

“Descifrando el genoma del piojo del salmón *Caligus rogercresseyi*, para un control efectivo y sustentable”

Caligus rogercresseyi es un ectoparásito, conocido como “piojo del salmón” que genera el mayor impacto económico y riesgo sanitario en la industria del salmón en Chile. Los daños económicos provocados por *C. rogercresseyi* están relacionados directamente con la pérdida de calidad del producto final, crecimiento retardado de los peces parasitados e incremento de la susceptibilidad frente a otros patógenos. Esto sumado a los costos generados por los tratamientos, que según cifras aportadas por el Instituto tecnológico del Salmón, INTESAL, son de aproximadamente 480 millones de dólares al año (Costello, 2009; Dresdner et al., 2019). Para el control de la caligidosis, nombre que se le asigna a la enfermedad, la industria salmonera a nivel mundial ha privilegiado el uso de antiparasitarios, que afectan el sistema nervioso del piojo. Sin embargo, el uso prolongado de éstos genera pérdida de la sensibilidad farmacológica y en consecuencia reducción en la eficacia de los tratamientos. Además, los antiparasitarios son compuestos químicos que pueden afectar a otros organismos nativos del ecosistema. En el año 2012 se publicó el Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Caligidosis, PSEVC-Caligidosis. El desafío del programa es promover en el tiempo el manejo integrado de la caligidosis, focalizando sus acciones a través de la vigilancia de las cargas parasitarias, en base al nivel de riesgo y con la implementación de medidas oportunas, ante la detección de centros de alta diseminación del parásito (CAD).

En particular *C. rogercresseyi* a diferencia de *L. salmonis*, especie que afecta a los centros de cultivos en el hemisferio norte, es capaz de parasitar peces silvestres como pejerrey, róbalo, merluza. En Chile no todas las especies de salmónidos cultivadas registran igual susceptibilidad a ser infectadas por este ectoparásito, trucha arcoíris y salmón del Atlántico han mostrado tener altas cargas parasitarias, mientras que salmón Coho ha

registrado bajos niveles de prevalencia. Además, se ha reportado diferencias en mecanismos de respuesta inmune entre salmón Atlántico y salmón Coho.

ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

¿Qué es el genoma?

Un genoma es una colección completa de ácido desoxirribonucleico (ADN) de un organismo, o sea un conjunto de compuestos químicos, que contiene las instrucciones genéticas necesarias para desarrollar y controlar las actividades de todo organismo. Las moléculas del ADN están conformadas por dos hélices torcidas y emparejadas. Cada hélice está formada por cuatro unidades químicas, denominadas bases nucleotídicas, adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C). Las bases en las hélices opuestas se emparejan específicamente; una A siempre se empareja con una T, y una C siempre con una G. Para la obtención de un genoma es necesario realizar una secuenciación de este. Secuenciar significa determinar el orden exacto de las bases nucleotídicas en un segmento de ADN. En la actualidad se han desarrollado diversas plataformas de secuenciación que permiten la obtención un genoma en tiempo reducido y con costos cada vez menor. Por ejemplo, en el 1991 comenzó el proyecto de secuenciación del genoma humano y fue publicado en 2001 en Science, lo que en la actualidad esto se logra en 3 días.

¿Por qué puede ser importante conocer el genoma de un organismo?

Para comprender la importancia de un genoma, podemos decir que cada uno de nosotros cuenta con genes que son transmitidos por nuestros antecesores. En donde se encuentra la información para determinar el sexo, el color de ojos, el tipo de pelo, el tipo de piel, la composición de

nuestros órganos, posibles enfermedades o complicaciones complicaciones hereditarias, nuestra adaptación al medio ambiente, etc. Esta información se presenta de manera similar en todos los organismos desde animales terrestres, plantas, peces, parásitos, hongos, bacterias, etc. Así, a partir de la secuenciación de un genoma podemos comprender de mejor manera los mecanismos de adaptación de los organismos, por ejemplo en ambientes extremos o frente a la presencia de enfermedades. Esta información es utilizada por científicos para lograr generar, por ejemplo, nuevas estrategias para el control de enfermedades ¹.

¿Cuál es relevancia de descifrar el genoma de Caligus?

Con el objetivo de contribuir con nuevas estrategias para el control de la caligidosis, más sustentables económica y ambientalmente, en los últimos años un grupo de investigadores de la RP1 del Centro INCAR ha generado gran cantidad de información transcriptómica² de los distintos estados de desarrollo de *C. rogercresseyi* (Gallardo-Escárate et al., 2014). Estos estudios han permitido identificar genes involucrados en procesos biológicos de importancia para el parásito como: su desarrollo larval, reconocimiento de hospedero, maduración sexual, metabolismo, entre otros (Gallardo et al 2019). Durante el 2018 el equipo de investigación en conjunto con el Programa para la Gestión

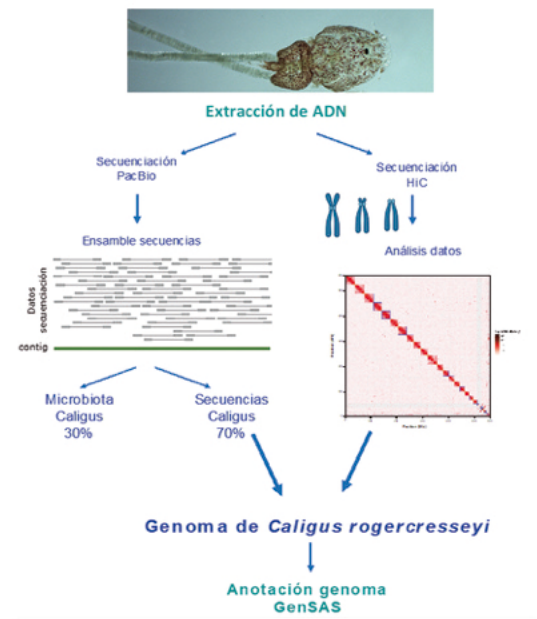


Figura 1. Esquema de trabajo para la obtención del genoma de Caligus rogercresseyi

Sanitaria en la Acuicultura (FIE-2015-V014), se propusieron obtener el primer genoma de referencia para *C. rogercresseyi*. Con la obtención del genoma de Caligus se busca incrementar la información genética del ectoparásito, caracterizar y localizar genes ligados a su biología y comprender de mejor forma los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta a antiparasitarios. Además de abrir la oportunidad de identificar moléculas con potencial antigénico para el desarrollo de vacunas, como método alternativo para el control de este ectoparásito. En este sentido el objetivo del estudio es describir por primera vez el genoma de *Caligus rogercresseyi* a escala cromosómica, mediante la utilización de las últimas tecnologías de secuenciación.

METODOLOGÍA

Hembras de *C. rogercresseyi* fueron colectadas desde salmón del Atlántico por el Laboratorio de Referencia de Caligus localizado en el laboratorio experimental del Centro INCAR-Universidad de Concepción en Dichato-Chile. Luego el ADN genómico fue extraído utilizando kit Qiagen DNA purification kit (QIAGEN). Las muestras de ADN fueron utilizadas para la síntesis de librerías y secuenciación genómica utilizando la plataforma PacBio (Fig. 1). Adicionalmente, se realizó la síntesis de librerías Hi-C utilizando el kit Phase Genomics' Animal Hi-C kit. Las librerías Hi-C fueron secuenciadas en plataforma Illumina Hiseq4000 (Fig. 1). Los datos PacBio fueron ensamblados³ utilizando el programa CANU V1.5. Los datos obtenidos para las librerías Hi-C fueron analizadas con los programas Bowtie2 y Proximo (Phase Genomics, Seattle, WA, USA). Finalmente, el genoma fue anotado utilizando la herramienta "GenSAS" (<https://www.gensas.org>).

RESULTADOS MÁS RELEVANTES

Obtención del genoma de Caligus rogercresseyi

Desde la secuenciación en la plataforma PacBio de hembras de *C. rogercresseyi* se obtuvo un total de 38,32 Gb de información de alta calidad. A partir de los cuales se generaron 25.608 contigs (727 Mb). Desde la secuenciación por PacBio se obtuvo un total de 17.711 contigs⁵ generando un primer borrador para el genoma de Caligus de 519.19 Mb. Adicionalmente, el ADN genómico de Caligus fue secuenciado mediante la técnica Hi-C. Esta técnica identifica zonas de proximidad ADN-ADN, permitiendo determinar la orientación y ubicación de los contigs a escala cromosómica. Desde la secuenciación por Hi-C se obtuvo un ensamble de 29,78 Mb. Datos que en conjunto a los obtenidos desde PacBio

permitieron formar un total de 21 pseudo-cromosomas, correspondientes a un genoma de referencia a escala cromosómica para *C. rogercresseyi* de 505.27 Mb (Fig. 2).

Comunidades microbianas asociadas a Caligus rogercresseyi

Desde los datos de secuenciación del genoma de Caligus fue posible identificar la microbiota que acompaña a este ectoparásito. Dentro de las secuencias obtenidas por secuenciación PacBio en 30% de ellas correspondieron a las bacterias propias de Caligus entre ellas se identificó *Tenacibaculum ovolyticum*, *Shewanella algicola*, *Gammaproteobacteria*, *Leucothrix mucor* (Tabla 1), bacterias que pueden ser peligrosas para los salmones, es decir Caligus podría ayudar a diseminar algunas enfermedades. Aun más, con los datos de secuenciación genómica fue posible identificar los genomas completos de las especies *T. ovolyticum*, *S. algicola* y *Dokdonia* sp.

Adicionalmente, para determinar la posibilidad de que Caligus sea un reservorio bacteriano que pudiese afectar a la industria salmonicultora, se decidió realizar un análisis de la microbiota de este ectoparásito desde distintas zonas de Chile. Para ello se recolectaron *C. rogercresseyi* desde centros de cultivo en las regiones de Los Lagos, Aysen y Magallanes

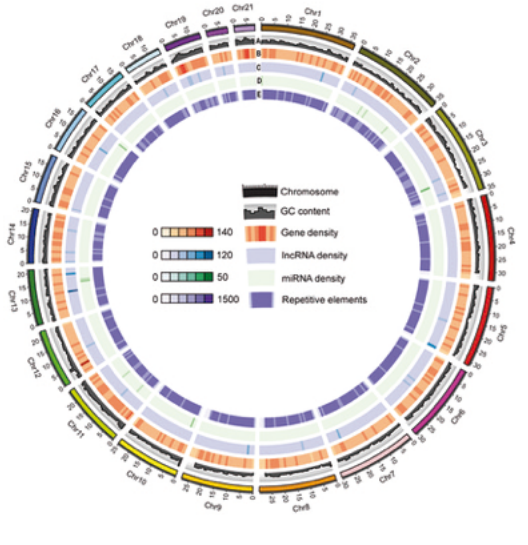


Figura 2. Genoma de Caligus rogercresseyi. Grafica circus muestra los 21 pseudo-cromosomas identificados. A) contenido GC; B) densidad de genes; C) densidad de long non coding RNAs (secuencias no codificante); D) densidad de microRNAs (secuencias no codificante); E) elementos repetitivos.

Referencia	Complejidad (%)	Tamaño Genómico	Número de Contigs	GC (%)
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i> _DSM_18103	97,87	4.275.412	1	29,86
<i>s. algicola</i>	96,71	6.415.100	1	34,48
<i>s. algicola</i>	92,73	3.523.379	1	34,40
<i>c. Gammaproteobacteria</i>	89,48	4.571.553	1	37,82
<i>Leucothrix mucor</i> _DSM_2157	83,85	4.640.432	3	47,91
<i>c. Gammaproteobacteria</i>	80,71	3.490.847	4	37,76
<i>c. Gammaproteobacteria</i>	66,27	2.811.630	1	42,94
<i>c. Gammaproteobacteria</i>	54,24	4.748.015	38	44,73
<i>k. Bacteria</i>	47,61	2.907.218	2	32,91
<i>f. Rhodobacteraceae</i>	45,63	1.837.309	1	53,65
<i>s. algicola</i>	44,62	2.356.394	1	31,49
<i>k. Bacteria</i>	43,97	2.016.283	1	42,29
<i>k. Bacteria</i>	37,93	525.029	2	39,45
<i>k. Bacteria</i>	36,21	1.532.275	1	31,32
<i>k. Bacteria</i>	32,76	1.075.212	6	31,66
<i>k. Bacteria</i>	28,45	805.616	2	38,57
<i>c. Gammaproteobacteria</i>	26,24	875.502	1	40,00
<i>k. Bacteria</i>	25,86	2.121.532	1	31,49
<i>k. Bacteria</i>	25,29	1.870.517	8	34,90
<i>k. Bacteria</i>	23,67	1.110.863	14	31,90

Tabla 1: Especies bacterianas identificadas desde datos obtenidos desde la secuenciación del genoma de Caligus rogercresseyi. La tabla muestra las veinte especies bacterianas con mayor porcentaje de completitud identificadas.

Se realizaron extracciones de ADN genómico. Con estas muestras se procedió a secuenciar el gen 16S completo mediante la plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies). Del análisis de los datos se observó diferencias en la abundancia y tipo de microbiota presente en las zonas de Chile analizadas. Por ejemplo, los Caligus obtenidos desde la región de Los Lagos presentaron mayor diversidad de comunidades bacterianas (Fig. 2). Por otra parte, se observó que los grupos bacterianos más abundantes en *C. rogercresseyi*, independiente de la región, son proteobacterias (filo bacteriano compuesta principalmente por patógenos) que representan el 60% de las comunidades bacterias identificadas. Adicionalmente, se observó que existe un grupo de comunidades bacterianas comunes (core) en las tres regiones de Chile. En este core bacteriano se identificaron Bacteroidites, Flavocertium, y Proteobacterium, principalmente Rhodobacteraceae y Vibrios.

Ahora que se conoce el genoma de Caligus, ¿qué haremos con esa información?

A partir del genoma de Caligus es posible comprender de mejor forma la biología de este organismo, por ejemplo, como responde y se adapta a cambios en el ambiente. Además es posible determinar si existen diferencias entre

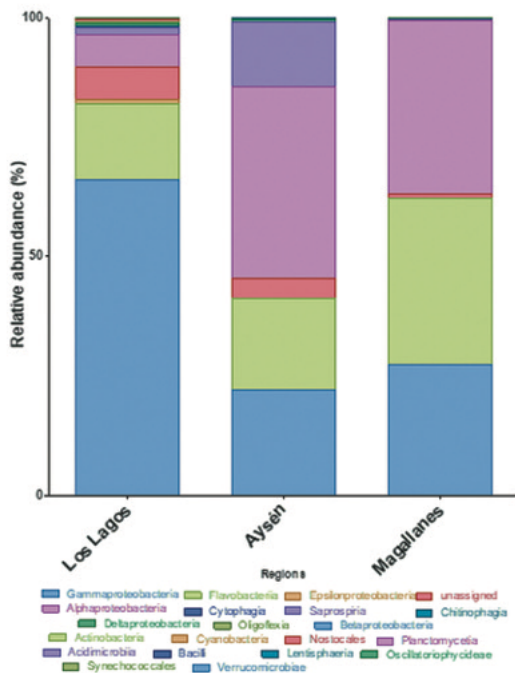


Figura 3. Diversidad bacteriana de *C. rogercresseyi* en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes.

poblaciones de *Caligus* que les permitieran desarrollarse de mejor forma en ambientes extremos (baja salinidad, baja temperatura).

Desde el punto de vista de control de este ectoparásito, tener el genoma de *C. rogercresseyi* abre la posibilidad de identificar y comprender los procesos moleculares asociados a la resistencia de farmacológica. De esta manera caracterizar y desarrollar biomarcadores para la evaluación de sensibilidad farmacológica de las distintas poblaciones de *Caligus*, o generar moléculas alternativas que permitan incrementar la eficacia de los tratamientos actuales y reducir la cantidad de baños que se realizan. Por otra parte, conocer el genoma de *Caligus* también nos permite identificar y evaluar en tiempos reducidos moléculas con potenciales antigénicos, las que pudiesen ser utilizadas para el desarrollo de vacunas contra el ectoparásito. Esta estrategia tiene la ventaja de ser una forma más sustentable para el control de *Caligus*, ya que no existe posibilidad de generación de resistencia o daños a otras especies del ecosistema.

¿Que otras implicancias nos deja el conocimiento del genoma de este parásito? y cual es la relevancia de estos resultados para políticas públicas?

La obtención del genoma de *Caligus* nos permitió determinar que este ectoparásito actúa como reservorio de bacterias potencialmente patógenas, afectando la productividad de la industria salmonera. Por lo que es indispensable incrementar las medidas de vigilancia y control de *C. rogercresseyi* en la industria salmonicultora, no sólo por las pérdidas que ocasiona en directamente en el cultivo de salmón, si no para evitar brotes de nuevas enfermedades bacterianas.

Es de primordial relevancia mantener e incrementar el apoyo a este tipo de investigación para contar con información relevante y sólida que guíe las decisiones normativas y de manejo de la producción de salmones en el mar.

NOTAS AL PIE

¹ Un buen ejemplo es que el genoma del COVID 19 ya se había descifrado en enero 2020, antes que este se declarara Pandemia.

² Se refiere a información asociada a la expresión de genes de *Caligus* en cada una de sus etapas de desarrollo.

³ Ensamblar datos se refiere a la formación de secuencias a partir de los datos obtenidos desde la secuenciación.

⁴ Anotación genoma se refiere dar nombre de un gen conocido a una secuencia, mediante búsqueda de homología con genes previamente descritos.

⁵ Contigs: secuencia obtenida del ensamble de los datos obtenidos desde la secuenciación

AGRADECIMIENTOS

La investigación ha sido financiada por el Centro INCAR a través del proyecto CONICYT-FONDAP N° 15110027, el proyecto FONDECYT regular N°1180867 y el programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura FIE-2015-V014.

REFERENCIAS

- Costello, M.J., 2009. How sea lice from salmon farms may cause wild salmonid declines in Europe and North America and be a threat to fishes elsewhere. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 276, 3385-3394.
- Dreschner, J., Chavez, C., Quiroga, M., Jimenez, D., Artacho, P., Tello, A., 2019. Impact of *Caligus* treatments on unit costs of heterogeneous salmon farms in Chile. *Aquacult Econ Manag.* 23, 1-27.
- Gallardo-Escárate, C., Valenzuela-Muñoz, V., Núñez-Acuña, G., 2014. RNA-Seq analysis using de novo transcriptome assembly as a reference for the salmon louse *Caligus rogercresseyi*. *Plos One.* 9, e92239.

CONTACTO

Dra. Valentina Valenzuela: valevalenzuela@gmail.com