

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES INTRAESPECÍFICOS E INTERESPECÍFICOS EN POBLACIONES NATURALES DE DORADA

Oliva, V; Zamorano, MJ; Navarro, A; Ginés, R; Astorga, N y Afonso, JM.

Dpto. Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los alimentos.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
Trasmontaña s/n. 35416- Arucas (LAS PALMAS).
voliva@becarios.ulpgc.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos diez años la producción mediterránea en acuicultura de las dos especies más cultivadas (dorada y lubina), ha pasado de ser de unas 3.876 Tn hasta alcanzar las 130.000 Tn. Dicha producción está cubierta en su 90% por tan sólo cuatro países Grecia, Turquía, Italia y España. La producción de dorada, para la que España ocupó el tercer lugar en el año 2002 (FEAP 2004), sigue creciendo aunque atraviesa un período de crisis debido a que los precios medios están a la baja.

A pesar de los niveles de producción de dorada y sus expectativas, las empresas de cultivo presentan un escaso estado de desarrollo desde el punto de vista genético, tanto por la manera en que suelen establecer sus reproductores, a partir de individuos de poblaciones naturales, como desde el desconocimiento que poseen, en la mayoría de los casos, de las relaciones de parentesco de dichos reproductores, lo que se agrava por el escaso censo efectivo que suelen utilizarse debido a la alta fecundidad que presentan las especies. Con ello, la producción de alevines está todavía lejos de ser individuos mejorados genéticamente. Por esta razón, los principales objetivos de este estudio son:

- 1.- Conocer la variabilidad genética existente en poblaciones naturales de dorada utilizando algunos marcadores descritos para distintas especies de espáridos.
- 2.- Proponer una panel de marcadores microsatélites intra e interespecíficos que pueden ser útiles en el estudio de las relaciones de parentesco en las empresas de acuicultura de dorada.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha realizado en un total de 146 muestras procedentes de siete poblaciones naturales de dorada. Tres de ellas del océano Atlántico y mar Cantábrico y las cuatro restantes del mar Mediterráneo. La distribución del tamaño de muestra fue: Cantábrico N=29, Huelva N=7, Noroeste de África N=16, Castellón N= 27, Valencia N= 16, Israel N= 18 y Turquía N= 33.

Los marcadores microsatélites utilizados fueron: seis intraespecíficos para dorada previamente descritos por Batargias et al. (1999) y el resto interespecíficos descritos en otros espáridos, cinco en *Pagrus major* (Takagi et. al. 1997), ocho en *Pagrus auratus* (Adcock et.al. 2000) y diez en *Pagellus bogaraveo* (Stockley et al. 2000). En total se utilizaron un total de 29 marcadores microsatélites. Se tomó como tejido un trozo de aleta que era conservada en 1 ml de etanol absoluto hasta su procesamiento. La extracción de ADN se realizó mediante el método del fenol-cloroformo (Sambrook et al., 1989), resuspendiéndose en 50µl de TE y conservándose a 4°C.

Los microsatélites fueron amplificados en un termociclador *i-Cycler* (Bio-Rad) adaptando las condiciones descritas por los autores mediante barridos para la temperatura de hibridación y la concentración de cloruro de magnesio. Los productos de PCR fueron

visualizados en geles de agarosa para confirmar las condiciones óptimas de amplificación. Una vez amplificados, los productos de amplificación fueron separados en electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6% y los alelos fueron visualizados mediante tinción de plata.

El nivel de variabilidad se estimó mediante el cálculo de las frecuencias alélicas, número medio de alelos por locus, heterocigosidades observada y esperada. Además, se estimó la probabilidad de exclusión (PE) y probabilidad combinada de exclusión (PEC) (Jamienson, 1994).

La estructura genética de la población fue inferida mediante análisis de varianza (AMOVA) (Excoffier et al., 1992), y el análisis estadístico se realizó con el programa ALERQUIN ver.2000 (Schneider et al., 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 29 marcadores estudiados, un total de trece fueron amplificados en dorada. De éstos, aquellos pertenecientes a la misma especie fueron polimórficos en todos los casos. Sin embargo, en el caso de los marcadores interespecíficos descritos para *Pagrus major*, *Pagrus auratus* y *Pagellus bogaraveo*, sólo fueron polimórficos dos, uno y tres, respectivamente.

De los marcadores específicos de dorada (Batargias et al. 1999), no fueron tenidos en cuenta para el estudio el marcador SaGT41a por presentar gran dificultad en la lectura sobre gel, ni el marcador SaGT31 por su escaso nivel de polimorfismo, sólo 4 alelos diferentes.

En relación a los marcadores interespecíficos las condiciones temperatura de hibridación y cloruro de magnesio idóneas para ser legibles en dorada, se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de amplificación de los marcadores microsatélites interespecíficos estudiados.

<i>Locus</i>	T ^a hibridación	[Cl ₂ Mg]	Especies
Pma1	57.6°	2mM	<i>Pagrus major</i>
Pma2b	61.4°	3.5mM	<i>Pagrus major</i>
Pma5	59.3°	2.5mM	<i>Pagrus major</i>
PaGA2a	62°	2.5mM	<i>Pagrus auratus</i>
PbMS2	62°	2mM	<i>Pagellus bogaraveo</i>
PbMS6	57°	2mM	<i>Pagellus bogaraveo</i>
PbMS16	57°	2mM	<i>Pagellus bogaraveo</i>

En cuanto a la variabilidad genética hallada en las distintas poblaciones el número medio de alelos fue de 22,3±1,22. Así, el número de alelos que se ha descrito oscila entre los 16 para el Pma2b y los 28 para SaGT1, si se considera el total de la muestra.

Por población el número medio de alelos fue de 8 para la población de Huelva hasta 16 para la de Turquía, si bien el tamaño de la muestra puede estar influyendo en este último dato, ya que para la población de Huelva tan sólo se pudieron conseguir 7 individuos (tabla 2).

Tabla 2. Número de alelos por población y *locus*.

<i>Locus</i>	Número de Alelos por población							Total
	Castellón	Valencia	Huelva	Israel	Cantábrico	Turquía	NO Africa	
SaGt26	17	13	8	12	15	12	8	24
SaGt1	25	20	10	13	22	24	16	28
SaGt41b	18	13	8	14	17	16	16	23
SaGT32	16	15	8	7	16	14	12	20
PaGA2a	15	10	9	6	11	14	10	22
Pma2b	12	12	7	9	12	13	12	16
Pma1	19	15	10	14	22	20	15	27
PbMS2	13	11	6	8	12	12	10	17
PbMS6	14	7	7	16	15	21	16	24
PbMS16	14	15	10	14	13	19	15	22
Promedio	16,3±1,1 9	13,1±1,1 1	8,3±0,4 4	11,3±1,10	15,5±1,12	16,5±1,33	13±0,94	22,3±1,2 2

Considerando la distribución de frecuencias alélicas, en el caso del marcador SaGT26 el alelo más frecuente fue el 225 en todas las poblaciones excepto en Turquía en la que el alelo más frecuente fue el 237 y en la población de Israel para la que el alelo más frecuente fue el 255. Se han observado alelos exclusivos de las poblaciones de Valencia y Castellón aunque no se han encontrado diferencias significativas entre poblaciones. Para el marcador SaGT1 el rango de alelos oscila entre 94 y 182 siendo el alelo más frecuente el 138, coincidiendo nuevamente que en las poblaciones de Valencia y Castellón aparecen alelos exclusivos. El marcador SaGT41b también presentó alelos raros en las poblaciones de África y Valencia. Para el marcador PaGA2a el alelo más frecuente en todas las poblaciones fue el 116.

La heterocigosidad media observada fue de 0,869, si no se consideran los marcadores monomórficos en cuyo caso el nivel de heterocigosidad bajó a 0,79. El análisis molecular de la varianza puso de relieve el 98,23 % por ciento de la varianza total es debida a diferencias genéticas dentro de poblaciones y no entre éstas. Utilizando exclusivamente marcadores microsatélites intraespecíficos, las estimas del presente estudio están en concordancia con las determinadas en otras poblaciones naturales y de cultivo (Batargias et al., 1999; Alarcón et al., 2004), 0,88 y 0,86-0,87 respectivamente.

En relación con el segundo de los objetivos, para establecer el panel de marcadores que fuese fácilmente utilizable para conocer las relaciones de parentesco en las empresas de cultivo se ha considerado el nivel de polimorfismo del marcador, la facilidad para tipificar el patrón de bandas y la posibilidad de realizar cargas múltiples en un mismo gel. Los marcadores que resultaron más idóneos y sus cualidades se recogen en la tabla 3, siendo tres intraespecíficos (SaGT1, SaGT32, SaGt41b) y tres interespecíficos (PbMS2, PbMS16, PaGA2a). Al estimar la PEC para los 6 marcadores propuestos ésta resulta del 99,99% señalando su utilidad en el control de genealogías.

Tabla 3. Marcadores propuestos en la confirmación de relaciones de parentesco.

Locus	Número de alelos	Rango alélico	Tipificación	Ho	Número de cargas	PE
SaGt41b	23	142-190	Muy fácil	0,909	Tres	0,863
PbMS2	17	126-160	Muy fácil	0,873	Tres	0,744
PaGA2a	22	102-146	Muy fácil	0,782	Dos	0,665
PbMS16	22	142-184	Fácil	0,946	Dos	0,866
SaGT32	20	140-186	Fácil	0,801	Dos	0,833
SaGT1	18	94-182	Fácil	0,887	Una	0,899

CONCLUSIONES

Se puede concluir que la mayor parte de las diferencias existentes entre *stocks* naturales de dorada son intra-poblaciones, no siendo significativas las diferencias entre poblaciones. Por otro lado, que con un panel de marcadores microsatélites constituido por sólo 6 marcadores (inter e intra-específicos) es posible obtener una probabilidad de exclusión combinada lo suficientemente elevada como para reconocer las relaciones familiares en dorada.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Gobierno de Canarias, PI2001 /063 y PI2002/212.

BIBLIOGRAFIA

- ADCOCK, G. J., BERNAL RAMIREZ, J. H., HAUSER, L., SMITH, P. AND CARVALHO. G.R., 2000. Screening of DNA polymorphisms in samples of archived scales from New Zealand snapper. *J. Fish Biology*. 56 (5), 1283-1287.
- ALARCÓN J., MAGOULAS, A., GEORGAKOPOULOS T., ZORROS, E., ALVAREZ M.C. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 230 65–80
- BATARGIAS, C., DERMITZAKIS, E., MAGOULAS, A. Y ZOUROS, E., 1999. Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata*. (Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology*, 8:897-898.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE P., QUATRO, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes : Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- FEAP 2004: Federación Europea de Productores de Acuicultura. <http://www.feap.org>.
- JAMIENSON, A. 1994. The effectiveness of using codominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Anim. Genet.*, 25: 37-44
- SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS T. 1989. In molecular cloning: a laboratory Manual. 2º Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- SCHNEIDER, S., ROESLLI, D, EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin 2000.

- STOCKLEY BM, ROGERS AD, IYENGAR A, MENEZES G, SANTOS R, LONG A. 2000. Ten microsatellite loci isolated and developed for the blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). *Mol Ecol.*;9(7):999-1000.
- TAKAGI M., TANIGUCHI, N. COOK, D., DOYLE, R.W. 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. *Fish. Sci.*,63 (2): 199-204.