

IRTA, Crta. Poble Nou, Km 5.5, 43540-Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, España

RESUMEN: Diversos aspectos de la acuicultura pueden beneficiarse de las herramientas especializadas de la genética, desde el análisis de muestras de agua a estudios de la diversidad biológica de especies cultivadas que eviten la endogamia. En el IRTA, comprometidos con la mejora de la acuicultura y la industria pesquera, estos aspectos están siendo activamente tratados para ofrecer mayores garantías de desarrollo futuro del sector de la pesca en Cataluña. A continuación se presentan algunas muestras de la labor que se está realizando.

DETECCIÓN POR qPCR DE MICROALGAS TÓXICAS

El Centro de IRTA en Sant Carles de la Rapita lleva realizando un programa de monitoreo para el seguimiento de las floraciones de algas nocivas de la costa catalana durante casi 20 años. En un proyecto de colaboración con el CSIC, se utilizó microscopía electrónica para el estudio de detalle en cultivos de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* destinado a obtener un inventario exhaustivo de este grupo de especies que se encuentran en esta parte de la costa mediterránea, así como para la diferenciación de las formas productoras y no productoras de toxinas que puedan ayudar a mejorar la gestión de los eventos tóxicos. Adicionalmente, hemos desarrollado PCR cuantitativa como método de detección, y enumeración de las especies del género *Pseudo-nitzschia* documentadas hasta ahora en nuestras aguas. Para ello, se recogen 50 ml. de agua de mar en cinco puntos de muestreo ubicados en la Bahía de Alfaques. Mediante centrifugación de estas muestras se separa el fitoplancton del agua y luego se extrae el ADN del material celular aislado.



Seis diferentes ensayos genéticos se usan para la diferenciación y la detección de microalgas tóxicas (Fig. 2). Como ejemplo de resultados, entre agosto y octubre de 2007 se detectó una gran abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. en cinco estaciones en la Bahía de los Alfaques. Las muestras mostraron positivos sólo para una especie potencialmente tóxica, *P. calliantha* (Fig. 2g), mientras que otros resultados de las pruebas fueron negativos (por ejemplo - Fig. 2h). Sin embargo, en abril de ese año, tras una floración mixta los ensayos fueron capaces de distinguir entre varias especies (Tabla 1). Los positivos son fácilmente distinguibles en la grafica de amplificación, y se distinguen con los resultados negativos por los bajos valores de Ct (comparar insertos Fig. 2g y 2h). La visualización de las curvas de descongelación separa claramente los verdaderos positivos de los falsos positivos.

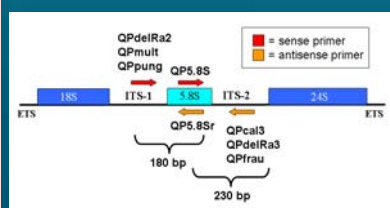


Fig. 1 Diagrama del ADN "motif" indicando la posición y orientación de los "primers" usados con qPCR especie-específica. Las longitudes aproximadas de los productos resultantes del PCR son mostradas bajo los "brackets".

Especies	Ct	Celulas Calculated
<i>P. calliantha</i>	31,53	557
<i>P. delicatissima</i>	31,20	1118
<i>P. pungens</i>	32,50	1236
qPCR Total (cells/50ml) = 2910		
Optical Microscopy Total (cells/50ml) = 2895		

Tabla 1 Resultados de floración mixta 04/07.

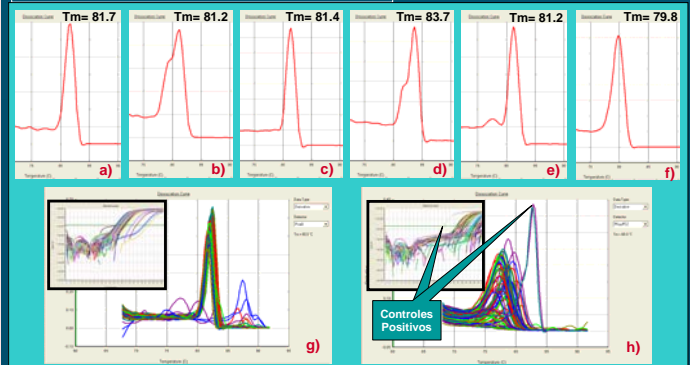
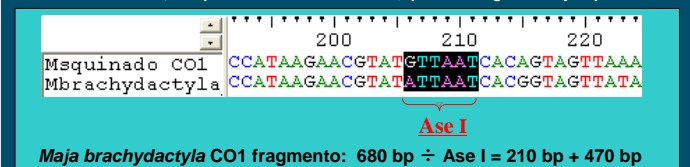


Fig. 2 Curvas de descongelación después de la amplificación del ADN genómico de cultivos de: a) *P. calliantha*, b) *P. delicatissima* (Ra2), c) *P. delicatissima* (Ra3), d) *P. multistriata*, e) *P. multistriata*, y f) *P. pungens* con temperatura de la descongelación (Tm °C) para cada una. Resultados de los ensayos con agua de mar en la Bahía de los Alfaques durante otoño de 2007 mostrando los análisis de curvas de descongelación y gráficos de amplificación (insertados) para ensayos de g) *P. calliantha* (positivo) y h) *P. fraudulenta* (negativo).

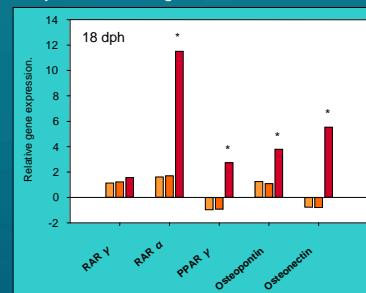
DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DE MAJA

El centollo, *Maja brachydactyla*, es un especie de importancia pesquera. A efectos de su cultivo en acuicultura es importante ser capaz de diferenciar las larvas de esta especie de las de otras especies de cangrejos que se encuentran en las mismas aguas. La discriminación entre especies puede realizarse a través del estudio del ADN mitocondrial, específicamente el gen CO1, que es muy variable entre especies estrechamente relacionadas permitiendo así la identificación inequívoca. Las secuencias génicas pueden ser inferidas mediante el uso de enzimas de restricción que cortan las cadenas de ADN en lugares específicos. Entonces, se comparan los fragmentos de ADN genómico completo, o fragmentos amplificados mediante PCR. Se compara ADN cortado vs. ADN sin cortar, y se compara entre especies realizando digestiones con diferentes enzimas de restricción. *Maja brachydactyla* es una especie que contiene el sitio Ase I, un tipo de enzima de restricción, que lo distingue de *Maja squinado*.



EXPRESIÓN GÉNICA RELACIONADA CON LA FORMACIÓN DEL ESQUELETO EN DORADA

Existe una estrecha relación entre la nutrición larvaria durante las primeras fases de alimentación y la incidencia de malformaciones esqueléticas. La vitamina A y sus metabolitos activos desempeñan un papel fundamental en la morfogénesis, proliferación y diferenciación celular y la formación de hueso, a través de la regulación de la expresión de los genes que están implicados en osteogénesis. Por esta razón, estamos estudiando los efectos de los diferentes niveles de vitamina A en la dieta sobre la expresión génica. La expresión relativa de varios genes es alterada bajo la influencia de los niveles de vitamina A en la dieta. Se tomaron muestras de larvas a los 18 dph de las cuales se extrajo el ANR. Mediante la comparación de 3 dietas suplementadas con niveles incrementales de vitamina A con una dieta control (dieta utilizada frecuentemente en las hatcheries de producción acuicola), se ha observado como el exceso de vitamina A en dieta ha supuesto un aumento de 11.5 veces en la expresión del receptor de ácido retinoico alfa. Así mismo, se han detectado incrementos en la expresión de otros genes como la osteonectina y la osteopontina, marcadores del proceso



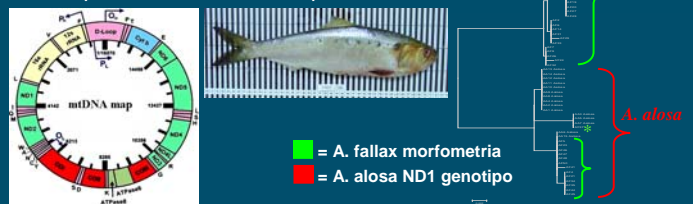
de osificación, si bien estos no son de la magnitud del RAR-alfa, sí son significativos. Esto demuestra como la vitamina A, por medio de la regulación de la expresión génica realizada por sus receptores nucleares, es capaz de alterar el proceso de osificación en dorada.

Legend: R450 (dieta control normal), R900, R2250, R4500

ESTUDIOS DE LAS POBLACIONES DE SABOGA DEL EBRO

La saboga y el sábalo (*Alosa fallax*, *A. alosa*) son dos especies de Clupeidos que una vez fueron la base de una importante pesquería local a lo largo del valle del río Ebro. Ambas especies viven en el mar y se reproducen en los ríos. Sin embargo, las barreras fluviales a la migración y la sobrepesca condujeron a la completa desaparición de la pesquería. Ambas especies son muy parecidas, pero diferenciables por determinados caracteres morfológicos tales como el número de branquiaspinas en los arcos branquiales. Sin embargo, las herramientas genéticas permiten una mayor capacidad de discriminación entre especies, así como de la pureza genética de diferentes linajes. Así, las secuencias de ADN mitocondrial, que se heredan solo por línea materna, son muy útiles para estudiar la diversidad biológica.

En este caso, se usó el gen mitocondrial ND1 para analizar las poblaciones de saboga. Este estudio concluyó que existía en el Ebro un fenómeno de hibridación de ambas especies, encontrándose genes del sábalo en ejemplares que externamente eran sabogas. Este fenómeno podría ser una de las causas de pérdida de biodiversidad.



EXPRESIÓN DE Vasa EN CENTOLLO (Maja brachydactyla)

El aparato reproductor se desarrolla a partir de las células primordiales germinales, que se separan del resto de líneas celulares durante las primeras fases de la embriogénesis. Estas células expresan específicamente unos genes, de los cuales el gen *Vasa* es el mejor caracterizado. El objetivo de este estudio es la descripción del desarrollo del aparato reproductor en *Maja brachydactyla* utilizando el gen *Vasa* como marcador de las células germinales. Para ello, se realizó una PCR cuantitativa, que permite cuantificar la expresión de un gen determinado, para el gen *Vasa* y β -actina (usado como control interno) en muestras de los 3 estadios larvarios y primer juvenil. Los resultados preliminares muestran unos valores bajos de expresión del gen *Vasa* (Fig. 1 a), aunque detectables con nuestras condiciones. A lo largo del desarrollo larvario, se observó una disminución de la expresión, recuperándose los niveles observados en la zoea I tras la metamorfosis al primer juvenil (Fig. 1 b).

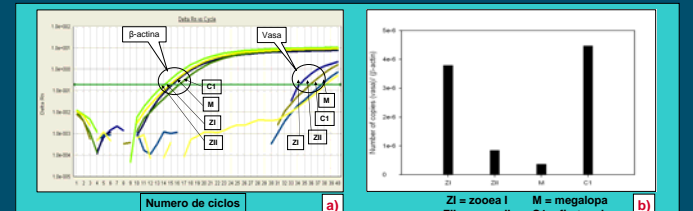


Fig. 1a) Gráficos de amplificación de β -actina y *Vasa* de los primeros estadios de *M. brachydactyla*. b) Expresión relativa de *Vasa* después de normalización a β -actina. Se aprecia un gradual descenso de *Vasa* justo antes del primer estadio Juvenil del congrijo.