

## **4.5 Muestreo genético**

### **4.5.1 Objetivos del muestreo genético**

Para el estudio de la genética de población existen métodos para identificar una variedad de atributos de una determinada población. De especial interés en las pesquerías es la identificación de aspectos de la especie (grupo de especies, tipos de especies (es decir, especies individuales), subespecies, stocks) así como la estructura, distribución geográfica y los límites de cada uno de los atributos de la especie.

La identificación de especies puede resultar útil para la aplicación de las regulaciones cuando la identificación errónea es algo común. Por ejemplo, el rabil y el patudo pequeño se prestan a confusión.

Para una ordenación efectiva de las especies de túnidos, que son altamente migratorios, es importante identificar las fronteras del stock (por ej. atún rojo del Atlántico). Ello se basa en la teoría de que la subdivisión de la población puede tener como resultado una diferenciación genética de poblaciones aisladas por deriva genética y selección. Para identificar poblaciones, el enfoque general es por tanto observar la diversidad/desigualdad a escala de población.

Es importante señalar que la ausencia de evidencia genética de subestructura de población no significa que dicha subestructura no exista. La diferenciación genética entre stocks dentro del mismo océano podría ser muy pequeña, con frecuencia tendrá la misma magnitud que el error de muestreo. Por ello, en los estudios genéticos de estructura del stock se debe prestar especial atención al diseño experimental y a los protocolos del muestreo, con el fin de potenciar al máximo la relación de señal a ruido en los datos. Sin embargo, la diferenciación genética puede no darse si los tamaños de la población son importantes y también debido a la migración. Los modelos teóricos de diferenciación de productos de genes nucleares y la diferenciación del ADNmt indican que la migración de una cierta magnitud de individuos por generación podría bastar para impedir la diferenciación genética. Esta tasa de migración es mínima en cuanto al volumen de intercambio que sería necesario para recuperar poblaciones mermadas a un nivel interesante para quienes explotan estas poblaciones. Teniendo en cuenta las limitaciones inherentes a cada método, el mejor enfoque de evaluación de estructura del stock es el holístico, que se sirve de toda la información genética, demográfica, ecológica y estudios del ciclo vital (Waples, 1998).

### **4.5.2 Objetivos de las muestras**

El objetivo de las muestras a tomar quedará definido por los que tenga el programa de muestreo en sí. El muestreo local hallará las variaciones localizadas y la mezcla en la población por medio de análisis estadístico de los datos genotípicos. Un muestreo más amplio identificará las diferencias y similitudes genéticas a mayor escala. Por ejemplo, si se trata de estudiar las características natales de la población, el objetivo serán los peces pequeños. Estos peces deberán hallarse en su área de nacimiento. Por el contrario, los estudios a nivel de población requerirán muestras de toda la escala geográfica conocida o supuesta. La comparación de perfiles genéticos en diferentes muestras separadas en espacio y/o tiempo podría facilitar evidencia de patrimonios genéticos múltiples o stocks.

### **4.5.3 Tamaño de la muestra**

Los recursos financieros disponibles limitan con frecuencia el tamaño de la muestra. Sin embargo, los resultados de los análisis genéticos pueden verse muy influenciados por dicho tamaño. El número de lugares y años muestreados aumentará también el número de individuos a muestrear. En general, los programas completos analizan más de 100 muestras por unidad de muestreo (por ej., especie, lugar, año, etc.). El tamaño de muestra requerido dependerá de la diferenciación genética entre individuos de la especie en diferentes zonas geográficas (por ejemplo). Además, en algunos estudios se ha llegado a la conclusión que es importante potenciar al máximo el tamaño de la muestra y la cobertura temporal. Los resultados de estudios basados en muestras pequeñas pueden dar positivos falsos (por ejemplo Ely *et al.*, 2002). Por todo ello, conviene buscar asesoramiento estadístico adecuado durante la etapa de planificación del programa, con el fin de asegurar la posibilidad de alcanzar los objetivos deseados.

#### **4.5.4 Procedimientos de muestreo**

##### *Limpieza de las muestras*

Se debe evitar la contaminación. El cuchillo ha de limpiarse (por ejemplo con etanol) antes de cortar cada pez. Puede haber contaminación cuando se usa un instrumento cortante en un pez sin haberlo limpiado antes. En el caso de una posible contaminación el hecho se debe registrar en el formulario correspondiente a la muestra.

##### *Muestreo*

Se pueden muestrear el hígado, corazón y los tejidos musculares, así como la sangre, trozos de aleta o bien una porción del animal (por lo general, larvas o juveniles). Se recomienda que las muestras de corazón, hígado y músculo procedan de un solo pez. El acceso a estos tejidos podría ser limitado en algunas pesquerías, donde el precio en el mercado de los peces es un condicionante. En este caso el tejido más adecuado podría ser el músculo blanco. Al muestrear este músculo blanco, se debe extraer un trozo de piel de unos 9 cm de diámetro en la parte central del cuerpo entre la base de la aleta dorsal y la línea lateral, para descubrir el músculo.

Se toman unos 4cm<sup>3</sup> (~5g) de músculo, corazón e hígado (de cada uno). Se recomiendan el músculo y el corazón para los análisis de ADN. Limpiar, recortar y lavar en un tampón frío si es necesario (por ej. 50M EDTA). Se ha observado en algunos estudios que el aclarado aumenta los rendimientos de ADN mitocondrial cerrado circular (ADNmt). Se recomiendan piezas pequeñas para los análisis de ADN, asegurando así que el etanol penetra bien en los tejidos antes de su almacenaje.

Hay dos métodos diferentes para almacenar material procedente de peces: congelación y en etanol. El uso de uno u otro depende del tipo de estudio. La congelación es el mejor método para almacenar material destinado a la electroforesis y otros análisis biológicos (por ej., bioquímica y fisiología) debido a la fragilidad de las enzimas *in vitro*. Un almacenaje criogénico adecuado preservará la actividad enzimática y minimizará la rotura (por ej., con el uso de nitrógeno líquido). Las muestras conservadas en etanol SOLO se usarán para estudios genéticos, tales como la amplificación del ADN y secuenciación. Las muestras se pueden conservar en un 96% de etanol.

Para el almacenaje se debe meter la muestra en bolsas de plástico (cuando se congelan) o se meten en el vial de etanol y después en la bolsa de plástico (para el etanol). En todos los casos, las bolsas se consignarán los datos siguientes (si se tienen): fecha, barco, supuesta especie, talla, peso, sexo, lugar de la captura (longitud y latitud), tipo de cardumen de túnido y asociación, tipo de tejido y un número individual para cada muestra. Todas las que procedan de un mismo pez se marcarán con el mismo código. Si este pez ha servido para llevar a cabo otros estudios (madurez, etc.,) se consignará el mismo código en todos ellos.

En el caso de congelación de una muestra, se hará lo antes posible tras su recogida. Si no es posible, la muestra se conservará en hielo hasta su llegada al laboratorio y se meterá de inmediato en el congelador.

##### *Envío de muestras congeladas*

Las muestras han de ser enviadas al destinatario que proceda en hielo seco (basta con una nevera de espuma de poliestireno). Si no se dispone de hielo seco, la nevera se cubrirá de hielo y se meterá en un congelador unos días antes de su envío. Este se hará por el Sistema de Cargo Aéreo (Air Cargo System) en vuelo regular y como equipaje personal. Así resulta más rápido y barato. Lo más conveniente es enviar por fax al destinatario el documento "Air Waybill". Otra alternativa es enviar el número adjudicado al paquete en el envío.

##### *Envío de muestras en etanol*

El envío de bolsas con viales puede hacerse por correo ordinario o por cualquier otro sistema.

#### **4.5.5 Análisis de muestras**

El análisis de muestras de tejido para ADN requiere personal adiestrado y equipo adecuado. Aquí se describen las técnicas generales para facilitar conocimientos sobre el papel de los análisis genéticos. Para más detalles, se pueden consultar los artículos reseñados en el apartado de bibliografía.

La muestra de tejido puede dividirse y se pueden incubar pequeñas (por ej. de 100 mg, aunque esto dependerá de la sensibilidad de la técnica seleccionada) muestras en 1 ml de solución tampón de digestión. El período y temperatura de incubación dependerá del tejido y del método que se adopte (véase en Bibliografía). Métodos

alternativos para la obtención de ADN incluyen procedimientos con fenol/cloroformo, seguidos de precipitación de etanol.

#### *Identificación de especies*

Los patrones electroforéticos de aloenzimas y el ADN mitocondrial (ADNmt) han resultado ser útiles para distinguir las diferentes especies de túnidos. El ADN es el método preferido para el examen, ya que el ADN es el mismo en todos los tipos de células de un organismo, mientras que las proteínas pueden variar de un tejido a otro. Además, el ADN es estable y proporciona más información para el análisis que las proteínas. Por otra parte, las técnicas electroforéticas han probado ser menos adecuadas en la diferenciación de las especies de túnidos atlánticos (Bartlett y Davidson, 1991).

El análisis del haplotipo del ADNmt se ha empleado también para identificar especies. Por ejemplo, los haplotipos ADNmt ATCO se han usado para distinguir al patudo del rabil. Ward (1995) observó que el análisis del polimorfismo de tamaño de los fragmentos de restricción (RFPL) de varios genes mitocondriales permitió la clara distinción de las siete especies *Thunnus* basada en haplotipos exclusivos. Esto ha sido apoyado por pruebas de aloenzimas y ADNmt (Ward, 1995).

#### *Discriminación de la población*

Aunque se han analizado aloenzimas para cuantificar niveles de variación genética en el seno de las poblaciones y entre poblaciones, existen métodos más potentes. Estos incluyen técnicas de ADN nuclear por microsatélite y análisis de ADNmt de la región de control “D-loop”.

Si bien la importancia del ADNmt en la identificación de la subdivisión de la población está bien documentada, análisis basados tan solo en frecuencias de haplotipos de ADN mt podrían realmente reflejar una dispersión dependiente del sexo o pautas de migración. Esto se debe a que el ADN mt tan sólo lo transmite la hembra progenitora. Además, la naturaleza no recombinante del genoma del ADNmt hace que se comporte como un solo locus genético, lo cual reduce en potencia la facultad para detectar una diferenciación genética significativa (Greig *et al.*, 1999). En consecuencia, los análisis de estructura de población que proporcionan mayor información combinan múltiples loci para comprobar la similitud de patrones filogenéticos.

#### **4.5.6 Análisis de los resultados**

Los niveles de variación genética pueden ser evaluados en números de alelos por locus y observados ( $H_{obs}$ ), y Hardy-Weinberg esperaban hallar heterocigosidad ( $H_{exp}$ ) (sólo para ADN nuclear). Comparando  $H_{obs}$  con  $H_{exp}$ , y haciendo pruebas en busca de desviaciones partiendo del equilibrio dentro de las muestras, de Ardy-Weinberg, se puede evaluar la importancia de la variación genética.

Se puede evaluar la homogeneidad de la frecuencia de microsatélites de los alelos entre poblaciones temporales y espaciales. Las muestras temporales procedentes de la misma zona espacial pueden agruparse siempre que no difieran mucho en cuanto a frecuencia de alelos. Después se pueden comparar los datos espaciales. Se recomienda el uso de la técnica secuencial Bonferroni (Rich, 1989) para ajustar niveles de importancia para comparaciones simultáneas múltiples. La diferenciación de población puede también medirse por medio de análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992).

Otra técnica es el análisis jerárquico de diversidad nucleótida como medida de diferenciación de la población (Holsinger y Mason-Gamer, 1996). Este método permite el examen de población de estructura geográfica empleando datos de sitio de restricción y de la secuencia de ADN donde la variación no se hereda de forma independiente. Las poblaciones se agrupan basándose en el tiempo medio de unión por pares de haplotipo. Los resultados se presentan en un diagrama de árbol que muestra la relación entre poblaciones tras realizar un remuestreo de los datos 10.000 veces. Los valores P importantes implican que la media de tiempo para unir dos haplotipos del mismo nudo de un árbol es inferior a la que necesitan dos procedentes de diferentes nudos.

#### **4.5.7 Bibliografía**

APPLEYARD, S.A., P.M. Grewe, B.H. Innes, and R.D. Ward (2001). Population structure of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the western Pacific Ocean, inferred from microsatellite loci. *Marine Biology* 139: 383-393.

- BARTLETT, S.E. and W.S. Davidson (1991). Identification of *Thunnus* tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 309-317.
- ELY, B., D.S. Stoner, J.R. Alvarado Bremer, J.M. Dean, P. Addis, A. Cau, E.J. Thelen, W.J. Jones, D.E. Black, L. Smith, K. Scott, I. Naseri, and J.M. Quattro (2002). Analysis of nuclear *ldhA* gene and mtDNA control region sequences of Atlantic northern bluefin tuna populations. *Mar. Biotechnol.* 4, 583-588.
- EXCOFFIER, L., P.E. Smouse, and J.M. Quattro (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes-Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- GREIG, T.W., J.R. Alvarado Bremer, and B. Ely (1999). Preliminary results from genetic analyses of nuclear markers in swordfish, *Xiphias gladius*, reveal concordance with mitochondrial DNA analyses. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 49(1): 476-482.
- HOLSINGER, K.E. and R.J. Mason-Gamer (1996). Hierarchical analysis of nucleotide diversity in geographically structured populations. *Genetics* 142, 629-639.
- PUJOLAR, J.M., M.I. Roldán, and C. Pla (2003). Genetic analysis of tuna populations, *Thunnus thynnus thynnus* and *T. alalunga*. *Marine Biology* 143, 613-621.
- WAPLES, R. (1998). Identifying stock structure and resolving stock mixtures in tuna. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT* 50, 207-208.
- WARD, R.D. (1995). Population genetics of tunas. *J. Fish Biol.* 47, 259-280.