

Aplicación de marcadores microsatélites a los programas de cultivo del rodaballo *Scophthalmus maximus* (L., 1758)

Y. Borrell^{1,3}, J. Álvarez¹, E. Vázquez¹, J. A. Sánchez Prado¹, C. Fernández-Pato², C. Martínez-Tapia² y G. Blanco¹

¹ Laboratorio de Genética Acuícola. Departamento de Biología Funcional. Julián Clavería, s/n. Universidad de Oviedo. E-33006 Oviedo (Asturias), España. Correo electrónico: glb@correo.uniovi.es

² Planta de Experimentación en Acuicultura El Bocal. Instituto Español de Oceanografía. Apdo. 240. E-39080 Santander (Cantabria), España

³ Departamento de Bioquímica. Universidad de la Habana. Calle 25 entre J e I. # 455. Vedado. Plaza. Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

Se utilizaron ocho *loci* microsatélites en la estimación de relaciones genéticas y determinación de pedigríes en rodaballo *Scophthalmus maximus* (L., 1758). Mediante el análisis de los genotipos de reproductores y descendientes de dos piscifactorías se investigó la capacidad de los *loci* para clasificar correctamente a los individuos como emparentados o no. Las distribuciones de los coeficientes de relación genética (R) entre individuos emparentados y no relacionados exhiben medias cercanas a las esperadas teóricamente y el porcentaje de individuos emparentados que forman el total de coeficientes de relación genética que se encuentran por debajo del valor R = 0 oscilan entre el 0 % (estación A) y el 29 % (estación B). Así mismo, la identificación correcta de ambos parentales para cada descendiente fue posible en más del 80 % de los casos en la estación A y en sólo el 41 % en la estación B.

Palabras clave: Parentesco, paternidades, acuicultura, genética.

ABSTRACT

Application of microsatellite markers to the management of farmed stocks of turbot *Scophthalmus maximus* (L., 1758)

In the present study, eight microsatellite loci were used to estimate genetic relatedness and pedigree determination in turbot *Scophthalmus maximus* (L., 1758). Through genotypic analysis of broodstocks and their progenies, from two different turbot hatcheries, the capacity of these loci to correctly classify individuals as related or non-related was examined. Relatedness coefficients among related and non-related individuals presented means close to those theoretically expected, and the percentages of related individuals included in all relatedness coefficients found to be below the R = 0 value ranged from 0 % (hatchery A) to 29 % (hatchery B). The identification of both parents for each individual was possible in more than 80 % of the cases from hatchery A, but only 41 % of those from hatchery B.

Keywords: Relatedness, parentage, paternity inferences, genetics, aquaculture.

INTRODUCCIÓN

Entre las mayores dificultades prácticas que entraña la mejora genética en peces, se encuentran los requerimientos de espacio para mantener separadas las distintas familias que configuran el diseño experimental mínimo requerido. Al contrario que en otras especies animales utilizadas en ganadería, el marcado físico identificativo de camada en peces es prácticamente imposible, tanto por el tamaño de los individuos durante las primeras etapas de su desarrollo (larvas frecuentemente microscópicas), como por el elevado número de descendientes que generan las puestas de peces.

El actual desarrollo de las técnicas de genética molecular han permitido sustituir el marcado físico por un marcado genético, más eficiente en tanto que se transmite a generaciones sucesivas. Durante los últimos años, un grupo de estos marcadores genéticos, los denominados microsatélites, han sido la herramienta más utilizada para estudiar distintos aspectos de interés, como son el éxito reproductivo, la estructura social y el parentesco entre individuos en una amplia variedad de especies vegetales y animales, incluidas algunas de peces (Queller, Strassmann y Hughes, 1993; Bourke, Green y Bruford, 1997; Alltmann *et al.*, 1996; Schnabel, 1998; Estoup y Anger, 1998).

Los microsatélites son secuencias de ADN nuclear constituidas por repeticiones en tándem de entre uno y seis nucleótidos (Tautz, 1989) y cuya longitud total es inferior a 0,2 kb. Las regiones flanqueantes de los microsatélites son secuencias únicas, lo que determina la especificidad de *locus* (Litt y Luty, 1989; Weber y May, 1989). El polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado refleja la existencia de variaciones en el número de veces que se encuentra repetido el motivo que origina el microsatélite (Tautz y Renz, 1984; Litt y Luty, 1989; Weber, 1990).

Los microsatélites presentan características que les hacen especialmente interesantes como marcadores genéticos: a) son muy abundantes en el genoma, lo que, en principio, permite disponer de tantos como sean necesarios para el trabajo concreto que se desarrolla; b) muestran niveles muy altos de variabilidad (significativamente mayores que los *loci* que codifican proteínas), lo que permite llegar a la caracterización inequívoca del individuo; c) son marcadores codominantes que se heredan de forma mendeliana, lo que les hace más infor-

mativos en estudios de pedigrís; y d) para su análisis sólo se necesitan cantidades mínimas de tejido (como un fragmento de aleta o unas escamas) y, por tanto, obtenibles con técnicas no lesivas para el individuo y que no afectan a su supervivencia.

La posibilidad de establecer de forma precisa la relación genética entre dos individuos depende fundamentalmente del nivel de variabilidad de los *loci* considerados, y también del número de éstos (Chakraborty, Meagher y Smouse, 1988). Aun aceptando que los microsatélites son la mejor herramienta para este cometido, es importante asegurar un número mínimo de *loci* informativos para cada caso en función de los niveles de variación que presente (Blouin *et al.*, 1996).

En este trabajo se pretende comprobar la utilidad de los *loci* microsatélites en el establecimiento de relaciones de parentesco que puedan ser utilizadas para mejorar cuestiones prácticas como:

- El establecimiento de pedigrís no documentados. Permitiría el cultivo conjunto de las descendencias o, para caracteres de interés, el cálculo de la heredabilidad estimada por parecido entre parientes en condiciones ambientales homogéneas.
- La identificación del grado de parentesco entre los lotes de reproductores. Esta información permitiría evitar óptimamente los procesos de endogamia, tan negativos en los resultados a medio y largo plazo.
- La evaluación del éxito de cada reproductor en cuanto a su aportación a la generación siguiente.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN se extrajo mediante la resina Chelex® 100 (Walsh, Metzger e Higuchi, 1991). En todos los individuos se analizaron los *loci* Smax-01, Smax-02, Smax-03 (Coughlan *et al.*, 1998); Sma1-125, Sma3-8, Sma3-12, Sma3-129 (Estoup *et al.*, 1998); y FIOCA19 (Iyengar *et al.*, 2000). Se amplificaron mediante PCR siguiendo condiciones previamente descritas (Coughlan *et al.*, 1998; Estoup *et al.*, 1998; Iyengar *et al.*, 2000). Posteriormente, los productos de esta amplificación se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (6%). El revelado de los geles se realizó con tinción de plata (comercializada como Promega Silver Sequence DNA Staining).

Asignación de parentales

Se utilizaron reproductores de dos diferentes estaciones de cultivo (A y B) para crear familias de hermanos completos y se analizaron estas descendencias y el conjunto de reproductores para ocho *loci* microsatélites.

Estación A: el lote de reproductores estaba compuesto por 35 individuos (20 machos y 15 hembras), y de los cruzamientos de 5 machos y 5 hembras se obtuvieron cinco familias de las que se analizaron, al menos, 10 descendientes por familia.

Estación B: el lote de reproductores estaba compuesto por 28 individuos (9 machos y 19 hembras), y de los cruzamientos utilizando 6 machos y 6 hembras, se obtuvieron 10 familias de las que se analizaron, en total, 108 descendientes.

Utilizando el programa Cervus 1.0 (Marshall *et al.*, 1998) se estimó la potencia de estos microsatélites para identificar correctamente, dentro del stock de reproductores, a los parentales reales de cada descendiente. Los resultados se complementaron con los obtenidos mediante simulación de descendencias a partir de las frecuencias génicas de los parentales (Probmax 1.02) (Danzmann, 1997).

Relaciones de parentesco

Los coeficientes de relación genética (R) entre individuos se calcularon utilizando el programa Relatedness 5.0.6 (Queller y Goodnight, 1989). Se estimó la capacidad de los *loci* para clasificar correctamente a los descendientes como hermanos completos o no emparentados.

Como muestra se utilizaron las familias descritas en el apartado anterior, y también ambos lotes de reproductores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variabilidad de los *loci* microsatélites

El éxito de los estudios de parentesco depende en gran medida de los niveles de variación genética que sean detectables en las muestras en estudio, ya que las probabilidades de acierto aumentan con el número de *loci* ensayados, el número de alelos por *locus* y las frecuencias génicas de éstos (Chakraborty, Meagher y Smouse, 1988). La tabla I

muestra los valores de PIC (contenidos de información polimórfica) de cada uno de los 8 *loci* microsatélites en cada lote de reproductores. El lote de reproductores de la estación A presenta, en 5 de los 8 *loci* analizados, valores de PIC superiores al 70 %, que se considera un valor informativo para este tipo de análisis (Blouin *et al.*, 1996). Sin embargo, los reproductores de la estación B presentan valores bajos de PIC para todos los microsatélites y sólo uno de ellos se consideraría potencialmente informativo. En la tabla I se incluyen otros descriptivos de variabilidad, como la heterocigosidad media (He), que oscila entre el 0,66 de la estación B y el 0,73 de la estación A.

Estos resultados apuntan a una primera conclusión en el sentido de que, por la propia dinámica de la acuicultura, en la que en cada estación se cultiva un stock de reproductores con características propias, los resultados generales obtenidos con *loci* microsatélites tienen que ser comprobados en cada caso concreto.

Asignación correcta de individuos a sus parentales

Se planteaba comprobar, como un objetivo dentro de este trabajo, la capacidad de asignación de un individuo a sus verdaderos padres considerando la variabilidad genética de los *loci* microsatélites estudiados. Para ello se utiliza el paquete informático Cervus (Marshall *et al.*, 1998), que ha sido diseñado

Tabla I. Resumen de estadísticos para la inferencia de paternidades de ocho *loci* microsatélites en las estaciones A y B de cultivo de rodaballo. (PIC (m)): valor medio del contenido de información polimórfica; (He): heterocigosidad; (Na): número medio de alelos por *locus*; (N.º): número de reproductores analizados. Se destacan los valores de PIC superiores al 70 %.

<i>Locus</i>	PIC	
	Estación A	Estación B
Smax-01	0,718	0,639
Smax-02	0,537	0,700
Smax-03	0,807	0,614
Sma1-125	0,723	0,606
Sma3-8	0,647	0,532
Sma3-12	0,516	0,480
Sma3-129	0,779	0,625
F1-OCA19	0,723	0,601
PIC (m)	0,681	0,600
He	0,730	0,659
Na	6,88	6,13
N.º	35	28

para marcadores codominantes y que, a partir de las frecuencias alélicas de los *loci*, utiliza procedimientos de máxima probabilidad para asignar paternidades. La tabla II muestra los resultados de esta asignación en cada uno de los tres supuestos siguientes.

1) Con los datos obtenidos de la situación experimental real, en la estación A se comprobó, trabajando con los 50 descendientes disponibles, que el porcentaje de ellos es asignado correctamente a sus padres dentro del total ($n = 35$) de reproductores de la estación. En el caso de la estación B, los 108 descendientes se asignan entre los 28 reproductores que constituyen el lote. En este caso se comprueba que la asignación correcta a sus dos parentales es del 81,2 % cuando se trabaja en la estación A, porcentaje que desciende al 40,7 % cuando nos referimos a la estación B (tabla IIa).

Para explicar estos resultados hay que recordar lo comentado en el apartado anterior (tabla I) respecto a los bajos valores de PIC que presentaban en los reproductores de la estación B, 7 de los 8 *loci* microsatélites que aquí se analizan. Esta baja variabilidad justificaría las dificultades de asignación encontradas, sobre todo cuando se dispone de un número bajo de familias, como ocurre en nuestro estudio.

2) Cuando se realiza una simulación mediante el paquete informático Probmax 1.02 (Danzman, 1997). En cada una de las dos estaciones se eligen 5 machos y 5 hembras de entre los reproductores utilizados para obtener las familias y, con el programa, se simulan todos los cruzamientos posibles entre ellos (aumentando el número de familias: de 5 a 25 en la estación A, y de 10 a 25 en la estación B); posteriormente, se comprueba cuántos de estos descendientes generados por simulación (virtuales) son correctamente asignados a sus padres.

Los resultados de estas asignaciones (tabla IIb) muestran que la batería de microsatélites utilizada es capaz de asignar correctamente a sus dos parentales al 71,5 % de los descendientes virtuales de la estación A y el 70,5 % en la estación B. El porcentaje de asignación correcta disminuye (el 10 %) en la estación A y aumenta (el 30 %) en la estación B. Estos resultados parecen indicar que el error en la valoración del potencial de estimación del grado de asignación depende del número de familias analizadas, y es tanto mayor cuanto menor es el PIC de los microsatélites en los reproductores.

3) En este caso se trata de realizar una predicción teórica sobre la capacidad de asignar correc-

Tabla II. Porcentajes de asignación correcta de descendientes a ambos padres utilizando ocho loci microsatélites en dos estaciones de cultivo de rodaballo. (a): descendencias reales; (b): descendencias virtuales (generadas por simulación); (c): 10 000 ciclos de asignación iterativos.

	Estación A	Estación B
a) Descendencias reales	81,2 %	40,7 %
N.º de familias	5	10
N.º de descendientes	50	108
b) Descendencias virtuales	71,5 %	70,5 %
N.º de familias	25	25
N.º de descendientes	200	200
c) 10 000 ciclos iterativos	75,89 %	69,47 %

tamente los descendientes a sus genitores basados en los genotipos de los individuos que componen el lote de reproductores (35 en la estación A y 28 en la B). La simulación es un proceso iterativo en el que, teniendo como base los genotipos de los reproductores, se van generando descendencias virtuales y comprobándose el porcentaje de aciertos cuando se realiza la asignación a sus parentales. Luego de 10 000 ciclos de asignación, el 75,89 % fueron correctos para la estación A y el 69,47 % para la estación B (tabla IIc). Los resultados no difieren significativamente de los observados en el segundo supuesto y los niveles de asignación correcta se mantienen en torno al 70 %.

Estos resultados permiten concluir que el análisis de estos ocho *loci* microsatélites permitiría, en ambas estaciones, niveles de al menos el 70 % de asignación correcta de un individuo a sus parentales. Mejorar estos resultados buscando el 100 % de asignaciones correctas dependerá, en todo caso, de aumentar el número de microsatélites utilizados si el stock de reproductores en estudio es inamovible, o si los niveles de variabilidad en el stock son susceptibles al aumento con la introducción de nuevos reproductores.

Establecimiento de relaciones de parentesco

Con la información genética suministrada por los ocho microsatélites en estudio y mediante el paquete informático Relatedness 5.0.6 (Queller y Goodnight, 1989) se calculó el promedio de relación genética R entre individuos o grupos de individuos. Las expectativas teóricas en hermanos completos son de $R \geq 0,5$, y en medio-hermanos $0,5 > R \geq 0,25$.

Los valores medios de R para hermanos completos, medio-hermanos y no emparentados obtenidos para cada una de las dos estaciones, utilizando: a) los datos de familias reales, y b) los obtenidos en la simulación, se muestran en las figuras 1a,b y 2a,b. En todo caso se observan valores medios de $R = 0$ entre individuos no emparentados, y los valores medios en hermanos completos no difieren de $R = 0,5$ en tres de los cuatro casos estudiados.

El porcentaje de individuos no emparentados que forman el total de coeficientes de relación genética que se encuentran por debajo del valor $R = 0$ se muestran para cada caso en estudio en las figuras 1a,b y 2a,b. Según estos resultados, elegir individuos con valores $R < 0$ entre ellos, permite seleccionar, con al menos el 71 % de probabilidad (descendencias reales, estación B) individuos no emparentados, valores que ascienden al 81 % (descendencias generadas por simulación para la estación A), 87 % (descendencias generadas por simulación para la estación B) y 100 % (descendencias reales en la estación A) en los otros casos estudiados. Estos resultados mejoran si se utiliza como valor crítico, en lugar de $R = 0$, el valor medio de R

obtenido en cada caso para los individuos no emparentados.

Estos resultados tendrían una aplicación práctica en la elección de individuos no emparentados como genitores con el objetivo de mantener bajos niveles de endogamia en la generación siguiente.

Cuando se aplica este tipo de análisis a los lotes de reproductores (tabla III), se observa que, si consideramos todos los cruzamientos posibles, el 19 % en la estación A y el 28 % en la B estarían utilizando individuos con un alto grado de parentesco, lo que, a corto plazo, acumularía altos niveles de endogamia, potencialmente desfavorables para los rendimientos del cultivo.

Tabla III. Distribución por rangos de los coeficientes de relación genética (R) entre los individuos reproductores de dos estaciones para el cultivo de rodaballo (%).

	Estación A	Estación B
$R \leq 0$	55,2	49,5
$0 < R \leq 0,25$	25,4	22,2
$0,25 < R \leq 0,50$	15,5	19,0
$R > 0,50$	3,9	9,3

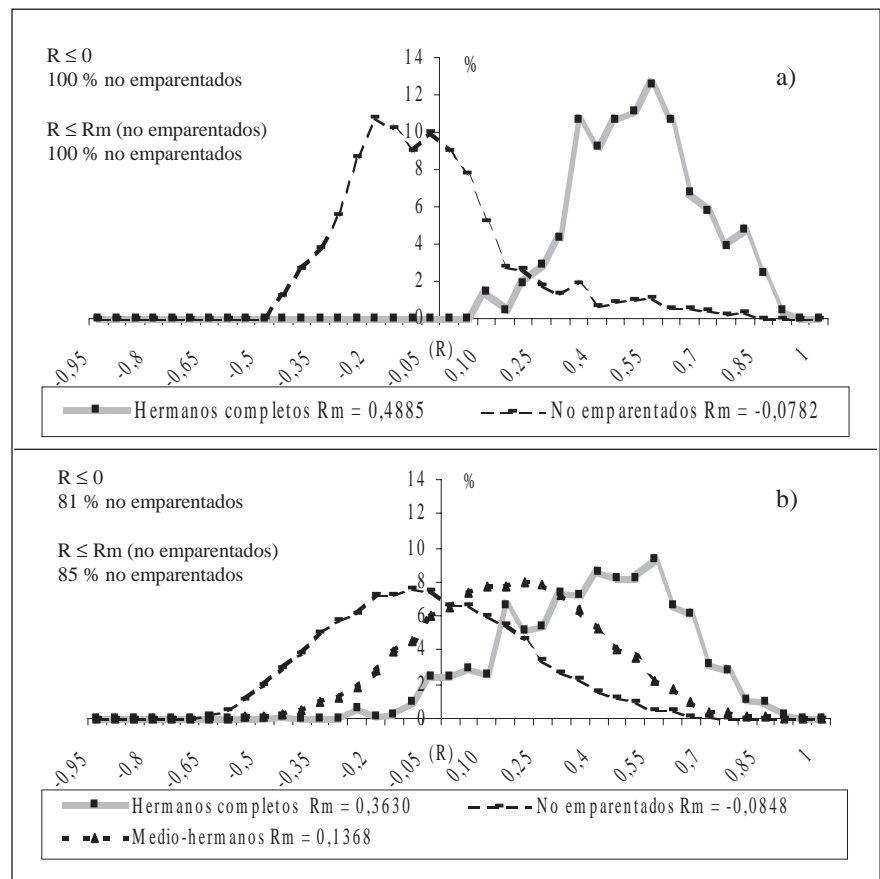


Figura 1. Distribución de coeficientes de relación genética entre pares de individuos en la estación A utilizando ocho loci microsatélites. Se muestra, también, el porcentaje de individuos no emparentados que forman el total de coeficientes de relación genética que se encuentran por debajo del valor $R = 0$ o $R < R_m$ (no emparentados). (a): descendencias reales (5 familias); (b) descendencias generadas por simulación (25 familias).

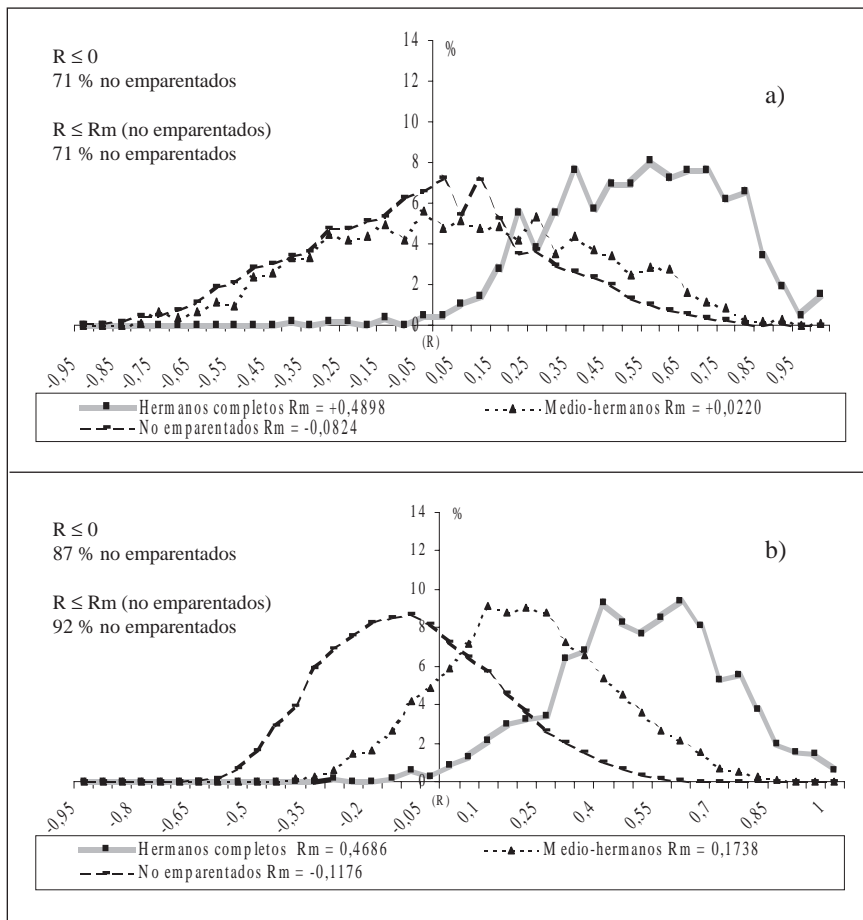


Figura 2. Distribución de coeficientes de relación genética entre pares de individuos en la estación B utilizando ocho *loci* microsatélites. Se muestra, también, el porcentaje de individuos no emparentados que forman el total de coeficientes de relación genética que se encuentran por debajo del valor $R = 0$ o $R < R_m$ (no emparentados). (a): descendencias reales (5 familias); (b): descendencias generadas por simulación (25 familias).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con fondos procedentes del proyecto DGES (MAR 1999-1190-CO2-01), y de la Agencia Española de Cooperación Iberoamericana (AECI) con la concesión de una beca de doctorado (1998-2001).

BIBLIOGRAFÍA

- Allmann, J., S. Alberts, T. Coote, J. Dubach, E. Geffen y S. A. Haines. 1996. Behaviour predicts genetic structure in a wild primate group. *Proceeding National Academy Sciences (USA)* 93: 791-801.
- Blouin, M. S., M. Parson, V. Lacaille y S. Lotz. 1996. Use of microsatellite *loci* to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393-401.
- Bourke, A. F. G., H. A. A. Green y M. W. Bruford. 1997. Parentage, reproductive skew and queen turnover in a multiple-queen ant analyzed with microsatellites. *Proceeding Royal Society London* 264: 277-283.
- Chakraborty, R., T. Meagher y P. E. Smouse. 1988. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics* 118: 527-536.
- Coughlan, J., E. MacCarthy, D. McGregor, P. O'Donoghue, P. Galvin, R. Fitzgerald, E. Daemen, A. Immsland, S. Stefansson y T. Cross. 1998. Four polymorphic microsatellites in turbot *Scophthalmus maximus*. *Animal Genetics* 27: 441-442.
- Danzmann, R. G. 1997. PROBMAX: a computer program for assigning unknown parentage in pedigree analysis from known genotypic pools of parents and progeny. *Journal of Heredity* 88: 333.
- Estoup, A. y B. Anger. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. En: *Advances in Molecular Ecology*. G. R. Carvalho (ed.): 51-86. IOS Press. Amsterdam.
- Estoup, A., K. Gharbi, M. SanCristobal, C. Chevalet, P. Haffray y R. Guyomard. 1998. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 715-725.
- Iyengar, A., S. Piyapattanakorn, D. A. Heilpel, D. M. Stone, B. R. Howell, A. R. Child y N. Maclean. 2000. A suite of

- highly polymorphic microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with potential for use across several flatfish species. *Molecular Ecology* 9: 365-378.
- Litt, M. y J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetics* 44: 397-401.
- Marshall, T. C., J. Slate, L. E. B. Kruuk y J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- Queller, D. C. y K. F. Goodnight. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.
- Queller, D. C., J. E. Strassmann y C. R. Hughes. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Evolution and Ecology* 8: 285-288.
- Schnabel, A. 1998. Parentage analysis in plants: mating systems, gene flow and relative fertilities. En: *Advances in Molecular Ecology*. G. R. Carvalho (ed.): 173-189. IOS Press. Amsterdam.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of single sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research* 17: 6463-6471.
- Tautz, D. y M. Renz. 1984. Simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger y R. Higuchi. 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-510.
- Weber, J. L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)n, (dG-dT)n polymorphism. *Genomics* 7: 524-530.
- Weber, J. L. y P. E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal Human Genetics* 44: 388-396.