



Mapa genético consenso de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) basado en marcadores microsatélites



C. Bouza¹, M. Hermida¹, B. G. Pardo¹, C. Fernández¹, G. G. Fortes¹, J. Castro¹, L. Sánchez¹, P. Presa², M. Pérez², J. A. Álvarez-Dios³, S. Ezcurra⁴, R. M. Cal⁵, F. Piferrer⁶, P. Martínez¹

¹ Departamento de Xenética, Universidade de Santiago de Compostela (USC), Facultade de Veterinaria, Campus de Lugo, 27002 Lugo, Spain; ² Departamento de Bioquímica, Xenética e Inmunoloxía, Facultade de Bioloxía, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Spain; ³ Departamento de Matemática Aplicada, (USC), Facultade de Matemáticas, 15782 Santiago de Compostela, Spain; ⁴ Departamento I+D Stolt Sea Farm S.A, Lira, 15292 Carnota, A Coruña, Spain; ⁵ Instituto Español de Oceanografía (IEO), Centro Oceanográfico de Vigo, 36280 Vigo, Spain; ⁶ Institut de Ciències del Mar, Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Passeig Marítim, 37-49. 08003 Barcelona. Spain.

ABSTRACT

A consensus genetic map of the turbot (*Scophthalmus maximus*), based on microsatellite markers. A consensus linkage map of the turbot (*Scophthalmus maximus*) was constructed from a haploid gynogenetic family and a biparental diploid family with known linkage phase. A total of 242 microsatellites were mapped in 26 linkage groups. The consensus map length was 1343,2 cM, with an average distance between markers of 6,5 cM. Similar length of female and male maps was evidenced. However, the recombination at common intervals were about 1.6 times higher in the *via* female map. This map will be suitable for QTL identification of productive traits in turbot and for further evolutionary studies in fish and vertebrate species.

MATERIAL y MÉTODOS

Familias de referencia: i) haploide con 96 embriones haploides (HF), obtenidos en el Instituto Español de Oceanografía de Vigo; ii) diploide biparental, con una progenie de 85 juveniles (DF), suministrada por Stolt Sea Farm. Extracción de ADN: protocolo Chelex® en embriones haploides, y fenol-cloroformo en las muestras restantes. Un total de 316 microsatélites disponibles en rodaballo (Estoup et al. 1998; Coughlan et al. 1998; Iyengar et al. 2000; Bouza et al. 2002; Pardo et al., 2005, 2006; 2007) fueron amplificados en la madre de la familia HF, seleccionando 248 para el análisis de ligamiento, en base a criterios técnicos y de polimorfismo. En la familia DF fueron genotipados todos los marcadores monomórficos en HF, más un subconjunto de 81 marcadores de anclaje distribuidos uniformemente en el mapa HF. Genotipado: mediante un secuenciador ABI 3100 y el programa GENEMAPPER versión 3.7 (Applied Biosystems). Los mapas HF y DF fueron construidos independientemente utilizando JOINMAP 3.0 (van Ooijen y Voorrips 2001). Además, los genotipos de la familia DF se organizaron en dos conjuntos de datos para construir un mapa genético paterno y materno. Los grupos de ligamiento (LG) fueron establecidos a LOD > 3,0. Se comprobó la presencia de dobles recombinantes, siendo verificados o corregidos. El mapa de referencia de cada familia se estableció con LOD > 3,0 y recombinación < 0,40. Las distancias genéticas se estimaron mediante JOINMAP 3,0 (función de Kosambi). El mapa consenso se construyó integrando las dos familias de referencia (JOINMAP 3.0; LOD > 3,0; recombinación < 0,40). La ordenación de marcadores por LG se realizó a LOD > 2,0. Los marcadores ordenados a LOD < 2,0 se representaron como accesorios. Los mapas gráficos fueron generados utilizando MAPCHART 2.1 (Voorrips 2002). El análisis comparativo de las secuencias de rodaballo fue realizado mediante NCBI-BLAST contra los genomas de peces modelo *Tetraodon nigroviridis*, *Takifugu rubripes* y *Danio rerio*.

INTRODUCCIÓN

El rodaballo (*Scophthalmus maximus*) es un pez plano de gran valor comercial. La mejora genética de su producción constituye un desafío investigador en el contexto de un mercado global competitivo. Entre sus principales objetivos: minimizar consanguinidad y pérdidas de diversidad genética, el control de la proporción de sexos y la selección de reproductores para resistencia a determinadas enfermedades o para mayor tasa de crecimiento. El conocimiento genómico de esta especie está limitado a estudios cariotípicos (Bouza et al. 1994; Cuñado et al. 2001) y al desarrollo reciente de marcadores a escala genómica (Pardo et al. 2006; 2007). Presenta un genoma pequeño comparado con otros peces y vertebrados (Cuñado et al. 2001).

Los mapas genéticos representan herramientas esenciales de investigación genómica, siendo una primera aproximación para identificar genes de interés relacionados con caracteres productivos. El análisis de ligamiento proporciona mapas de referencia para desarrollar mapas físicos y proyectos genoma, así como estudios evolutivos a través del mapeo comparativo (Danzmann y Gharbi 2001). El análisis de múltiples poblaciones segregantes permite el mapeo integrado de un gran número de marcadores en un único mapa consenso, siendo escasas las referencias en peces no modelo (Lee et al. 2005; Gharbi et al. 2006). Los microsatélites son marcadores idóneos para la construcción de mapas genéticos de moderada y alta densidad (Kai et al. 2005; Wang et al. 2007). Este estudio presenta la construcción de un mapa genético consenso en rodaballo con densidad suficiente para la búsqueda de QTLs (quantitative trait loci) y en estudios evolutivos.

RESULTADOS

El mapa consenso (Figura 1) contiene 242 microsatélites con 229 posiciones únicas, y solamente seis marcadores no ligados. Se encontraron 26 LGs con una media de 9,3 microsatélites por LG, oscilando entre 0 cM (2 marcadores en el LG26) y 115,1 cM (14 loci en el LG1). La longitud de mapa total fue 1343,2 cM, y el rango de distancia entre marcadores de 0 a 33,4 cM, con un promedio de 6,5 cM. En el mapa de referencia, 61% de los intervalos presentaron < 5 cM, 20% entre 5 y 10 cM, 14% entre 10 y 20 cM, y sólo un 5% mostraron > 20cM. El orden de marcadores en el mapa consenso fue esencialmente similar al de los mapas individuales. Los mapas específicos de sexo mostraron esencialmente la misma longitud de mapa, pero la recombinación fue significativamente superior en el mapa femenino para marcadores informativos comunes (Fig. 2). Un 24% de secuencias de rodaballo mostraron similitud significativa ($e < 10^{-5}$) con secuencias genómicas conocidas de *T. nigroviridis*; muchas de ellas (78%) también homólogas respecto a *T. rubripes*. El número de homología significativa con *D. rerio* fue menor (9%). El análisis comparativo reveló varias regiones sinténicas entre los mapas genéticos de rodaballo y *Tetraodon* (Fig. 3).

DISCUSIÓN

El mapa consenso de rodaballo consolida grupos de ligamiento de diferentes familias de referencia: una diploide relacionada con experimentos de QTLs, y otra haploide idónea para el mapeo futuro de marcadores dominantes (RAPD, AFLP). El número de grupos de ligamiento del mapa consenso excede el número haploide de cromosomas de rodaballo (22; Bouza et al. 1994). La discrepancia comúnmente descrita en mapas genéticos de peces, incluyendo el de tilapia (>500 microsatélites; Lee et al. 2005), se espera solventar aumentando el número de marcadores. La *ratio* de recombinación entre sexos para intervalos de mapa comunes fue similar a la descrita en otros mapas de peces basados en microsatélites, como lubina y dorada (Chistiakov et al. 2005; Franch et al. 2006). Al igual que en rodaballo, en otros peces se ha descrito una longitud similar entre mapas masculino y femenino, pero con tasas de recombinación específicas de sexo entre intervalos de mapa (Kai et al. 2005; Wang et al. 2007). La resolución promedio del mapa de rodaballo ofrece una densidad suficiente para la identificación de QTLs (Dekkers y Hospital 2002). La variación en recombinación específica de sexo y posición puede tener implicaciones prácticas al facilitar el diseño experimental para el rastreo genómico en rodaballo. El mapeo comparativo de secuencias de rodaballo respecto a genomas de peces modelo resultó filogenéticamente congruente, con resultados globales similares a los obtenidos de forma análoga en otros Acantopterygii (Franch et al. 2006; Wang et al. 2007). Estas secuencias conservadas, independientemente de su papel funcional, constituyen herramientas útiles para el mapeo comparativo, respecto a peces modelo con mayor desarrollo genómico (Franch et al. 2006; Wang et al. 2007).

CONCLUSIONES

Este estudio presenta el primer mapa genético de rodaballo basado en microsatélites, una herramienta básica de análisis genómico en esta especie. Su aplicación permitirá la localización de QTLs y regiones genómicas relacionadas con caracteres productivos (resistencia a enfermedades, crecimiento, determinación sexual), como base para la selección de reproductores asistida por marcadores. El mapa integrado representa un recurso genómico a partir del cual seleccionar marcadores para futuros proyectos de mapeo genético y/o físico en rodaballo, pero también para estudios de mapeo comparativo en peces.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Xunta de Galicia (PGDIT04RMA261014PR). Nuestro agradecimiento a Lucía Insua, María Portela, Susana Sánchez, María López y Sonia Gómez por la asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- Bouza, C., L. Sánchez y P. Martínez. 1994. *Mar. Biol.* 120: 609-613.
 Chistiakov, D. A., B. Hellemans y F. A. M. Volckaert. 2005. *Aquaculture* 255: 1-29.
 Coughlan, J. P., E. McCarthy, D. McGregor, P. O'Donoghue, P. Galvin et al. 1996. *Anim. Genet.* 27: 433-442.
 Cuñado, N., J. Terrones, L. Sánchez, P. Martínez y J. L. Santos. 2001. *Genome* 44: 1143-1147.
 Dekkers, J. C. M., y F. Hospital. 2002. *Nat. Rev. Genet.* 3: 22-32.
 Danzmann, R. G., y K. Gharbi. 2001. *Genetica* 111: 3-23.
 Estoup, A., K. Gharbi, M. San Cristobal, C. Chevalet, P. Haffray et al. 1998. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 715-725.
 Franch, R., B. Louro, M. Tsalavouta, D. Chatziplis, C. S. Tsigenopoulos et al. 2006. *Genetics* 174: 851-861.
 Gharbi, K., A. Gautier, R.G. Danzmann, S. Gharbi, T. Sakamoto et al. 2006. *Genetics* 172: 2405-2419.
 Iyengar, A., S. Piyattanakorn, D. A. Heipol, D. M. Stone, B. R. Howell et al. 2000. *Mol. Ecol.* 9: 368-371.
 Kai, W., K. Kikuchi, M. Fujita, H. Suetake, A. Fujiwara et al. 2005. *Genetics* 171: 227-238.
 Lee, B. Y., W. L. Lee, J. T. Streefman, K. L. Carleton y E. H. Aimee. 2005. *Genetics* 170: 237-244.
 Pardo, B. G., M. Hermida, C. Fernández, C. Bouza, M. Pérez et al. 2006. *Aquaculture Res.* 37: 1578-1582.
 Pardo, B. G., C. Fernández, M. Hermida, A. Vázquez, M. Pérez et al. 2007. *Genome* (in press).
 Van Ooijen, J. W., y R. E. Voorrips. 2001. JoinMap® version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen: Plant Research International.
 Voorrips, R. E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 93: 77-78.
 Wang, C. M., Z. Y. Zhy, L. C. Lo, F. Feng, G. Lin et al. 2007. *Genetics* 175: 907-915.

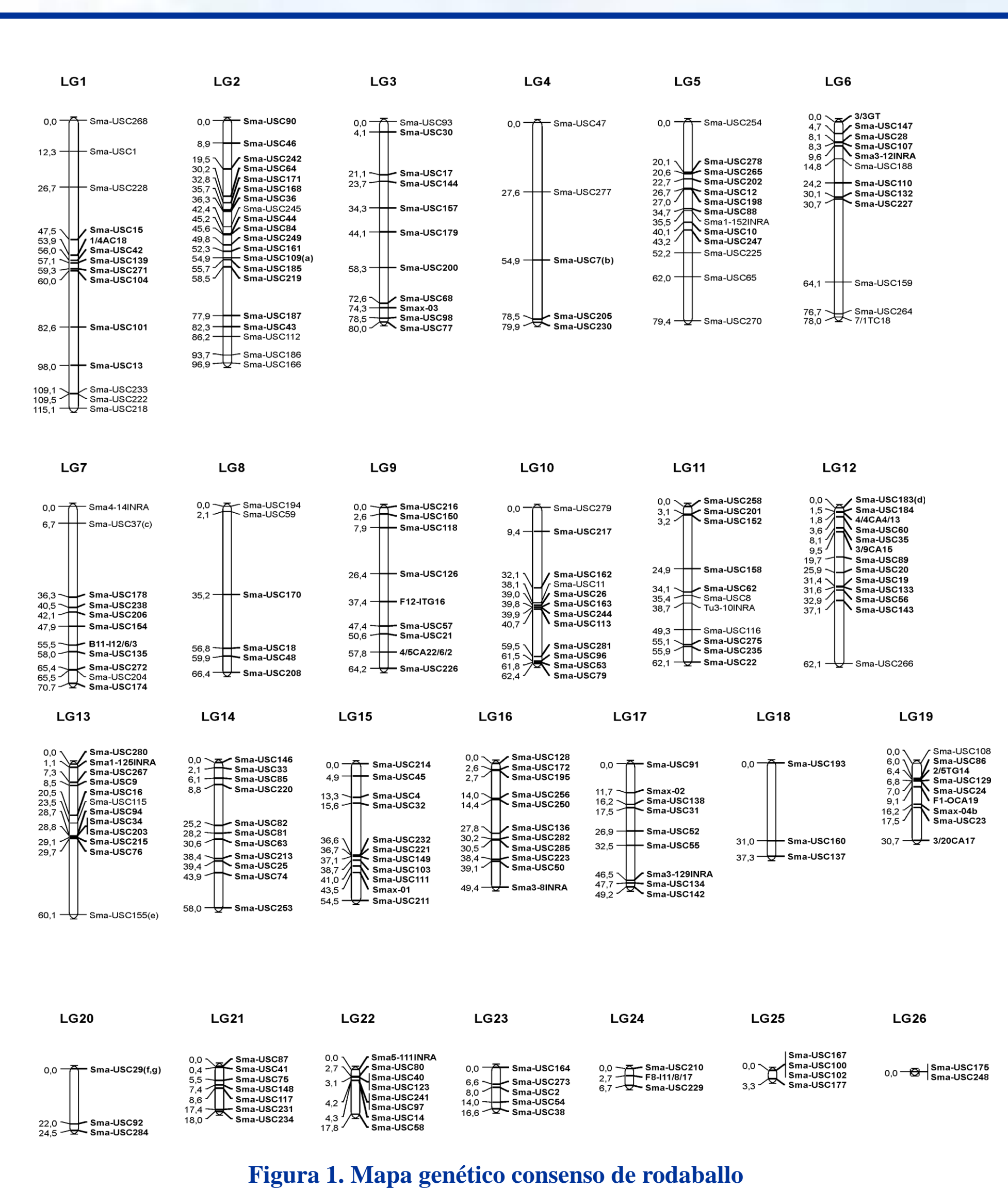


Figura 1. Mapa genético consenso de rodaballo

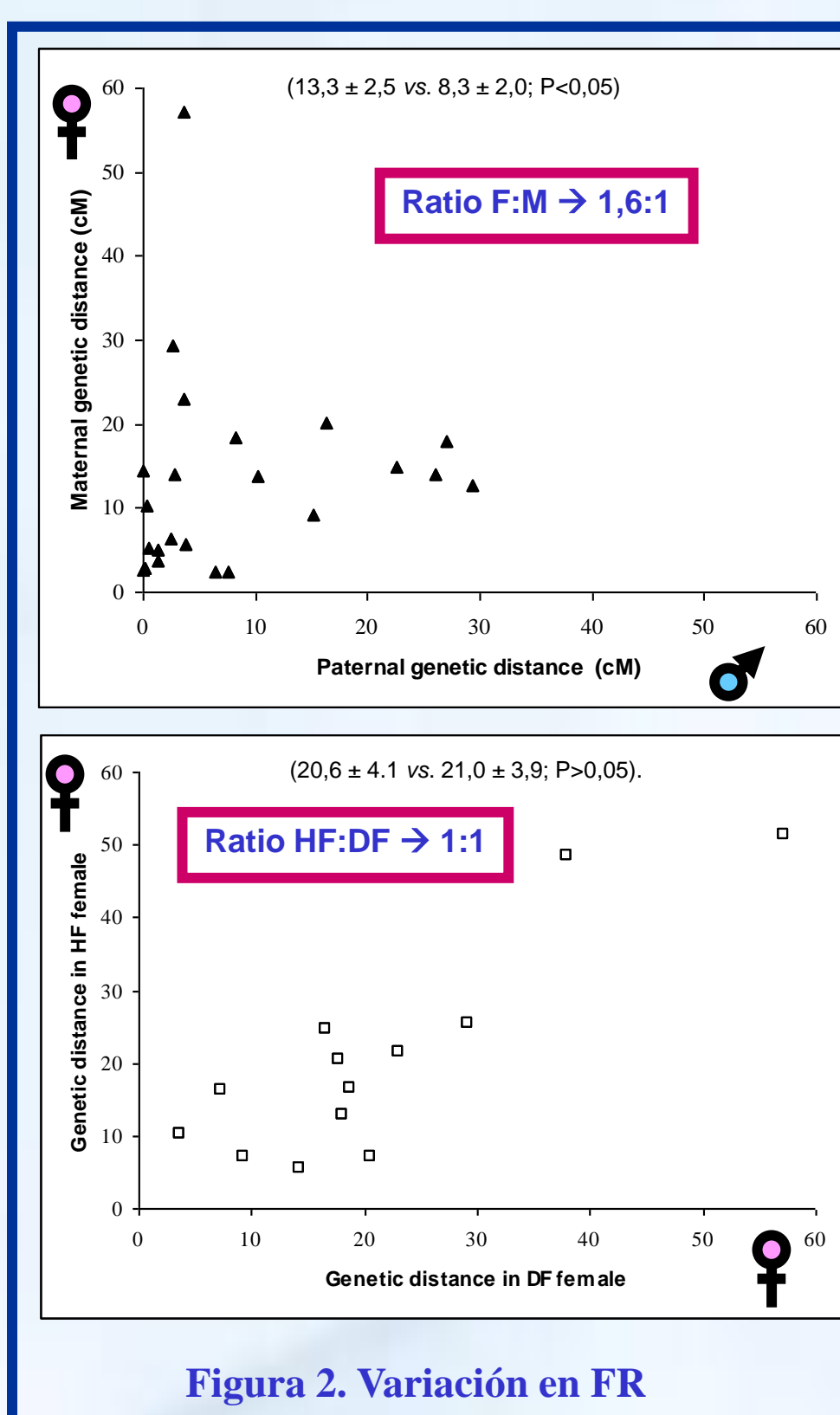


Figura 2. Variación en FR

| Grupos de ligamiento Rodaballo | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | N | L | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|--|--|
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ? | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |

Figura 3. Mapeo comparativo: secuencias sinténicas Rodaballo vs Tetraodon