

## Variación genética para caracteres de crecimiento a diferentes edades en corvina (*Argyrosomus regius*), usando dos nuevas PCR múltiplex en la asignación parental bajo condiciones de puesta masal.

Mohamed Soula<sup>1</sup>, Davinia Negrín-Báez<sup>1</sup>, María J. Zamorano<sup>1</sup>, Ana Navarro<sup>1</sup>, Juan J. Sánchez<sup>2</sup>, Juan M. Afonso<sup>1</sup>

**1** Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA). Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM). Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA). Carretera Trasmontaña s/n, 35413, Arucas, Las Palmas.

**2** Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INT). Campus de Ciencias de la Salud. La Cuesta 38320, La Laguna (Sta. Cruz de Tenerife).

corresponding author: Juan M. Afonso (jafonso@dpat.ulpgc.es)

**Resumen.** En este trabajo, fueron estimadas por primera vez para corvina (*Argyrosomus regius*) las heredabilidades y correlaciones genética y fenotípicas para diferentes edades a lo largo del crecimiento, considerando las tallas comerciales de alevín y adulto. Se usaron dos PCR múltiplex, una específica (STRS) y otra interespecífica (STRI), compuesta por un total de 17 microsatélites, para reconstruir la matriz de parentesco. Se analizaron un total de 577 (76 reproductores, 494 descendientes y 7 individuos salvajes). El número de alelos varió entre 2 y 13, y las heterocigosidades medias observadas fueron de 0.61 y 0.59 para STRI y STRS, respectivamente. La probabilidad de exclusión combinada para cada múltiplex fue superior a 0,99, mientras que el valor medio del contenido de información polimórfica fue de 0,56 para ambas. Ambas múltiplex permitieron la asignación con éxito del 77,7% de los descendientes a una sola pareja de reproductores (22 hembras y 21 machos, de los 76 que contribuyeron a la puesta). Se realizaron estimas de variación genética aditiva para el peso y la longitud a las edades arriba mencionadas.

**Palabras claves:** corvina, mejora genética, microsatélites, heredabilidad.

## Introducción

La corvina (*Argyrosomus regius*) es una nueva especie emergente en la acuicultura mediterránea, debido a su rápido crecimiento y su adaptación al manejo durante el período de la cría (Quemener, 2002). Estos últimos años, tanto la demanda del mercado en alevines de corvina como los estudios de investigación han aumentado considerablemente (Roo *et al.*, 2010). Sin embargo, hay escasos estudios genéticos, cuando la mejora genética, a diferencia de la realizada en los aspectos de manejo, son acumulables y permanentes. Al igual que en otras especies de cultivo, la producción de corvina se realiza a través de puesta masal. Esta técnica favorece la obtención de una gran cantidad de huevos pero impide el reconocimiento de la genealogía, lo cual es imprescindible para el control de la consanguinidad y la estimación de la variabilidad genética. Los marcadores microsatélites han sido ampliamente usados para la reconstrucción de las relaciones familiares (Liu y Cordes, 2004, Navarro *et al.*, 2008). En estos últimos años, se han aislado un gran número de marcadores microsatélites en los Scianidos (O'Malley *et al.*, 2003, Archangi *et al.*, 2009). Recientemente, se han publicado 23 en corvina en la NBCI por Porta *et al.* (2010). La PCR múltiplex reduce los costos, el tiempo y los errores de genotipado (Navarro *et al.*, 2008), sin embargo no existe en corvina ninguna múltiplex descrita en la bibliografía.

Por todo esto, los objetivos de este estudio son:

a) Desarrollar PCR múltiplex compuestas por un alto número de microsatélites polimórficos con el fin de reconstruir de manera eficiente el pedigrí de corvina y poder realizar estudios genéticos.

b) Estimar parámetros genéticos para los caracteres económicamente importantes, en las mismas condiciones que trabaja la industria, y con ello dar consejo genético a las empresas.

## Material y métodos

Para la puesta a punto de las múltiplex se rediseñaron 49 juegos de cebadores microsatélites (Turner *et al.*, 1998; O'Malley *et al.*, 2003; Farias *et al.*, 2006; Archangi, *et al.*, 2009; Porta *et al.*, 2010) para ser amplificados en las mismas condiciones. Se evaluó su amplificación, rango alélico y variabilidad y se seleccionaron 18 que se combinaron en dos reacciones multiplex robustas, una compuesta de 10 microsatélites interespecíficos (STRI) y la otra de 8 microsatélites específicos (STRS). Las condiciones de las PCRs multiplex se optimizaron siguiendo las recomendaciones de Navarro *et al.* (2008).

Para la estima de parámetros genéticos se criaron descendientes de una puesta masal de un stock 76 reproductores (38 hembras y 38 machos) del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM, Islas Canarias, España) en las mismas instalaciones. A los 120 días se pesaron y midieron y se marcaron con PIT según Navarro *et al.* (2006). A las edades de 150 y 296 días se realizaron muestreos de peso y longitud y a la edad de 446 días se sacrificaron.

Tanto a los descendiente como los reproductores se les extrajo el el ADN siguiendo el método de fenol-cloroformo descrito por Sambrook *et al.* (1989) y se genotiparon usando las múltiplex optimizadas en este estudio. Los genotipos se leyeron en el GeneMapper (v3.7) y se determinaron las relaciones parentales-filiales, mediante el programa VITASSING (v8.2.1) (Vandeputte *et al.*, 2006). Los parámetros genéticos se estimaron con un modelo animal, siendo el tanque el efecto fijo y el animal efecto aleatorio, usando el programa VCE v6.0 (Kovač *et al.*, 2002).

## Resultados y discusión

Respecto a los resultados de las múltiplex, la lectura de los alelos fue fácil, especialmente en la STRS. Sólo el marcador UBA53 en la STRI fue difícil de identificar debido a la morfología del pico. Los parámetros de variabilidad genética se muestran en la Tabla 1. En comparación con otras poblaciones de peces esta variabilidad fue baja posiblemente debido a la constitución del stock. El alto valor de coascendencia (0,41) dentro del lote del ICCM lo confirma. Martínez-Rodríguez *et al.* (1998) y Alarcón *et al.*, (2003) observaron también una disminución del índice de polimorfismo en lubinas y doradas procedentes de reproductores criados en cautividad. Esto pone de relieve la importancia de estas múltiplex para el control de la consanguinidad en la formación de lotes de reproductores, más aun teniendo en cuenta que es una especie nueva.

La tasa de asignación parental fue baja utilizando por separado cada una de las PCRs múltiplex (12% con la STRI y 8,7% con la STRS). Sin embargo, usando ambas se consiguió asignar correctamente el 77,7% de los descendientes a una sola pareja de padres y el 7,6% a dos parejas de padres potenciales.

En los 427 individuos asignados correctamente, se representaron un total de 51 familias de hermanos carnales de 21 machos y 22 hembras. A partir de éstos se estimaron los parámetros genéticos para el peso y la longitud a las 4 edades, que se muestran en la Tabla 2. Las heredabilidades mostraron valores bajos, sin embargo, a punto de sacrificio cuando se incorporaron más animales de las mismas familias que fueron criados en otras instalaciones (datos no mostrados) estos valores subieron a  $0,22 \pm 0,12$  para el peso y  $0,19 \pm 0,11$  para la longitud. Las correlaciones tanto genéticas como fenotípicas concuerdan con las descritas para otras especies (Navarro *et al.*, 2009, Kause *et al.*, 2011).

**Tabla 1.** Color del fluorocromo, concentración de la pareja de cebadores, N° de alelos, y heterocigocidad observada y esperada de cada microsatélite de ambas múltiplex.

Locus	Color	Concentración (pmol/μL)	N° alelos	HObs	HExp
M. Interespecífica corvina					
Cac mic14	5' 6-FAM	0,02	6	0,697	0,632
UBA054	5' 6-FAM	0,02	6	0,908	0,755
UBA050	5' 6-FAM	0,045	3	0,671	0,621
UBA053	5' VIC	0,05	5	0,816	0,579
Soc431	5' VIC	0,06	4	0,684	0,530
UBA042	5' NED	0,05	3	0,763	0,634
UBA853	5' NED	0,02	2	0,303	0,457
UBA005	5' NED	0,03	6	0,605	0,757
Soc405	5' PET	0,03	2	0,250	0,220
UBA006	5' PET	0,03	2	0,487	0,493
M. Específica corvina					
GCT15	5' 6-FAM	0,02	7	0,833	0,773
GA16	5' 6-FAM	0,02	7	0,998	0,786
GA17	5' 6-FAM	0,02	3	0,611	0,669
CA13	5' VIC	0,035	3	0,361	0,300
GA6	5' NED	0,02	2	0,264	0,231
CA3	5' NED	0,03	4	0,552	0,593
CA14	5' NED	0,03	3	0,403	0,653
GA2B	5' PET	0,05	2	0,167	0,154

**Tabla 2.** Correlaciones genéticas (en cursiva encima de la diagonal  $\pm$  E.T.), correlaciones fenotípicas (bajo la diagonal) y heredabilidades (en negrita en la diagonal  $\pm$  E.T.) de caracteres de crecimiento a distintas edades en corvina.

	<i>PESO</i> <i>120</i>	<i>LONG</i> <i>120</i>	<i>PESO</i> <i>150</i>	<i>LONG</i> <i>150</i>	<i>PESO</i> <i>296</i>	<i>LONG</i> <i>296</i>	<i>PESO</i> <i>446</i>	<i>LONG</i> <i>446</i>
<i>PESO120</i>	<b>0,07</b> $\pm 0,07$	0,97 $\pm 0,05$	0,94 $\pm 0,17$	0,99 $\pm 0,06$	0,71 $\pm 0,35$	0,80 $\pm 0,24$	0,99 $\pm 0,09$	0,85 $\pm 0,30$
<i>LONG120</i>	0,96	<b>0,07</b> $\pm 0,06$	0,96 $\pm 0,15$	0,96 $\pm 0,33$	0,91 $\pm 0,23$	0,70 $\pm 0,34$	0,99 $\pm 0,02$	0,84 $\pm 0,46$
<i>PESO150</i>	0,60	0,58	<b>0,07</b> $\pm 0,06$	0,99 $\pm 0,73$	0,66 $\pm 0,48$	0,93 $\pm 0,14$	0,45 $\pm 0,63$	0,85 $\pm 0,21$
<i>LONG150</i>	0,62	0,57	0,95	<b>0,04</b> $\pm 0,06$	0,99 $\pm 0,16$	0,71 $\pm 0,38$	0,91 $\pm 0,42$	0,52 $\pm 0,91$
<i>PESO296</i>	0,49	0,44	0,52	0,69	<b>0,13</b> $\pm 0,08$	0,99 $\pm 0,01$	0,97 $\pm 0,09$	0,99 $\pm 0,04$
<i>LONG296</i>	0,49	0,47	0,70	0,70	0,96	<b>0,17</b> $\pm 0,10$	0,73 $\pm 0,26$	0,97 $\pm 0,06$
<i>PESO446</i>	0,20	0,36	0,43	0,40	0,77	0,66	<b>0,08</b> $\pm 0,06$	0,96 $\pm 0,05$
<i>LONG446</i>	0,42	0,19	0,60	0,46	0,67	0,78	0,95	<b>0,07</b> $\pm 0,05$

## Referencias

- Alarcón, J. A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., Alvarez, M. C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 230, 65–80.
- Archangi, B., Chand, V., Mather P.B., 2009. Isolation and characterization of 15 polymorphic microsatellite DNA loci from *Argyrosomus japonicus* (mulloway), a new aquaculture species in Australia. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 412–414.

- Farias, I.P., Muniz, L.B., Astolfi-Filhot, S., Sampaio, I., 2006. Isolation and characterization of DNA microsatellite primers for *Cynoscion acoupa*, the most exploited sciaenid fish along the coast of Brazil. *Mol. Ecol. Notes* 6, 660–663.
- Kause, A., Quinton, C., Airaksinen, S., Ruohonen, K., and Koskela, J., 2011. Quality and production trait genetics of farmed European whitefish, *Coregonus lavaretus*. *J. Anim. Sci.* 89, 959–971.
- Kovač, M., Groeneveld, E., García-Cortés, L.A., 2002. VCE-5: A package for the optimization of dispersion parameters. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 20-23 August 2002, Montpellier, France.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1–37.
- Martínez-Rodríguez, G., Álvarez M.C., McAndrew, B.J., 1998. Genetic variability of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L: Data from a hatchery stock. *Aquac. Res.* 29, 851–853.
- Navarro, A., Badilla, R., Zamorano, M.J., Pasamontes, V., Hildebrandt, S., Sánchez, J.J., Afonso, J.M., 2008. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. *Aquaculture* 285, 30–37.
- Navarro, A., Oliva, V., Zamorano, M.J., Gines, R., Izquierdo, M.S., Astorga, N., Afonso, J.M. Evaluation of PIT system as a method to tag fingerling of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): effects on growth, mortality and tag loss. *Aquaculture* 257, 309-315 (2006)
- Navarro, A., Zamorano, M.J., Hildebrandt, S., Ginés, R., Aguilera, C., Afonso, J.M., 2009. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), under industrial conditions. *Aquaculture*. 289: 225-230.
- O'Malley, K.G., Colette, A.A., Kirstin, R., Gold, J. R., 2003. Microsatellite DNA markers for kinship analysis and genetic mapping in red drum, *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae, Teleostei) *Mol. Ecol. Notes* 3, 155–158.
- Porta, D., Porta, J.M., Porta, J., Andree, K., Duncan, N., 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Argyrosomus regius* (Asso, 1801), unpublished (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Quémener, L., 2002. Le maigre commun (*Argyrosomus regius*). Biologie, pêche, marche et potentiel aquacole. Ressources de la mer. IFREMER. Plouzané, France, pp.31.
- Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D., Fernández-Palacios, H., 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* 302, 82–88.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Turner, T.F., Richardson, L.R. Gold, J.R., 1998. Polymorphic microsatellite DNA markers in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Mol. Ecol.* 7, 1771–1773.
- Vandeputte, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., 2006. An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Mol. Ecol. Notes* 6, 265–267.