

Caracterizaciones citogenética e isoenzimática del lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858

L. Vega, E. Díaz, I. Cross y L. Rebordinos

Laboratorio de Genética. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Cádiz. Polígono del Río San Pedro. E-11510 Puerto Real (Cádiz), España. Correo electrónico: laureana.rebordinos@uca.es

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

RESUMEN

Se ha estudiado el lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858 realizando el análisis de 12 *loci* alóзимicos en 92 ejemplares cultivados en piscifactorías. De estos individuos, 30 se obtuvieron de la empresa Cultivos Piscícolas Marinos (Cupimar) y los restantes fueron proporcionados por la planta de cultivos marinos de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de Cádiz (Casem). Los *loci* estudiados fueron MDH-1, MDH-2, PGI-1, PGI-2, PGM, LDH, EM-1, EM-2, AAT-1, AAT-2, GPD, G-6PDH, y todos resultaron ser monomórficos, excepto el *locus* LDH en ambas poblaciones con el criterio del 95 % (P_{95}) y el PGI-2 en la población del Casem (P_{99}). En todos estos sistemas se ha encontrado variabilidad isoenzimática baja en cuanto al polimorfismo, la heterocigosis y el número medio de alelos. Las poblaciones analizadas se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y la diferenciación genética de las mismas (F_{ST}) es muy baja. Además, se describe por primera vez el cariotipo del lenguado *S. senegalensis*, que muestra 21 pares cromosómicos y 48 brazos cromosómicos ($NF = 48$).

Palabras clave: *Solea senegalensis*, cariotipo, isoenzimas, lenguado.

ABSTRACT

Cytogenetic and isozymatic characterization of the sole Solea senegalensis Kaup, 1858

We analysed 12 allozyme loci in 92 farm-grown specimens of *Solea senegalensis* Kaup, 1858, with 30 individuals from the Cupimar farm, and the remainder supplied by the Casem marine cultures laboratory. The loci studied were MDH-1, MDH-2, PGI-1, PGI-2, PGM, LDH, EM-1, EM-2, AAT-1, AAT-2, GPD and G-6PDH. All loci were monomorphic except for locus LDH in both populations, using the criterion of 95 % (P_{95}), and PGI-2 in the Casem specimens (P_{99}). A low variability was found in all of these systems at both the polymorphism and heterozygosity levels, and also regarding the average number of alleles. The studied populations are under Hardy-Weinberg equilibrium, and the genetic differentiation between them (F_{ST}) is very low. In addition, the karyotype of *S. senegalensis* is here described for the first time, presenting 21 chromosome pairs and 48 chromosome arms ($NF = 48$).

Keywords: *Solea senegalensis*, karyotype, isozymes, sole.

INTRODUCCIÓN

El lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858 es un pez plano común en las aguas del Mediterráneo y el Atlántico sur, con características morfológi-

cas muy similares a las de *Solea solea* (L., 1758). Presenta un valor comercial alto y actualmente es cultivado por varias empresas de la Comunidad Autónoma de Andalucía (Dinis *et al.*, 1999).

La importancia de los marcadores genéticos en estudios poblacionales es grande, pues su utilización permite obtener información genética de cada uno de los individuos que constituyen las poblaciones naturales o cultivadas y, por tanto, hacer un uso adecuado de los recursos biológicos existentes. Existen diversos tipos de marcadores genéticos: de DNA, de RNA, los proteínicos (proteínas e isoenzimas) y los citogenéticos, en los que se considera la forma, el número y el patrón de bandas de los cromosomas. En particular, las isoenzimas son marcadores proteínicos ampliamente utilizados para analizar la estructura genética de las poblaciones, realizar estudios filogenéticos y cuantificar caracteres como la heterocigosis o la variabilidad (Skibinski, 1994). Los citogenéticos, por su parte, permiten realizar comparaciones taxonómicas y también relacionar las alteraciones en el número cromosómico con condiciones ambientales, como la presencia de contaminantes (Barsiené, 1994; Montero *et al.*, 1994).

Por otro lado, con vistas a futuros programas de mejora genética por manipulación cromosómica, es importante conocer el número de cromosomas que presenta cada especie. Actualmente sólo se conoce el cariotipo de alrededor del 10 % de los peces. De hecho, se desconoce la composición cromosómica de muchas de las especies con interés para la acuicultura. Los estudios citogenéticos en peces planos son aun más escasos debido al tamaño reducido de los cromosomas y a que poseen el menor contenido de DNA cromosómico entre los teleosteos (Bouza, Sánchez y Martínez, 1994).

S. senegalensis es poco conocida desde el punto de vista genético, tanto en el ámbito citogenético como a nivel poblacional. Por esto se ha llevado a cabo un estudio dirigido a caracterizar poblaciones cultivadas de esta especie mediante el análisis de polimorfismos isoenzimáticos y del cariotipo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis alozímico se analizaron en total 92 individuos de *S. senegalensis*: 30 se muestrearon en la empresa Cultivos Piscícolas Marinos (Cupimar) y los restantes se obtuvieron en la planta de cultivos marinos de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de Cádiz (Casem). El estudio se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de almidón al 10 %. De cada individuo se obtuvo un trozo de hígado y otro de músculo, que fueron

homogeneizados con mercaptoetanol al 0,1 % en fosfato potásico 0,2 M, pH 7. Una vez obtenido el extracto, las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de la electroforesis. A partir de este extracto se estudió la actividad de ocho sistemas enzimáticos (MDH: malato deshidrogenasa; PGI: fosfoglucoisomerasa; PGM: fosfoglucomutasa; LDH: lactato deshidrogenasa; EM: enzima málico; AAT: aspartato aminotransferasa; GPD: glicerol 3-fosfato deshidrogenasa; G-6PDH: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) controlados, por lo menos, por 12 *loci*. Los sistemas de tampón y tinción utilizados corresponden a los descritos por Pasteur *et al.* (1985).

El análisis citogenético se llevó a cabo a partir de larvas completas, y el tratamiento consistió en el mantenimiento durante 3 h de las muestras en colchicina (0,01-0,02 %), seguido de un choque hipotónico (KCl 0,4 %) y la fijación con Carnoy. Las preparaciones cromosómicas obtenidas a partir de estos tejidos se tiñeron con Giemsa. Por último, se fotografiaron las mejores metafases para realizar el cariotipo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se ensayaron ocho sistemas enzimáticos. En algunos de ellos se resolvieron varias zonas de actividad y, por eso, finalmente, se analizaron los siguientes 12 *loci* alozímicos: *MDH-1*, *MDH-2*, *PGI-1*, *PGI-2*, *PGM*, *LDH*, *EM-1*, *EM-2*, *AAT-1*, *AAT-2*, *GPD*, *G-6PDH*. En la tabla I se detallan las frecuencias alélicas obtenidas en las dos poblacio-

Tabla I. Frecuencias alélicas de los 12 *loci* isoenzimáticos en las dos poblaciones de *S. senegalensis* analizadas. (N): número de individuos.

<i>Loci</i>	Alelo	Cupimar (N = 30)	Casem (N = 62)
<i>MDH-1</i>	100	1,0	1,0
<i>MDH-2</i>	100	1,0	1,0
<i>EM-1</i>	100	1,0	1,0
<i>EM-2</i>	100	1,0	1,0
<i>GPD</i>	100	1,0	1,0
<i>G-6PDH</i>	100	1,0	1,0
<i>AAT-1</i>	100	1,0	1,0
<i>AAT-2</i>	100	1,0	1,0
<i>LDH</i>	100	0,95	0,984
"	110	0,05	0,016
<i>PGM</i>	100	1,0	1,0
<i>PGI-1</i>	100	1,0	1,0
<i>PGI-2</i>	100	1,0	0,976
"	110	0	0,024

nes. Se puede observar que todos los *loci* presentaron un alelo único en las dos poblaciones analizadas. Sólo el *locus LDH* presentó dos alelos en las dos poblaciones y el *locus PGI-2* mostró dos alelos en la población del Casem.

Para medir la variabilidad alozímica se utilizaron las magnitudes que se muestran en la tabla II. El polimorfismo se midió con los criterios del 95 y el 99 % (P_{95} y P_{99}). En la población de Cupimar el valor de polimorfismo fue del 8,3 % bajo ambos criterios. En la del Casem, sin embargo, el 16,6 % de los *loci* fue polimórfico para P_{99} , pero, según el criterio más restrictivo de P_{95} , este *locus* resultó ser monomórfico. Como se puede observar, estos valores resultaron muy bajos, lo cual coincide con lo expuesto por Bouza, Sánchez y Martínez (1997), que obtuvieron valores comprendidos entre 5,7-1,43 (P_{95}) y 11,5-22,85 (P_{99}) en poblaciones cultivadas del rodaballo *Scophthalmus maximus* (L., 1758).

En cuanto a la heterocigosidad obtenida, los valores fueron de 0,008 y 0,007 en las poblaciones de Cupimar y Casem, respectivamente. Estos datos son similares a los obtenidos en poblaciones naturales de rodaballo *S. maximus* (Blanquer *et al.*, 1992), donde los valores de heterocigosidad oscilaron entre 0,008 y 0,027.

Por último, la variabilidad encontrada respecto al número medio de alelos fue de 1,08 en Cupimar y 1,07 en la población del Casem. En poblaciones cultivadas de *S. maximus* (Bouza, Sánchez y Martínez, 1997) el número medio de alelos se encontraban en un rango de 1,11 a 1,21.

Teniendo en cuenta todas las propiedades descritas, se puede decir que las poblaciones cultivadas de *S. senegalensis* analizadas en este trabajo presentaron valores muy bajos de variabilidad. Esta característica ya ha sido descrita previamente en la literatura para otras especies de peces, y podría deberse a diversos factores. En primer lugar, a la existencia de una baja variabilidad en las poblaciones naturales de las que se parte para crear la población cultivada. Esto podría ser una consecuencia de la reducida tolerancia a cambios de temperatu-

ra en los estadios planctónicos de desarrollo, dificultando, por tanto, el flujo genético entre las poblaciones naturales (Borsa, Blanquer y Berrebi, 1997). Además, esta baja variabilidad en las poblaciones naturales puede verse intensificada en las poblaciones cultivadas debido al uso continuado de reproductores emparentados genéticamente, lo que produce un aumento de la consanguinidad, con la ulterior pérdida de variabilidad.

La reducción de la variabilidad genética en las poblaciones cultivadas con respecto a las naturales ha sido ampliamente demostrada. Así, en un estudio realizado en el rodaballo *S. maximus* se comprobó que la variabilidad fue menor en las poblaciones cultivadas que en las naturales, lo que suscitó la idea de la implicación de un fenómeno de deriva genética en las poblaciones cultivadas (Bouza, Sánchez y Martínez, 1997). Crozier (1997) realizó un estudio en el salmón atlántico *Salmo salar* L., 1758, y confirmó que la heterocigosidad media por individuo resultaba ser mayor en las poblaciones naturales que en las cultivadas. En un trabajo anterior publicado por Verspoor (1988) sobre poblaciones cultivadas de salmón atlántico, se demostró la pérdida del 20 al 30 % de heterocigosidad con respecto a las poblaciones naturales. Por último, en otra especie de lenguado, *Solea solea*, Exadactylos, Geffen y Thorpe (1999) encontraron, de nuevo, que la variabilidad genética fue considerablemente menor en poblaciones cultivadas que en naturales.

Por otro lado, se realizó un análisis para determinar la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg. En la tabla III se muestra la distribución genotípica de los dos *loci* variables, así como los valores de probabilidad obtenidos después de realizar la prueba de χ^2 de ajuste al equilibrio. Como se puede obser-

Tabla II. Variabilidad alozímica en las dos poblaciones de *S. senegalensis*. (P): polimorfismo; (H): heterocigosidad; (n_a): número medio de alelos por *locus*; (m): monomórfico.

Población	P_{95} (%)	P_{99} (%)	H	n_a
Cupimar	8,3	8,3	0,008	1,08
Casem	m	16,6	0,007	1,17

Tabla III. Genotipos y valores de χ^2 de ajuste a las proporciones Hardy-Weinberg en las dos poblaciones de *S. senegalensis* estudiadas. (n): número de individuos; (GL): grados de libertad; (P): probabilidad de ajuste al equilibrio.

Genotipos	<i>Loci</i>		
	<i>LDH</i>	Casem	<i>PGI-2</i>
100/100	27	60	59
100/110	3	2	3
110/110	0	0	0
N	30	62	62
χ^2	0	0	0
GL	1	1	1
P	1	1	1

var, los dos *loci* estaban en equilibrio Hardy-Weinberg en las poblaciones analizadas. Los datos existentes en la bibliografía indican que, en general, los *loci* isoenzimáticos de los peces están en equilibrio Hardy-Weinberg. Así, los resultados publicados sobre la platija *Pleuronectes platessa* L., 1758 (Purdom y Thompson, 1976), sobre especies de tilapia (Rognon y Guyomard, 1996) y los numerosos estudios realizados con salmónidos (Guyomard y Krieg, 1983; Krueger, Perkins y Everett, 1994) confirman esta circunstancia.

Por último, se llevó a cabo un estudio para analizar la diferenciación genética entre ambas poblaciones. En la tabla IV se pueden observar los valores obtenidos de F_{ST} , en los que se cuantifica la variación en las frecuencias alélicas y también la variación entre ellas. Los datos de esta tabla indican un valor muy bajo de diferenciación genética (0,010). En estudios realizados en salmónidos se puede ver que, por ejemplo, las diferencias entre poblaciones americanas y europeas de salmón, los valores de F_{ST} oscilan entre 0,10 y 0,15 (Verspoor y McCarthy, 1997). Sin embargo, estos valores dismi-

nuyen a la mitad cuando se estudia la diferenciación entre poblaciones europeas (Blanco *et al.*, 1992). Cuando se estudian otros grupos de peces, no obstante, los valores pueden disminuir a valores entre 0,005-0,007, como describieron Rognon y Guyomard (1996) en poblaciones de tilapia, en las que los valores de diferenciación son aun más bajos que los obtenidos en el presente estudio.

Para la caracterización citogenética de *S. senegalensis* se observaron más de 100 placas metafásicas y se realizó el cariotipo con 10 de ellas. En la figura 1 se representa el cariotipo de esta especie, que comprende un número diploide de 42 cromosomas y 48 brazos cromosómicos (NF). En cuanto a la forma de las parejas cromosómicas, se observaron 3 parejas metacéntricas, 2 parejas submeta-subtelocéntricas, 4 parejas subtelo-céntricas y, por último, 12 pares cromosómicos acrocéntricos. Esto evidencia un cariotipo con rango amplio de variación en el tamaño y la forma de sus cromosomas. Además, en este estudio se encontró polimorfismo en cuanto al número de cromosomas y brazos cromosómicos (datos no mostrados). También se realizó el idiograma del complemento cromosómico de *S. senegalensis*, donde se representan de manera esquemática los cromosomas de esta especie clasificados por forma y tamaño (figura 2).

El cariotipo de *S. senegalensis* es similar al obtenido por Bouza, Sánchez y Martínez (1994) en otra especie de pez plano: el rodaballo *S. maximus*. En ese trabajo, en el que se describió por primera vez

Tabla IV. Diferenciación genética de los *loci* *PGI-2* y *LDH* en la dos poblaciones cultivadas de *S. senegalensis*.

<i>Loci</i>	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>PGI-2</i>	-0,025	-0,012	0,012
<i>LDH</i>	-0,044	-0,034	0,009
Media	-0,038	-0,028	0,010

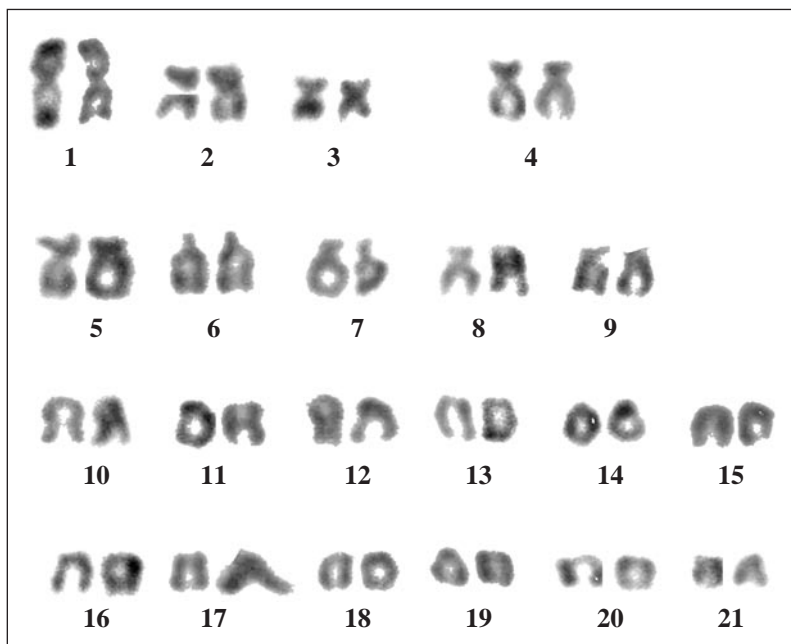
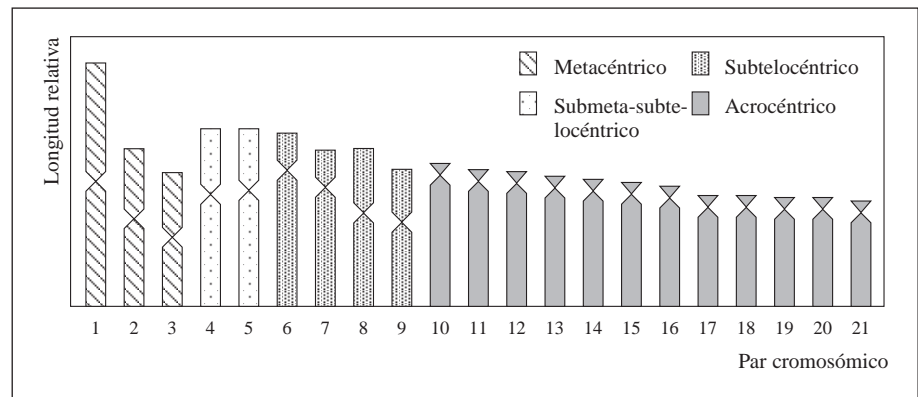


Figura 1. Cariotipo del lenguado *S. senegalensis*.

Figura 2. Idiograma de *S. senegalensis*.

el cariotipo de esa especie, el rodaballo mostraba un número diploide de 44 cromosomas y 48 brazos cromosómicos (NF) que estaban distribuidos de la siguiente manera: 2 pares metacéntricos, 1 par submeta-subtelocéntrico, 5 pares subtelocéntricos y 14 pares acrocéntricos. Como se puede observar, en el lenguado aparece un par cromosómico metacéntrico más y, sin embargo, el número de brazos cromosómicos es el mismo que en el rodaballo. Esto puede ser debido a una reorganización cromosómica robertsoniana que implica un cambio en el número de cromosomas manteniendo un idéntico número de brazos cromosómicos.

En cuanto al polimorfismo encontrado en el número de cromosomas, éste ya ha sido descrito en varias especies de peces, como en la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Hartley y Horne, 1982), en especies del género *Hucho* Günther, 1866 (Frolov y Frolova, 2000) y en el Scorpaeniforme *Chelinodichthys lucerna* (Linnaeus, 1758) (Vitturi, 1988; citada como *Trigla lucerna*), entre otras. Fan y Fox (1990, 1991), en estudios realizados en peces planos, detectaron una gran variación en cuanto al número de cromosomas en la platija *Pleuronectes platessa* (Pleuronectidae). Sin embargo, en un trabajo realizado por Bouza, Sánchez y Martínez (1994) en el que se analizaron varios ejemplares de rodaballo, tanto del medio natural como cultivados, no se observó variación en cuanto al número de cromosomas y tampoco en cuanto al número de brazos, y todos los individuos analizados mostraron el mismo cariotipo.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Cupimar y a la planta de cultivos marinos del Casem-Uca por los lenguados suminis-

trados para la realización de este trabajo, que ha sido financiado por el proyecto 1FD97-2239-C02-02 y por la AEIC mediante una beca predoctoral a E. Díaz.

BIBLIOGRAFÍA

- Barsiené, J. 1994. Chromosome set changes in molluscs from highly polluted habitats. En: *Genetics and evolution of aquatic organisms*. A. R. Beaumont (ed.): 434-447. Chapman & Hall. Londres.
- Blanco, G., J. A. Sánchez, E. Vázquez, J. Rubio y F. M. Utter. 1992. Genetic differentiation among natural European populations of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., from drainages of the Atlantic Ocean. *Animal Genetics* 23: 11-18.
- Blanquer, A., J. P. Alayse, O. Berrada-Rkhami y P. Berrebi. 1992. Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus rhombus*) (Osteichthyes, Pleuronectiformes, Scophthalmidae) throughout their range in Europe. *Journal of Fish Biology* 41: 725-736.
- Borsa, P., A. Blanquer y P. Berrebi. 1997. Genetic structure of the flounders *Platichthys flesus* and *P. stellatus* at different geographic scales. *Marine Biology* 129: 233-246.
- Bouza, C., L. Sánchez y P. Martínez. 1994. Karotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional, fluorochrome and restriction endonuclease-banding techniques. *Marine Biology* 120: 609-613.
- Bouza, C., L. Sánchez y P. Martínez. 1997. Gene diversity analysis in natural populations and cultured stocks of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Animal Genetics* 28: 28-36.
- Crozier, W. W. 1997. Genetic heterozygosity and meristic character variance in a wild Atlantic salmon population and a hatchery strain derived from it. *Aquaculture International* 5: 407-414.
- Dinis, M., L. Ribeiro, F. Soares y C. Sarasquete. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176: 27-38.
- Exadactylos, A., A. J. Geffen y J. P. Thorpe. 1999. Growth and genetic variation in hatchery-reared larval and juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture* 176: 209-226.
- Fan, Z. y D. P. Fox. 1990. A new method for fish chromosome preparation. *Journal of Fish Biology* 37: 553-561.
- Fan, Z. y D. P. Fox. 1991. Robertsonian polymorphism in plaice, *Pleuronectes platessa* L., and cod, *Gadus morhua* L. (Pisces Pleuronectiformes and Gadiformes). *Journal of Fish Biology* 38: 635-640.

- Frolov, S. V. y V. N. Frolova. 2000. Polymorphisms and divergence of karyotypes in taimens of the *Hucho* genus. *Genetika* 36 (2): 237-240.
- Guyomard, R. y F. Krieg. 1983. Electrophoretic variation in six populations of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 25: 403-413.
- Hartley, S. R. J. y M. T. Horne. 1982. Chromosome polymorphism in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Chromosoma* (Berlín) 87: 461-468.
- Krueger, C. C., D. L. Perkins y R. J. Everett. 1994. Genetic variation in naturalized Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Minnesota Tributaries to Lake Superior. *J. Great Lakes Research* 20: 299-316.
- Montero, C., B. Battaglia, M. Stenico, G. Campesan y T. Patarnello. 1994. Effects of heavy metals and temperature on the genetic structure and GPI enzyme activity of the Barnacle *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia: Thoracica). En: *Genetics and evolution of aquatic organisms*. A. R. Beaumont (ed.): 447-459. Chapman & Hall. Londres.
- Pasteur, N., M. Autem, P. Pichot y M. Goucha. 1985. Structure génétique de la sole *Solea vulgaris* Quensel, 1806 (Téléostéens, Soléidés). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 47 (1/2): 37-54.
- Purdom, C. E. y D. Thompson. 1976. Genetic analysis of enzyme polymorphisms in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Heredity* 37 (2): 193-206.
- Rognon, X. y R. Guyomard. 1996. Study of genetic variation in farmed populations of some species of genus *Oreochromis*. En: *The Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture* (11-16 de noviembre, 1991. Abidjan, Costa de Marfil). E. S. V. Pullin et al. (eds.). *ICLARM Conference Proceedings* 41: 398-408.
- Skibinski, D. O. F. 1994. The potential of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. En: *Genetics and evolution of aquatic organisms*. A. R. Beaumont (ed.): 177-199. Chapman & Hall. Londres.
- Verspoor, E. 1988. Reduced genetic variability in first-generation hatchery populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science* 45: 1686-1690.
- Verspoor, E. y E. McCarthy. 1997. Genetic divergence at the NAD⁺-dependent malic enzyme locus in Atlantic salmon from Europe and North America. *Journal of Fish Biology* 51: 155-163.
- Vitturi, R. 1988. Karyotype analysis and evidence for Robertsonian fusion in *Trigla lucerna* L. and *Helicolenus dactylopterus* (Delar.) (Pisces, Scorpaeniformes). *Biologisches Zentralblatt* 107: 553-558.