resposta, que millora amb la trobada successiva amb el mateix patògen, és altament específica per a un patògen particular, de tal manera que el reconeixement d'epítops antigènics és pràcticament il·limitat. Per tant, les dues característiques més importants de la res-

posta immunitària adaptativa són l'especificitat i la memòria.

### **Clonatge de gens relacionats amb la resposta immunitària en peixos**

La major part dels estudis de biologia molecular aplicada a l'estudi de la resposta immunitària de peixos se centren en el clonatge i caracterització de gens individuals, la seva seqüència completa, les relacions evolutives respecte a altres espècies, l'anàlisi de la seva expressió, etc., encara que recentment s'ha iniciat l'estudi de l'expressió simultània de gens (Goetz *et al.*, 2004b; MacKenzie *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2006).

Els salmònids, especialment la truita irisada, és el grup a què s'ha dedicat més atenció en l'estudi de les bases moleculars de la resposta immunitària. Entre altres gens, s'han seqüenciat i realitzat estudis d'expressió de *YIL-1*, *YIL-6*, *YIL-11*, *YIL-18* i el *TNF- $\alpha$*  (Koussounadis *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2004; Roca *et al.*, 2007). A causa de la importància de les malalties d'etiologia vírica també s'han estudiat l'interferó i gens relacionats com l'*Mx*, dos TLR (Rebl *et al.*, 2007); factors reguladors d'IFN (IRF) (Collet *et al.*, 2003); proteïnes Mx (Trobridge i Leong, 1995; Trobridge *et al.*, 1997; Collet *et al.*, 2007), un factor activador de macròfags del tipus IFN- $\gamma$  (Graham i Secombes, 1988, 1990) i s'han realitzat clonatges, estudis d'expressió i d'organització gènica de la sintasa induïble de NO (iNOS) (Wang *et al.*, 2001). A més, s'han seqüenciat i realitzat estudis d'expressió de diversos gens de pèptids antimicrobians (Zou *et al.*, 2007), dels factors del complement C4 i molècules de tipus C1, de les anafilatoxines C3a (Boshra *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2004) i de diverses quimiocines tals com una CXC del tipus CXCL8 (Laing *et al.*, 2002a) i una altra amb homologia del subgrup CXCL9, CXCL10, CXCL11, de la qual semblen existir

dues formes i que és induïda en infeccions víriques (Laing *et al.*, 2002b; O'Farrell *et al.*, 2002). També s'han caracteritzat dues quimiocines CC, CK1 (Dixon *et al.*, 1998) i CK2 (Liu *et al.*, 2002). També de diverses lectines i els seus receptors i una proteïna associada al receptor de *YIL-1* (Stansberg *et al.*, 2005). S'han clonat dos isotips de la immunoglobulina IgM (Hordvik *et al.*, 1992) i l'isotip IgD (Hordvik *et al.*, 1999).

No són gaires els gens amb possible funció immunitària caracteritzats en espècies comercials d'interès a Espanya, si ho comparem amb el que s'ha fet en salmònids, ja que el progrés en aquest camp és molt recent.

### **Vacunes de DNA**

Les malalties d'origen víric són un dels problemes amb major impacte en el desenvolupament de l'aquicultura, ja que generalment provoquen unes altes mortalitats i no existeixen tractaments eficaços ni vacunes. La vacunació seria el mètode més eficaç per controlar l'impacte d'aquestes malalties; tanmateix, per a molts dels virus més devastadors, les vacunes tradicionals (vacunes atenuades, mortes) o la vacunació amb antígens vírics han resultat ineficaços. Dins d'aquest context, la vacunació genètica representa en aquests moments l'opció més viable. Amb aquest tipus de vacunes, en lloc d'injectar l'antigen s'injecta la seqüència de DNA que el codifica, juntament amb regions reguladores i cofactors (per exemple, perquè la vacuna s'expressi en un determinat teixit). Des de fa uns anys, s'està experimentant amb les vacunes de DNA per a molts d'aquests patògens, amb resultats positius. La major part de les vacunes de DNA desenvolupades en l'àmbit de la piscicultura són per a rabdovirus, els virus de peixos amb major repercussió en l'aquicultura continental, i entre els quals



es troben el virus de la necrosi hemato-poètica infecciosa (IHNV) i el virus de la septicèmia hemorràgica vírica (VHSV). Tanmateix, fins que no es resolguin alguns problemes associats amb aquestes vacunes de DNA, com són els aspectes relacionats amb la seguretat o rendibilitat econòmica, aquestes no estaran disponibles per al sector (Takano *et al.*, 2004).

### Genoteques de marques de seqüència expressada. Hibridació substractiva supressora

La producció de marques (o etiquetes) de seqüència expressada (EST, segons la sigla anglesa), ja sigui de manera directa a partir d'òrgans relacionats amb la funció que s'investiga, o mitjançant la hibridació substractiva supressora (SSH, també segons la sigla anglesa) (Bayne *et al.*, 2001; Alonso i Leong, 2002; Blum *et al.*, 2004; Tsoi *et al.*, 2004), ha generat múltiples bases de dades amb centenars o milers de gens, que constitueixen al seu torn la plataforma necessària per a la construcció de xips de DNA.

Els salmònids, com es va veure en l'apartat anterior, són els peixos en els quals s'ha avançat més en l'aplicació d'eines de genòmica. Un consorci de grups del Canadà, França, Noruega i els EUA van preparar més de cent setanta-cinc genoteques de cDNA a partir d'una àmplia varietat de teixits en diferents estats de desenvolupament, en les quals s'han obtingut més de tres-centes mil seqüències de cDNA de salmònids. Aquestes seqüències s'han organitzat en quaranta mil *contigs* únics (un *contig* és un conjunt de segments de DNA sobreposats derivats del mateix origen que, sumats, donen una seqüència contigua de consens). Es va construir un xip de 3.557 cDNA i s'està emprant per aconseguir noves dades en l'estudi de la resposta de cèl·lules i teixits a contaminants, malalties i estrès, així com per a reproduc-

ció i desenvolupament. Utilitzant aquests resultats com a base s'ha construït un xip de DNA de mida major que comprèn 16.006 gens i que s'ha emprat per detectar patrons d'expressió gènica davant infeccions experimentals i canvis ambientals i fisiològics a petita escala (Rise *et al.*, 2004b; Schalburg *et al.*, 2005).

### Xips de DNA

Els xips de DNA (microxips) són plataformes físiques (normalment portaobjectes de vidre) amb gens o seqüències de gens impresos, que permeten l'anàlisi simultània de l'expressió de cents o milers de seqüències gèniques. L'estudi d'aquests perfils d'expressió en teixits o barreges de cèl·lules d'interès constitueix la base de la genòmica funcional. Una de les primeres utilitzacions publicades de xips de DNA per a l'estudi de les malalties de peixos, a fi d'entendre l'expressió de gens davant d'una infecció, es va basar en l'ús de xips de cDNA humans (Tsoi *et al.*, 2003). En aquest experiment es va determinar l'expressió en fetges de salmó atlàntic infectats amb *Aeromonas salmonicida*, i comparant-los amb peixos sans, Rise *et al.* (2004a) van emprar els xips de DNA preparats a partir de les EST descrites anteriorment per determinar la modulació de la infecció de *Piscirickettsia salmonis* de gens de macròfags i del teixit hematopoètic del ronyó. Aquests resultats van ser validats posteriorment amb RT-PCR. Els patrons moleculars de la infecció amb *P. salmonis* podrien ajudar el desenvolupament de vacunes i de tractaments anti *Piscirickettsia*.

MacKenzie *et al.* (2006) van emprar un altre xip de DNA de salmònids desenvolupat per Krasnov *et al.* (2005), amb el qual van estudiar la capacitat del cortisol per modular la resposta de transcripció dels macròfags de truita irisada davant l'LPS. Els resultats van indicar que el cortisol inhibeix



significativament la inducció de l'expressió de TNF- $\alpha$ -2, una citocina proinflamatòria. Gerwick *et al.* (2007) van emprar un xip d'«oligos» per estudiar els perfils d'expressió gènica en el procés d'inflamació de fetges de truites irisades injectades amb bacterina de *Listonella (Vibrio) anguillarum* en adjuvant incomplet de Freund. Les anàlisis amb xips de DNA van determinar que la variabilitat individual era molt elevada, probablement com a conseqüència de la gran variabilitat en la resistència a malalties. La resposta antivírica va ser avaluada mitjançant l'ús de xips de DNA en la palaa japonesa per Byon *et al.* (2005). Aquests autors van comprovar que gens immunitaris no específics, tals com el receptor MIPI1-a de les cèl·lules NK i de Kupfer o la proteïna Mx1, se sobreexpressaven davant la vacunació amb una vacuna integrada per la proteïna G de VHSV els dies 1 i 3 postimmunització. Dios *et al.* (2007) van estudiar els perfils d'expressió gènica de la daurada (*Sparus aurata*) en resposta a infeccions de nodavirus. Per a això van emprar la tècnica de SSH per generar genoteques de cDNA sostretes expressades el dia 1 postinfecció. Alguns dels gens pertanyien a les categories funcionals d'estrès i de sistema immunitari. Per comprovar la modulació dels perfils d'expressió, es van prendre mostres els dies 1, 3 i 7 postinfecció, que es van hibridar en un macroxip amb 765 gens construït a partir de productes de PCR amb més de tres-cents parells de bases, procedents dels gens de la genoteca *forward* (385 gens) i *reverse* (380) de la SSH. Es van detectar canvis significatius en l'expressió de gens relacionats amb la resposta immunitària antivírica.

## CONCLUSIONS

Algunes aplicacions biotecnològiques ja s'empren avui en l'aquicultura com, per exemple, la generació de línies poliploides

en diversos llocs del món o les línies clonals de peixos plans al Japó. Fa poc l'empresa Novartis ha presentat una vacuna de DNA que funciona contra el virus IHN en el salmó atlàntic, anomenada Apex-IHN, l'ús de la qual potser no tardarà a estendre's. Altres aplicacions biotecnològiques en l'aquicultura són tècnicament possibles, però encara cal una avaluació més completa de les seves possibles implicacions. Aquest seria el cas de la producció de peixos transgènics per millorar diferents aspectes de la producció, com ara el creixement o la resistència a ambients adversos o a certs patògens. Altres aplicacions, com ara el trasplantament de la línia germinal, requereixen encara més recerca abans que el seu ús pugui ser compatible amb una viabilitat no solament tècnica sinó també econòmica.

Un millor coneixement de la genètica i fisiologia de les espècies importants en aquicultura és un requisit previ a l'aplicació de la biotecnologia en sentit ampli per a la millora de la producció. S'espera que en el futur això contribuirà a l'obtenció d'espècies o varietats amb les millors característiques de creixement, reproducció i resistència a malalties i estrès. Això facilitarà que l'aquicultura compleixi el paper que li tocarà fer de manera cada cop més evident, és a dir, com a garant per al subministrament de proteïna animal d'origen aquàtic en un món cada cop més globalitzat i poblat.

## BIBLIOGRAFIA

- ALESTRÖM, P.; HOLTZER, J. L.; NOURIZADEH-LILLABADI, R. (2006). «Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine». *Trends Biotech.*, 24: 15-21.
- ALEXANDER, E. L. R.; DOOLEY, K. C.; POHAJDAK, B.; XU, B. Y.; WRIGHT, J. R. (2006). «Things we have learned from tilapia islet xenotransplantation». *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148: 125-131.
- ALIMUDDIN; YOSHIZAKI, G.; KIRON, V.; SATOH, S.; TAKEUCHI, T. (2007). «Expression of masu salmon delta5-desaturase-like gene elevated EPA and DHA

- biosynthesis in zebrafish». *Mar. Biotechnol.*, 9: 92-100.
- ALONSO, M.; LEONG, J. A. (2002). «Suppressive subtraction libraries to identify interferon-inducible genes in fish. *Mar. Biotechnol.*, 4: 74-80.
- BALCAZAR J. L.; BLAS, I. D.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J. L. (2006). «The role of probiotics in aquaculture». *Vet. Microbiol.*, 114: 173-186.
- BAYNE, C. J.; GERWICK, L.; FUJIKI, K.; NAKAO, M.; YANO, T. (2001). «Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization». *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 205-217.
- BERTOTTO, D.; CEPOLLARO, F.; LIBERTINI, A.; BARBARO, A.; FRANCESCON, A.; BELVEDERE, P.; BARBARO, J.; COLOMBO, L. (2005). «Production of clonal founders in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., by mitotic gynogenesis». *Aquaculture*, 246: 115-124.
- BLÁZQUEZ, M.; BOSMA, P. T.; FRASER, E. J.; LOOK, K. J. W. VAN; TRUDEAU, V. L. (1998). «Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth». *Comp. Biochem. Physiol., Part C*, 119: 345-364.
- BLUM, J. L.; KNOEHL, I.; LARKIN, P.; KROLL, K. J.; DENSLOW, N. D. (2004). «Use of suppressive subtractive hybridization and cDNA arrays to discover patterns of altered gene expression in the liver of dihydrotestosterone and 11-ketotestosterone exposed adult male largemouth bass (*Micropterus salmoides*)». *Mar. Environ. Res.*, 58: 565-569.
- BOSHRA, H.; GELMAN, A. E.; SUNYER, J. O. (2004). «Structural and functional characterization of complement C4 and C1s-like molecules in teleost fish: insights into the evolution of classical and alternative pathways». *J. Immunol.*, 173: 349-359.
- BYON, J. Y.; OHIRA, T.; HIRONO, I.; AOKI, T. (2005). «Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination». *Fish Shellfish Immunol.*, 18: 135-147.
- CARNEVALI, O.; VIVO, L. DE; SULPIZIO, R.; GIOACCHINI, G.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; CRESCI, A. (2006). «Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax* L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression». *Aquaculture*, 258: 430-438.
- COLLET, B.; HOVENS, G. C.; MAZZONI, D.; HIRONO, I.; AOKI, T.; SECOMBES, C. J. (2003). «Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interferon regulatory factor 1 and 2 (IRF-1 and IRF-2)». *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 111-126.
- COLLET, B.; MUNRO, E. S.; GAHLAWAT, S.; ACOSTA, F.; GARCIA, J.; ROEMELT, C.; ZOU, J.; SECOMBES, C. J.; ELLIS, A. E. (2007). «Infectious pancreatic necrosis virus suppresses type I interferon signalling in rainbow trout gonad cell line but not in Atlantic salmon macrophages». *Fish Shellfish Immunol.*, 22: 44-56.
- COSSINS, A. R.; GRAWFORD, D. L. (2005). «Fish as models for environmental genomics». *Nat. Rev. Gen.*, 6: 324-333.
- CHOURROUT, D.; GUYOMARD, R.; HOUEBINE, L. M. (1986). «High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) by microinjection into egg cytoplasm». *Aquaculture*, 51: 143-150.
- DAHM, R.; GEISLER, R. (2006). «Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species». *Mar. Biotechnol.*, 8: 329-345.
- DEVLIN, R. H.; BIAGI, C. A.; YESAKI, T. Y.; SMAILUS, D. E.; BYATT, J. C. (2001). «Growth of domesticated transgenic fish». *Nature*, 409: 781-782.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. (2002). «Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences». *Aquaculture*, 208: 191-364.
- DIOS, S.; POISA-BEIRO, L.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. (2007). «Suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus». *Mol. Immunol.*, 44: 2195-2204.
- DIXON, B.; SHUM, B.; ADAMS, E. J.; MAGOR, K. E.; HEDRICK, R. P.; MUIR, D. G.; PARHAM, P. (1998). «CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Immunol. Rev.*, 166: 341-348.
- DOUGLAS, S. E. (2006). «Microarray studies of gene expression in fish». *Omic*, 10: 474-489
- EINSIEDEL, E. F. (2005). «Public perceptions of transgenic animals». *Rev. Sci. Tech. OIE*, 24: 149-157.
- FELIP, A.; ZANUY, S.; CARRILLO, M.; PIFERRER, F. (2001). «Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species». *Genetica*, 111: 175-195.
- FLETCHER, G. L.; SHEARS, M. A.; YASKOWIAK, E. S.; KING, M. J.; GODDARD, S. V. (2004). «Gene transfer: potential to enhance the genome of Atlantic salmon for aquaculture». *Aust. J. Exp. Agr.*, 44: 1095-1100.
- GERWICK, L.; CORLEY-SMITH, G.; BAYNE, C. J. (2007). «Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus». *Fish Shellfish Immunol.*, 22: 157-171.
- GOETZ, F. W.; ILIEV, D. B.; MCCAULEY, L. A.; LIARTE, C. Q.; TORT, L. B.; PLANAS, J. V.; MACKENZIE, S. (2004b). «Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages». *Mol. Immunol.*, 41: 1199-1210.
- GORNATI, R.; PAPIS, E.; RIMOLDI, S.; CHINI, V.; TEROVA, G.; PRATI, M.; SAROGLIA, M.; BERNARDINI, G. (2005).

- «Molecular markers for animal biotechnology: sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) HMG-CoA reductase mRNA». *Gene*, 344: 299-305.
- GRAHAM, S.; SECOMBES, C. J. (1988). «The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes». *Immunology*, 65: 293-297.
- GRAHAM, S.; SECOMBES, C. J. (1990). «Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma?». *J. Fish Biol.*, 36: 563-573.
- HALLERMAN, E. M.; MCLEAN, E.; FLEMING, I. A. (2007). «Effects of growth hormone transgenes on the behaviour and welfare of aquacultured fishes: A review identifying research needs». *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 104: 265-294.
- HORDVIK, I.; THEVARAJAN, J.; SAMDAL, I.; BASTANI, N.; KROSSOY, B. (1999). «Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene». *Scand. J. Immunol.*, 50: 202-210.
- HORDVIK, I.; VOIE, A. M.; GLETTE, J.; MALE, R.; ENDRESEN, C. (1992). «Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar* L.». *Eur. J. Immunol.*, 22: 2957-2962.
- HULATA, G. (2001). «Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies». *Genetica*, 111: 155-173.
- HWANG, G. L.; MULLER, F.; RAHMAN, M. A.; WILLIAMS, D. W.; MURDOCK, P. J.; PASI, K. J.; GOLDSPIK, G.; FARAHMAND, H.; MACLEAN, N. (2004). «Fish as bioreactors: Transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos». *Mar. Biotechnol.*, 6: 485-492.
- KAPUSCINSKI, A. (2005). «Current scientific understanding of the environmental biosafety of transgenic fish and shellfish». *Rev. Sci. Tech. OIE*, 24: 309-322.
- KATO, K.; HAYASHI, R.; YUASA, D.; YAMAMOTO, S.; MIYASHITA, S.; MURATA, O.; KUMAI, H. (2002). «Production of cloned red sea bream, *Pagrus major*, by chromosome manipulation». *Aquaculture*, 207: 19-27.
- KOMEN, J.; BONGERS, A. B. J.; RICHTER, C. J. J.; MUISWINKEL, W. B. VAN; HUISMAN, E. A. (1991). «Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio*). 2. The production of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids». *Aquaculture*, 92: 127-142.
- KOUSSOUNADIS, A. I.; RITCHIE, D. W.; KEMP, G. J.; SECOMBES, C. J. (2004). «Analysis of fish IL-1beta and derived peptide sequences indicates conserved structures with species-specific IL-1 receptor binding: implications for pharmacological design». *Curr. Pharm. Design*, 10: 3857-3871.
- KRASNOV, A.; KOSKINEN, H.; REXROAD, C.; AFANASYEV, S.; MOLSA, H.; OIKARI, A. (2005). «Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Aquat. Toxicol.*, 74: 70-81.
- LAING, K. J.; BOLS, N.; SECOMBES, C. J. (2002b). «A CXC chemokine sequence isolated from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* resembled the closely related interferon-g inducible chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11». *Eur. Cytokine Netw.*, 13: 462-473.
- LAING, K. J.; ZOU, J. J.; WANG, T. [et al.] (2002a). «Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*». *Dev. Comp. Immunol.*, 26: 433-444.
- LEE, C. S.; DONALDSON, E. M. (2001). *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture*. Amsterdam: Elsevier.
- LIU, L.; FUJIKI, K.; DIXON, B.; SUNDICK, R. S. (2002). «Cloning of a novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CC chemokine with a fractalkine-like stalk and a TNF decoy receptor using cDNA fragments containing Au-rich elements». *Cytokine*, 17: 71-81.
- MACKENZIE, S.; ILIEV, D.; LIARTE, C.; KOSKINEN, H.; PLANAS, J. V.; GOETZ, F. W.; MOLSA, H.; KRASNOV, A.; TORT, L. (2006). «Transcriptional analysis of LPS-stimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol». *Mol. Immunol.*, 43: 1340-1348.
- MACLEAN, N. (2003). «Genetically modified fish and their effects on food quality and human health and nutrition». *Trends Food Sci. Tech.*, 14: 242-252.
- MACLEAN, N.; RAHMAN, M. A.; SOHM, F.; HWANG, G.; IYENGAR, A.; AYAD, H.; SMITH, A.; FARAHMAND H. (2002). «Transgenic tilapia and the tilapia genome». *Gene*, 295: 265-277.
- MAGNADÓTTIR, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.*, 20: 137-151.
- MARTIN, S. A.; BLANEY, S. C.; HOULIHAN, D. F.; SECOMBES, C. J. (2006). «Transcriptome response following administration of a live bacterial vaccine in Atlantic salmon (*Salmo salar*)». *Mol. Immunol.*, 43: 1900-1911.
- NA-NAKORN, U.; RANGSIN, W.; BOON-NGAM, J. (2004). «Allotripleidy increases sterility in the hybrid between *Clarias macrocephalus* and *Clarias gariepinus*». *Aquaculture*, 237: 73-88.
- O'FARRELL, C.; VAGHEFI, N.; CANTONNET, M.; BUTEAU, B.; BOUDINOT, P.; BENMANSOUR, A. (2002). «Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection». *J. Virol.*, 76: 8040-8049.
- OKUTSU, T.; YOSHITAKI, G. (2007). «Production of all donor-derived offspring from surrogate parents by interspecies transplantation of spermatogonia

- using sterile triploid recipient». A: ROUDAUT, G.; LABBÉ, C.; BOBE, J. [ed.]. *8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Univ. de Rennes: 58.
- PIFERRER, F. (2001). «Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish». *Aquaculture*, 197: 229-281.
- PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUÈRE, J. C.; FLAJSHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. (2008). «The use of induced polyploidy in the aquaculture of bivalves and fish for performance improvement and genetic containment». *Aquaculture*. [En premsa]
- REBL, A.; SIEGL, E.; KOLLNER, B.; FISCHER, U.; SEYFERT, H. M. (2007). «Characterization of twin toll-like receptors from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evolutionary relationship and induced expression by *Aeromonas salmonicida salmonicida*». *Dev. Comp. Immunol.*, 31: 499-510.
- RIBAS, L.; PLANAS, J. V.; BARTON, B.; MONETTI, C.; BERNARDINI, G.; SAROGLIA, M.; TORT, L.; MACKENZIE, S. (2004). «A differentially expressed gene isolated from the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under high-density conditions is up-regulated in brain after in vivo lipopolisaccharide challenge». *Aquaculture*, 241: 195-206.
- RISE, M. L.; JONES, S. R. M.; BROWN, G. D.; SHALBURG, K. R. VON; DAVIDSON, W. S.; KOOP, B. F. (2004a). «Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection». *Physiol. Genomics*, 20: 21-35.
- RISE, M. L.; SCHALBURG, K. R. VON; BROWN, G. D. [et al.] (2004b). «Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics». *Genome Res.*, 14: 478-490.
- ROCA, F. J.; CAYUELA, M. L.; SECOMBES, C. J.; MESEGUER, J.; MULERO, V. (2007). «Post-transcriptional regulation of cytokine genes in fish: A role for conserved AU-rich elements located in the 3'-untranslated region of their mRNAs». *Mol. Immunol.*, 44: 472-478.
- ROTLANT, J.; PARRA, D.; PETERS, R.; BOSHRRA, H.; SUNYER, J. O. (2004). «Generation, purification and functional characterization of three C3a anaphylatoxins in rainbow trout: role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst». *Dev. Comp. Immunol.*, 28: 815-828.
- SARROPOULOU, E.; KOTOULOS, G.; POWER, D. M.; GEISLER, R. (2005). «Gene expression profiling of gilthead sea bream during early development and detection of stress-related genes by the application of cDNA microarray technology». *Physiol. Genomics*, 23: 182-191.
- SCHALBURG, K. R. VON; RISE, M. L.; COOPER, G. A.; BROWN, G. D.; GIBBS, A. R.; NELSON, C. C.; DAVIDSON, K. W. S.; KOOP, B. F. (2005). «Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray». *BMC Genomics*, 6: 126.
- SIN, F. Y. T. (1997). «Transgenic fish». *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 7: 417-441.
- STANSBERG, C.; SUBRAMANIAM, S.; COLLET, B.; SECOMBES, C. J.; CUNNINGHAM, C. (2005). «Cloning of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) IL-1 receptor associated protein». *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 53-65.
- TAKANO, T.; IWAHORI, A.; HIRONO, I.; AOKI, T. (2004). «Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination». *Fish Shellfish Immunol.*, 17: 367-374.
- TAKEUCHI, Y.; HIGUCHI, K.; NAGASAWA, K.; YOSHIZAKI, G. (2007). «Interspecies transplantation of spermatogonia in marine teleosts». A: ROUDAUT, G.; LABBÉ, C.; BOBE, J. [ed.]. *8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Univ. de Rennes: 188.
- TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. (2004). «Surrogate broodstock produces salmonids». *Nature*, 430, 629-630.
- TROBRIDGE, G. D.; CHIOU, P. P.; LEONG, J. A. C. (1997). «Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells». *J. Virol.*, 71: 5304-5311.
- TROBRIDGE, G. D.; LEONG, J. A. C. (1995). «Characterization of a rainbow trout Mx gene». *J. Interf. Cytok. Res.*, 15: 691-702.
- TSOI, S. C.; CALE, J. M.; BIRD, I. M.; EWART, V.; BROWN, L. L.; DOUGLAS, S. E. (2003). «Use of human cDNA microarrays for identification of differentially expressed genes in Atlantic salmon liver during *Aeromonas salmonicida* infection». *Mar. Biotech.*, 5: 545-554.
- TSOI, S. C.; EWART, V.; PENNY, S.; MELVILLE, K.; LIEBSCHER, R. S.; BROWN, L. L.; DOUGLAS, S. E. (2004). «Identification of immune-relevant genes from Atlantic salmon using suppression subtractive hybridization». *Mar. Biotech.*, 6: 199-214.
- WANG, T.; WARD, M.; GRABOWSKI, P.; SECOMBES, C. J. (2001). «Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene». *Biochem. J.*, 358: 747-755.
- WITTBRODT, J.; SHIMA, A.; SCHARTL, M. (2002). «Medaka: A model organism from the far East». *Nat. Rev. Genet.*, 3: 53-64.
- YAMAMOTO, E. (1999). «Studies on sex manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel)». *Aquaculture*, 173: 235-246.
- YAZAWA, R.; HIRONO, I.; AOKI, T. (2006). «Transgenic zebrafish expressing chicken lysozyme show resis-

- tance against bacterial diseases». *Transgenic Res.*, 15: 385-391.
- ZBIKOWSKA, H. M. (2003). «Fish can be first-advances in fish transgenesis for commercial applications». *Transgenic Res.*, 12: 379-389.
- ZOU, J.; BIRD, S.; TRUCKLE, J.; BOLS, N.; HORNE, M.; SECOMBES, C. (2004). «Identification and expression analysis of an IL-18 homologue and its alternatively spliced form in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Eur. J. Biochem.*, 271: 1913-1923.
- ZOU, J.; MERCIER, C.; KOUSSOUNADIS, A.; SECOMBES, C. (2007). «Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish». *Mol. Immunol.*, 44: 638-647.