

Biología molecular de los peces: Interés y aplicaciones

Rocha, A.², Ruiz, S.², Estepa, A.¹ y Coll, J.M.²

¹ Ctr. Bioquímica y Biología Molecular. Univ. Miguel Hernández. Elche (España)

² INIA, SGIT - Dept Biotecnología - Crt. Coruña Km 7, Madrid (España)

Tel: +34-1-3476850 / Fax: +34-1-3572293

Resumen

Una consecuencia de la tradición española en consumo de pescado ha sido el impresionante desarrollo de la Acuicultura marina intensiva durante las últimas décadas hasta constituirse en un sector de importancia estratégica para España. A la producción inicial de mejillón y trucha han seguido las de dorada, rodaballo y lubina y más de 20 especies están en distintas fases de I + D (Coll, 2001a). Sin embargo, la velocidad de desarrollo de estas especies ha ido muy por delante de los conocimientos de su biología molecular si se compara con los de otras especies agrícola-ganaderas. Debido a que del estudio de la biología molecular, genómica y proteómica de estas y otras especies modelo puede lograrse un mayor aprovechamiento de las tecnologías desarrolladas con tanto esfuerzo, sería conveniente intensificar su investigación. Además de mejorar la producción de alimento, el uso para modelos de enfermedades genéticas humanas, para detectores de contaminación y para biofactorías de productos farmacéuticos, constituyen aplicaciones a medio-largo plazo de estos estudios básicos. El Plan Nacional de I+D+I (2000-2003) y el Plan estratégico de actuación INIA para el trienio 2001-2003 ya exponen el deseo de potenciar el desarrollo de estas posibilidades, sin embargo es necesario que los investigadores españoles den un mayor empuje a estos temas.

Summary

The recent development during the last decades of the spanish marine aquaculture has been a consequence of the traditional consumption of fish and fishery products up to the point of constituting an strategic sector in Spain.. To the initial production of mussels and trout, the sea bream, turbot and sea bass and more than 20 other species now in different stages of R+D have followed. However, the development of the culture of these species have been faster than the knowledge of its molecular biology as compared with other grown species. The study of its molecular biology, genomics and proteomics and of those other model species will precede a better use of these technologies, so that it will be convinient to intensify focused research. Further to their use as human food, other applications are the use of fish species as human genetic disease models, to detect contamination and as biofactories for pharmaceutical products. The National Plan of R+D+I (2000-2003) and the strategic INIA plan for 2001-2003 already put emphasis to potentiate the development of these possibilities, however the researches have yet to take advantage of these politics.

La Acuicultura en España.

La figura 1 esquematiza la evolución en España de las especies con producción de al menos unas 10.000 Tm por año, tales como el mejillón (*Mytilus edulis*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la dorada (*Sparus auratus*), el rodaballo (*Psetta maxima*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*). Esta producción (Coll, 2001a) significa alrededor del 18% de la pesca española, 25% de la acuicultura de Europa y 3% de la acuicultura del mundo (Bostock, 1998; Fernández, 1999; González-Serrano *et al.*, 1999). Después del cultivo del mejillón (tecnología artesanal) y de la trucha (tecnología importada), para llegar a estas cifras se invirtió en I + D un total de más de 70 millones de Euros desde 1982 (Espinosa De Los Monteros *et al.*, 1999). Ello ha dado lugar a una tecnología propia que sería deseable aprovechar al

máximo. La previsible saturación de la producción de algunas especies para consumo humano ("plateaus" de la Figura 1) y la alta inversión hecha en I + D, deberían impulsar a buscar alternativas para estas complejas tecnologías. Sin embargo, las alternativas necesitan de un mayor conocimiento básico de la biología molecular de las especies acuicultivadas.

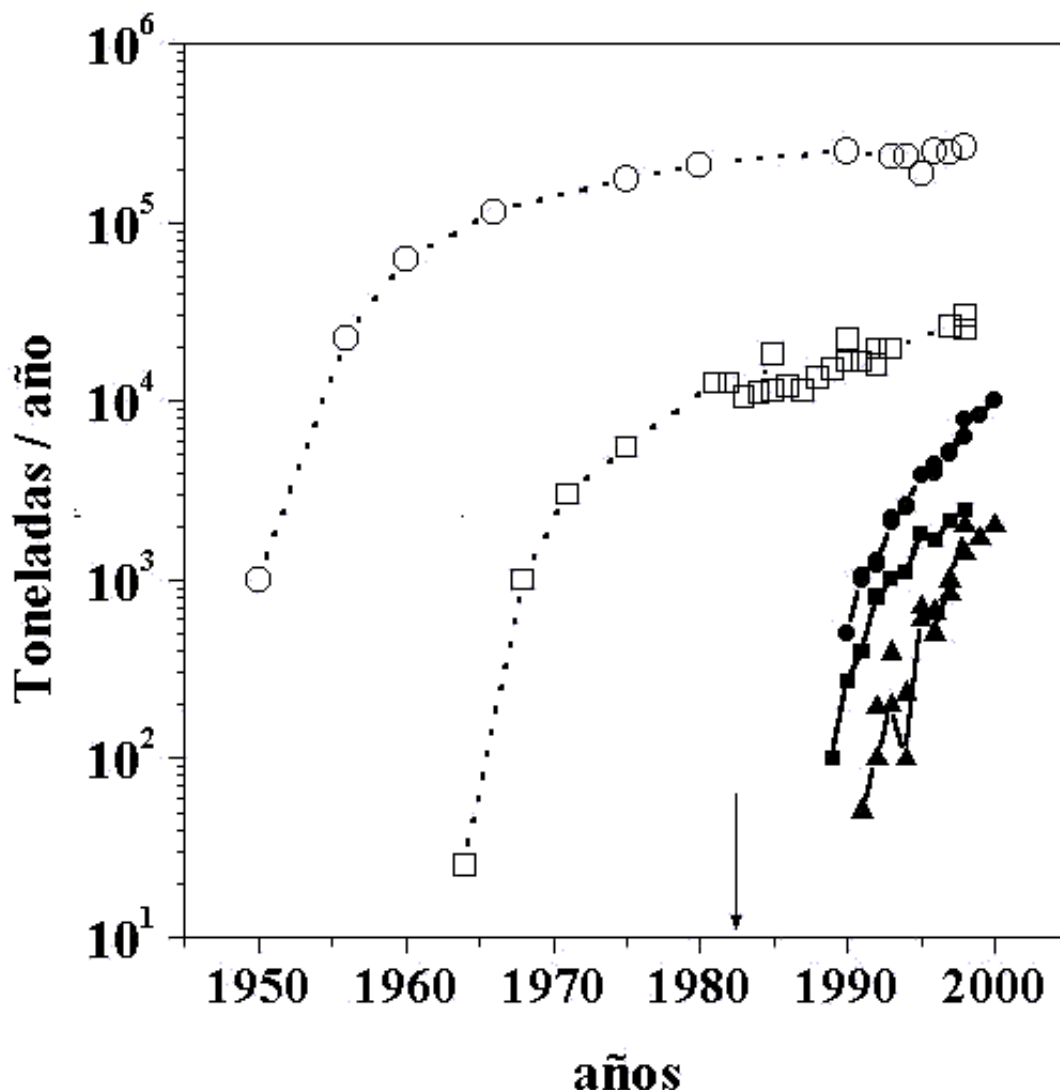


Figura 1. Evolución de la producción piscícola española. Especies más importantes. De los datos del mismo año obtenidos de más de una fuente, se han representado sus medias y las desviaciones standard (Bostock, 1998; Espinosa de los Monteros et al., 1999; González-Serrano et al., 1999; Vergara, 2000).

↓ : comienzo de programas de I + D.

○ : mejillón

■ : trucha

● : dorada

■ : rodaballo

▲ : lubina.

Temas de investigación en biología molecular de peces.

El Plan Nacional de I+D+I para el periodo 2000-2003 actualmente vigente, comenta: "2.1. ... es evidente la relevancia económica que está adquiriendo la manipulación genética para la generación de especies animales como sistemas de producción de sustancias de alto valor añadido. Los animales transgénicos pueden ser excelentes modelos para estudiar distintas enfermedades humanas y son potenciales candidatos para servir como fuente de tejidos u órganos para trasplantes. Sería necesario desarrollar la tecnología para la clonación de animales de uso en ganadería, avicultura o acuicultura."

Además en la convocatoria de proyectos del 2001, en los temas de modificación genética de especies animales, se propone dar prioridad a la utilización de peces como sistemas de producción y modelos. La tecnología de la manipulación genética necesita de una mayor investigación pero sobre todo para aplicarla correctamente a las especies piscícolas se necesita conocer con más detalle la biología molecular de estas especies. La Tabla 1 resume las posibles aplicaciones que a través de los estudios de biología molecular y de la manipulación genética podrían obtenerse. Se han agrupado en 4 categorías: modelos de enfermedades humanas, detección de contaminantes, biofactorías de productos farmacéuticos y mejora como alimento.

Aplicaciones	Ejemplos	Especies
Mutantes como modelos biomédicos	- Anemia - Talasemia - Porfiria - Malformaciones corazón - Diabetes	Pez cebra Medaka
Detección de contaminación	- Metales - Aromáticos - Compuestos Electrófilos	Pez cebra Medaka
Biofactorías	- Productos farmacéuticos (anti-víricos, bióticos, vacunas, hormonas) - Productos industriales (pegamentos, etc.)	Salmón Trucha Dorada Lubina Rodaballo.
Mejoras para alimento (Acuicultura)	- Ambiental (O₂, temp., salinidad) - Biología (crecimiento, % carne, conversión pienso, fecundidad) - Apariencia externa (sabor, olor, textura, ácidos grasos) - Resistencia a enfermedades (lisozima, Mx, autovacunas)	Salmón Trucha Dorada Lubina Rodaballo.

Tabla 1: Aplicaciones de la biología molecular en peces.

Investigación en biología molecular de peces

Hasta ahora, la investigación básica se ha desarrollado sobre todo en genética, enfocada al pez cebra (Figura 2) y a su desarrollo embrionario (Figura 3). Por ejemplo, se están usando retrovirus que contienen la glicoproteína G del rabdovirus VSV (pseudotipos) para mutagénesis insercional masiva (Gaiano y Hopkins, 1996) y es uno de los modelos en los que se avanza en el descubrimiento y aplicaciones de los transposones de vertebrados como posibles vectores de transferencia de genes (Ivics, Izsvak y Hackett, 1996; Ivics *et al.*, 1996; Izsvak, Ivics, y Hackett, 1997; Lam, Lee, y Gilbert, 1996; Coll, 2001b). Por otra parte, el pez cebra es uno de los peces que se encuentran más cercanos a la completa secuenciación de su genoma (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio).



Figura 2. Aspecto de peces cebra adultos en un acuario.

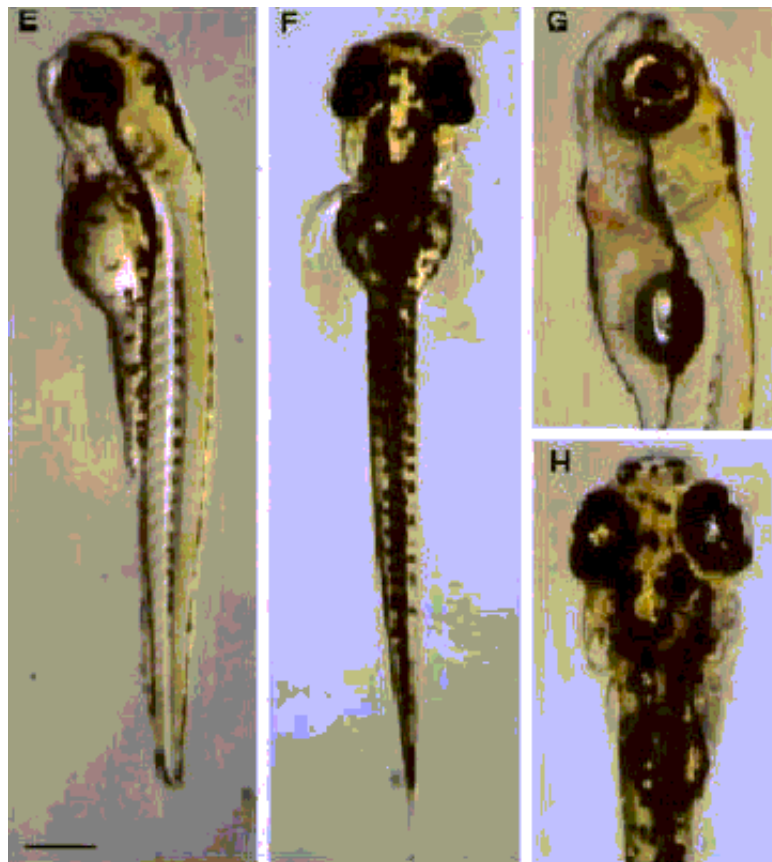


Figura 3. Pez cebra recién eclosionado. La barra es de unas 100μ .
E,G vista lateral completa. F,H vista desde arriba

Sin embargo estamos aún en los comienzos y se necesita ampliar estas investigaciones tanto en peces modelo pez cebra o medaka como en las especies que se cultivan a gran escala (salmón, trucha, dorada, lubina, rodaballo, etc.).

Los estudios de biología molecular en peces no sólo permiten imaginar una posible gran versatilidad en cuanto al mejor aprovechamiento de estas especies como alimento humano sino que además ofrecen otras posibilidades como la reprogramación de especies comercializables, y su aprovechamiento como modelos sobre crecimiento, enfermedades genéticas y desarrollo aplicables a otros vertebrados incluido el hombre (Hackett y Alvarez, 2000; Burkhart, 2000).

Después de la primera reunión nacional de un grupo de laboratorios españoles inicialmente interesados en promover la biología molecular de peces en España (INIA, 16 de Noviembre de 2001), se llegó a la conclusión de que se necesita desarrollar una serie de herramientas de trabajo para cada una de las especies comercialmente importantes (Figura 1) y de las especies modelo (pez cebra y medaka, principalmente), antes de poder afrontar el desarrollo de las posibles aplicaciones (Tabla 1). Para promover estos desarrollos los participantes se han constituido en una red nacional en la que participan investigadores con intereses amplios (<http://www.inia.es/sitemapa/pags/redes/peces/BiolMolPez.htm>), de la que se irán desarrollando redes europeas dedicadas a aplicaciones o intereses más específicos conforme estos se vayan definiendo por intereses comunes.

Las herramientas, reactivos o tecnologías necesarias se agruparon en:

1. Estudio y caracterización de los reguladores de la expresión en las especies seleccionadas tales como promotores, amplificadores, factores de transcripción, etc., implicados en la regulación de la transcripción. Por ejemplo, identificación, aislamiento y caracterización de genes de peces y de sus elementos reguladores implicados en el crecimiento y el desarrollo. Bioquímica y composición de los huevos, de sus proteínas, genes y promotores implicados. Inmunología y mecanismos de defensa específicos (anticuerpos, inmunología celular) e inespecíficos (PCR, Mx, lisozima). Metabolismo y fisiología del músculo. Bioquímica/genética de moléculas de interés farmacéutico (insulina, factor VII, calcitonina, etc.), etc.
2. Obtención de librerías genómicas y de cDNA de las especies de seleccionadas que pudieran estar a disposición de todos los laboratorios españoles interesados. Genómica y proteómica (DNA y/o proteína arrays, tecnologías de mapeo de genes, etc.).
3. Desarrollar métodos de transfección de cigotos en masa y definir marcadores moleculares que permita seguir los transgenes en las distintas generaciones, y si están integrados o no.
4. Mejora de la integración de DNA de una manera controlada en el genoma de las especies de peces seleccionadas.
5. Desarrollar líneas celulares incluyendo líneas de células madre para cada una de las especies seleccionadas, con lo que podría constituirse un banco de conservación de líneas celulares como servicio a todos los laboratorios nacionales interesados en trabajar con dichas células.
6. Abordaje de algunas de las aplicaciones clasificadas en la Tabla 1. para lo que se constituirían redes europeas especializadas tales como la que se está iniciando sobre "Fish Biofactory Network" (<http://www.inia.es/sitemapa/pags/redes/peces/indexredbiopez.htm>)

El pez cebra como modelo de enfermedades humanas

El modelo del pez cebra inicialmente se originó para el estudio del desarrollo embrionario en vertebrados. Este modelo genético es un puente entre los modelos animales más estudiados: entre la *Drosophila* (mosca) / *Caenorhabditis* (gusano) y el ratón/hombre. El pez cebra es único para obtener y mantener miles de mutantes gracias a sus especiales características (Tabla 2). Muchos de los fenotipos de los mutantes del pez cebra ya obtenidos se parecen a algunas enfermedades genéticas caracterizadas en el hombre, aportando un poderoso instrumento para ahondar en las correspondientes patologías humanas. Los recientes desarrollos en genómica y

los que aguardan de proteómica tendrán un fuerte impacto en estas aplicaciones.

Conceptos	Valores
Mantenimiento	bajo coste
Espacio	pequeño: 30 animales/20 L
Maduración sexual	a los 4 meses después de la eclosión
Reproducción	controlable por alimentación y luz
Descendencia	200-400 huevos/hembra/2 semanas
Desarrollo embrionario	documentado a nivel genético
Tiempo desarrollo embrión	3-4 días
Características embriones	transparentes
Alimentación	seco y vivo
Stock de mutantes	actualmente miles

La biología del pez cebra (*Danio rerio*) comenzó a estudiarse en la Universidad de Oregón en los años 70-80 y allí se constituyó el principal portal que da acceso a las tecnologías desarrolladas desde entonces en la red internacional del pez cebra (<http://zfin.org/>). El genoma del pez cebra es de $\sim 1.7 \times 10^9$ pb (el humano es de $\sim 3 \times 10^9$ pb).

Tabla 2: Características del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo para investigaciones en biología molecular de peces.

El denominado clonaje posicional es posible en el pez cebra gracias al desarrollo de librerías públicas que contienen fragmentos de su genoma en vectores (YAC, PAC y BAC). Por ejemplo, uno de los primeros proyectos de este tipo permitió el aislamiento del gen SAU. Los mutantes en este gen tenían células rojas en la sangre, pero no fabricaban hemoglobina. Pacientes humanos con mutaciones en su correspondiente gen tienen una enfermedad muy similar al mutante SAU del pez cebra, llamada anemia sideroblástica congénita. Ello permitió establecer al pez cebra como el primer modelo animal de esta enfermedad genética humana. Otros fenotipos de mutantes de pez cebra se han descubierto con enfermedades paralelas en humanos tales como la porfiria, β -talasemia, anemia hipocrómica, deformaciones de la aorta, riñón policístico, etc. (Barbazuk *et al.*, 2000). Actualmente se estudian diferentes órganos y sus mutantes para detectar similitudes entre el pez cebra y el hombre. De su estudio dependen quizá posibles soluciones a numerosas enfermedades genéticas (Zon, 2000) y ya existe un banco de datos a este respecto (<http://www.nih.gov/science/models/zebrafish/reports/genomic-genetic.html>). ¡Queda mucho por descubrir!.

Aunque se sabía que el genoma del hombre y el del ratón contenían regiones de genes muy similares (sinténicos), no se esperaba que las estructuras de los cromosomas del pez cebra se parecieran tanto a las humanas. Sin embargo se han descrito muchos loci en los que esta similitud ya se ha demostrado (Barbazuk *et al.*, 2000). Es por ello que se pueden buscar genes candidatos a enfermedades o anomalías en regiones cromosómicas humanas definidas por mutaciones en el pez cebra. Este análisis puede servir como complemento al Proyecto Genoma Humano, ya que aunque este proyecto está produciendo enormes cantidades de información estructural (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>), no dispone de información funcional para muchos de los genes (ORF, open reading frames) descubiertos. El pez cebra podría pues proporcionar un adecuado complemento a

esta estrategia dado que por supuesto no es posible ni deseable el poder experimentar en humanos (Dooley y Zon, 2000).

Detección de compuestos contaminantes

Las alteraciones morfológicas en el desarrollo embrionario del pez cebra se han utilizado desde hace años para estudiar los efectos de los contaminantes. Actualmente se utilizan genes marcadores (por ejemplo la GFP, proteína verde fluorescente) bajo promotores sensibles a los contaminantes y se está comenzando a estudiar la expresión genómica diferencial en el pez cebra con microarrays (http://www.who.edu/coastalresearch/research/projects_stegeman_hahn.html). Esto ha sido posible gracias a los numerosos estudios básicos anteriores sobre promotores específicos de pez cebra (Ju *et al.*, 1999) e inducibles por metales pesados. Recientemente, se han usado peces cebra modificados genéticamente de tal manera que expresan una proteína fácilmente detectable (gen marcador) (Amsterdam, Lin, y Hopkins, 1995; Peters *et al.*, 1995) cuando aumentan los niveles de metales pesados ó de compuestos aromáticos ó electrófilos que son residuos de contaminación (Carvan *et al.*, 2000b). El efecto se consigue utilizando construcciones genéticas en las que los genes marcadores se expresan bajo promotores inducibles por estos compuestos. Cuando aumenta la concentración, por ejemplo, de cadmio, el promotor se activa y se produce β -galactosidasa ó GFP en el pez cebra que lleva genéticamente incorporada la construcción correspondiente (Carvan *et al.*, 2000a).

Utilización de peces como biofactorías

Otra de las importantes aplicaciones que tiene la biología molecular de peces y que quizás sea la menos explotada, es la utilización de los animales acuicultivados para la producción de sustancias de elevado valor económico que necesita la industria farmacéutica. Aunque en España esta opción no se ha valorado lo suficiente, la utilización de peces transgénicos como biofactorías se lleva desarrollando en EEUU desde hace algunos años. Por ejemplo, la empresa Philippine Council for Aquatic and Marine Research and Development (PCRMA) está trabajando en colaboración con empresas canadienses en el desarrollo de tilapias genéticamente modificadas para la producción de insulina humana y la empresa Meanwhile the Shida Canning Co. Ltd en la producción de colágeno, también, a partir de peces (Bostock, 1998). Recientemente se está iniciando una red europea-española para coordinar esfuerzos en este área (<http://www.inia.es/redes/peces/IndexBiopez.htm>) .

Mejora de las especies piscícolas como alimento

Casi agotadas las posibilidades que ofrecen los métodos tradicionales de mejora genética animal, la Acuicultura ha recurrido a la biología molecular/biotecnología para obtener animales modificados genéticamente que tengan una mayor tasa de crecimiento (Devlin *et al.*, 1995a; Du *et al.*, 1992; Dunham, 1999; Izsvak *et al.*, 1999), mejor resistencia al frío (Devlin *et al.*, 1995b; Hew *et al.*, 1999) o a las enfermedades (Gong y Hew, 1995; Hew, Fletcher, y Davies, 1995), etc. Por ejemplo, el salmón del Atlántico modificado genéticamente obtenido con el gen de la hormona de crecimiento del salmón chinook puede incrementar su peso corporal hasta casi un 1000% (Hackett y Alvarez, 2000).

En la actualidad, el número de especies de peces modificadas genéticamente es

superior al número del resto de especies de vertebrados modificadas tomadas en conjunto (Pinkert, 1999). Ello es debido a que salvo raras excepciones, los embriones de pez presentan muchas ventajas sobre los de mamíferos, entre otras:

- i. Las hembras ponen muchos huevos lo que permite disponer de abundante material de trabajo genéticamente uniforme,
- ii. En la mayoría de los casos la fecundación es externa, con lo que no se necesita manipulación posterior de los embriones fecundados hasta la eclosión (por el contrario, los embriones de mamífero tienen que ser implantados posteriormente en una hembra receptiva) (Gong y Hew, 1995) y
- iii. Son mas baratos de obtener y mantener que los mamíferos (Moffat, 1998).

Sin embargo,

- i. La eficiencia de la inserción del DNA en los cromosomas de peces es menor que en mamíferos (Hackett y Alvarez, 2000),
- ii. Tienen un pronúcleo que no es visible, por lo que la microinyección del DNA en él es prácticamente imposible y
- iii. Están rodeados de un corion muy rígido que en algunas ocasiones es necesario retirar por métodos mecánicos o enzimáticos (Hackett y Alvarez, 2000).

Estas dificultades se han intentado superar utilizando métodos masivos para introducir el DNA en los embriones como por ejemplo, la dudosa electroporación del espermatozoides antes de la fecundación (Symonds, Walker, y Sin, 1994), la electroporación de embriones (Chen *et al.*, 1996), la utilización de vectores retrovirales (Lu, Burns, y Chen, 1997), etc. Aunque algunos de estos métodos han tenido relativo éxito en algunas especies, hoy por hoy, la microinyección citoplasmática del DNA continua siendo el método mas efectivo (Chourrout, Guyomard, y Houdebine, 1986; García-Pozo *et al.*, 1998). Sin embargo y a pesar de que muchas de las especies de peces modificados (salmón, carpa, trucha, tilapia, pez gato, etc.), están ya preparadas para "salir al mercado", su comercialización aún no está autorizada en ningún país. Entre otras, las razones argumentadas para su prohibición son, el peligro que podrían suponer para las poblaciones naturales (Reichhardt, 2000) y los posibles riesgos para la salud humana, peligros y riesgos que hasta ahora son desconocidos.

Agradecimientos

Se agradece la mecanografía a J.P. Coll. Este trabajo se desarrolló durante la financiación de los proyectos CT98-4003 y CT98-4398 del FAIR de la UE y CICYT AGF98-590 y del INIA SC00046.

Referencias

- **Amsterdam, A., Lin, S. y Hopkins, N.** (1995). The Aequorea victoria green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Developmental Biology* 171, 123-129.
- **Barbazuk, W. B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J. A., McPherson, J. D. y Johnson, S. L.** (2000). The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Research* 10, 1351-1358.
- **Bostock, J.** (1998). *Animal pharm's complete guide to aquaculture*. Animal Pharm's reports of University of Stirling. Institute of Aquaculture. PJB publications Ltd. 1, 1-229.
- **Burkhart, J. G.** (2000). Fishing for mutations. *Nature Biotechnology* 18, 21.

- **Carvan, M. J., Dalton, T. P., Stuart, G. W. y Nebert, D. W.** (2000a). Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Annual New York Academy Science* 919, 133147.
- **Carvan, M. J., Solis, W. A., Gedamu, L. y Nebert, D. W.** (2000b). Activation of transcription factors in zebrafish cell cultures by environmental pollutants. *Archives Biochemistry Biophysics* 376, 320-327.
- **Chen, T., Lu, J., Shambloot, M. J., Cheng, C. M. y Lin, C.** (1996). Transgenic fish: Ideal models for basic research and biotechnological applications. *Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols*. ed Ferraris, J.D. and Palumbi, S.R. ed Wiley-Liss, Inc, 401p.
- **Chourrout, D., Guyomard, R. y Houdebine, L. M.** (1986). High efficiency gene transfer in rainbow trout by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture* 51, 143-150.
- **Coll, J. M.** (2001a). Actualidad y futuro de la Acuicultura española. *AquaTIC* 14, http://aquatic.unizar.es/n3/art1403/acuicultura_sp.htm.
- **Coll, J. M.** (2001b). El transposon SB de salmonidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. *Investigaciones Agrarias* en prensa.
- **Devlin, R. H., Yesaki, T. Y., Donaldson, E. M., Du, S. J. y Hew, C. L.** (1995a). Production of germline transgenic pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Canadian Journal Fish Aquatic Sciences* 52, 1376-1384.
- **Devlin, R. H., Yesaki, T. Y., Donaldson, E. M. y Hew, C. L.** (1995b). Transmission of phenotypic effects of an antifreeze GH gene construct in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 137, 161-169.
- **Dooley, K. y Zon, L. I.** (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion Genetics Development* 10, 252-256.
- **Du, S. J., Gong, G. L., Fletcher, G. L., Shears, M. A., King, M. J., Idler, D. R. y Hew, C. L.** (1992). Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology* 10, 176-181.
- **Dunham, R. A.** (1999). Comparison of traditional breeding and transgenesis in farmed fish with implications for growth enhancement and fitness. *Transgenic Animals in Aquaculture*. Murray, J.D. et al. ed CABI Pub.Co, Wallingford, UK, 209p.
- **Espinosa de los Monteros, J., Diaz, V. B., Labarta, U. F., Muñoz, E. R., Toribio, M. A. T. y Ruiz, A. M.** (1999). Evaluación de las actividades de investigación y desarrollo tecnológico en acuicultura en el periodo 1982/1997. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. 1, 1-136.
- **Fernandez, C.** (1999). Estado actual y perspectivas futuras del mercado de la dorada y lubina, España y Portugal. *Documentos Trouw España* 2, 10.
- **Gaiano, N. y Hopkins, N.** (1996). Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish. *Nature* 383, 829-832.
- **Garcia-Pozo, S., Bejar, J., Shaw, M. y Alvarez, M. C.** (1998). Effect of exogenous DNA microinjection on early development response of the seabream (*Sparus aurata*). *Molecular Marine Biology Biotechnology* 7, 248-253.
- **Gong, Z. y Hew, C. L.** (1995). Transgenic fish in aquaculture and developmental biology. *Current Topics Developmental Biology* 30, 177-214.
- **González-Serrano, J. L., Delgado, J. N., Torrent, F. B., Ortega, R. L., Mediavilla, M. G., Ortiz, A. L., Ramirez, A. D., Molina, A. G. y Claver, I. F.** (1999). *Conclusiones del borrador del libro blanco de la Acuicultura en España*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 1, 1-96.
- **Hackett, P. B. y Alvarez, M. C.** (2000). The molecular genetics of transgenic fish. Recent advances in Marine Biotechnology. ed.Fingerman, M.Nagabhushanam,R. 4: *Aquaculture*. part B Fishes, 77-145.
- **Hew, C., Poon, R., Xiong, F., Gauthier, S., Shears, M., King, M., Davies, P. y Fletcher, G.** (1999). Liver-specific and seasonal expresion of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic Research* 8, 405-414.
- **Hew, C. L., Fletcher, G. L. y Davies, P. L.** (1995). Transgenic salmon: Tailoring the genome for food production. *Journal Fish Biology* 47, 1-19.
- **Ivics, Z., Izsvak, Z. y Hackett, P. B.** (1996). Repeated sequence elements in zebrafish and their use in molecular genetic studies. *Zebrafish Science Monitor* 3, http://zfin.org/zf_info/monitor/vol3.6/3.html.
- **Ivics, Z., Izsvak, Z., Minter, A. y Hackett, P. B.** (1996). Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proceedings National Academy Sciences USA* 93, 5008-5013.
- **Izsvak, Z., Ivics, Z. y Hackett, P. B.** (1997). Repetitive elements and their genetic applications in zebrafish. *Biochemical Cell Biology* 75, 507-523.
- **Izsvak, Z. I., Shimoda, N., Mohn, D., Okamoto, H. y Hackett, P. B.** (1999). Short inverted-repeat transposable elements in teleost fish and implications for a mechanism of their amplification. *Journal Molecular Evolution* 48, 13-18.
- **Ju, B., Xu, Y., He, J., Yan, Y., Hew, C. L., Lam, T. J. y Gong, Z.** (1999). Faithful expresion of green fluorescent protein (GFP) in transgenic zebrafish embryos under control of zebrafish gene promoters.

Developmental genetics 25, 158-167.

- **Lam, W. L., Lee, T. S. y Gilbert, W.** (1996). Active transposition in zebrafish. *Proceedings National Academy Sciences USA* 93, 10870-10875.
- **Lu, J. K., Burns, J. C. y Chen, T.** (1997). Pantropic retroviral vector integration, expression and germline transmission in medaka (*Oryzias latipes*). *Molecular Marine Biology Biotechnology* 6, 289-294.
- **Moffat, A. S.** (1998). Improving gene transfer into livestock. *Science* 282, 1619-1620.
- **Peters, K. G., Rao, P. S., Bell, B. S. y Kindman, L. A.** (1995). Green fluorescent fusion proteins: powerful tools for monitoring protein expression in live zebrafish embryos. *Developmental Biology* 171, 252-257.
- **Pinkert, C. A.** (1999). *Transgenic farm animals*. Transgenic Animals in Aquaculture. Murray, J.D. et al. ed CABI Pub.Co. Wallingford, UK., 1p.
- **Reichhardt, T.** (2000). Will souped up salmon sink or swim? *Nature* 406, 10.
- **Symonds, J. E., Walker, S. P. y Sin, F. Y. T.** (1994). Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA: Evidence of enhanced sperm/DNA association. *Aquaculture* 119, 313-327.
- **Vergara, J. M. M.** (2000). Consideraciones socio-economicas sobre el momento actual de la acuicultura marina en España. *AquaTIC* 10, 1-11 <http://aquatic.unizar.es/n2/art1006/gia.htm>.
- **Zon, L.** (2000). Zebrafish: a new model for human disease. *Genome Research* 9, 99-100.



AquaTIC

Artículo publicado en la Revista AquaTIC nº 15, noviembre 2001