



Resumen en extenso

Evolución del genoma en lenguado y su aplicación en acuicultura para mejorar la producción.

Manchado, M.

IFAPA Centro El Toruño, Junta de Andalucía, Camino Tiro Pichón s/n, 11500 El Puerto de Santa María, Cádiz, Spain.

*E-mail: manuel.manchado@juntadeandalucia.es



Cite this paper/Como citar este artículo: Manchado, M. (2021). Evolución del genoma en lenguado y su aplicación en acuicultura para mejorar la producción. *Revista Bio Ciencias* 8: (Suppl) Memorias del 3er Coloquio de Nutrigenómica y Biotecnología Acuícola 2020 (CONYBA) e1181. <http://doi.org/10.15741/revbio.08Suppl.e1181>

Resumen

El lenguado (*Solea senegalensis*) es una especie de gran importancia económica en España. Para un desarrollo sostenible de su acuicultura requiere aún superar importantes retos tecnológicos derivados de la reproducción, el crecimiento y tasas de dispersión, el control de enfermedades y mejorar la calidad morfológica. Existe un amplio consenso sobre el importante papel y beneficios que las tecnologías genéticas y genómicas pueden aportar para mejorar de estos caracteres en las distintas etapas de producción. Desde hace más de 10 años, el grupo de investigación en genética de IFAPA centro El Toruño investiga sobre genomas y transcriptomas y cómo aplicarlo en la mejora de los procedimientos productivos. Los últimos avances en la secuenciación de genomas, mapas genéticos, identificación de marcadores ligados al sexo y crecimientos han modificado la forma en la que actualmente diseñamos los programas de selección. Además, este potencial se ha reforzado con la aplicación de técnicas de reprogramación epigenética para modular el crecimiento y las ratios de sexos en las poblaciones para mejorar los rendimientos animales.

Abstract

Sole (*Solea senegalensis*) is an economically important flatfish in Spain. For a sustainable development of aquaculture, it is still required to deal with technological challenges related to reproduction, growth and size dispersion, disease control and the improvement of morphological quality. There is a wide consensus about the important role and benefits of genetic and genomic technologies to improve all these traits during the different periods of the production cycle. During the last 10 years, the genetic research group at IFAPA centro El Toruño investigates on genomes and transcriptomes and how to apply to improve the operational methods in the industry. The last advances in genome sequencing, genetic maps,

identification of markers linked to the sex and growth have modified the way in which we currently design the breeding programs. Moreover, this potential has been reinforced by the application of epigenetic reprogramming techniques to modulate growth and sex ratios in the populations to enhance fish performance.

Introducción

La acuicultura del lenguado está alcanzando un alto desarrollo en el sur de Europa. Esta especie habita en aguas costeras y estuarios y está muy adaptada a los cambios fluctuantes que ocurren en el medio. El lenguado es actualmente la especie acuícola de mayor precio en primeras ventas por su alta demanda en los mercados nacionales y europeos. Su producción en acuicultura es clave para reducir el esfuerzo pesquero y realizar una gestión eficaz de sus pesquerías y sus efectos colaterales. La importante reducción en la pesquería de lenguado en Europa en la década de 2000 y la alta demanda en los mercados disparó el desarrollo de la acuicultura especialmente en los países del Sur de Europa. En Andalucía, la producción del lenguado se inició entre los años 2000-2006, fundamentalmente en estero. Sin embargo, las enfermedades y la falta de tecnología de cultivo específica para este modelo productivo favorecieron su abandono y falta de interés por las empresas (Manchado *et al.*, 2016). Sin embargo, las nuevas tecnologías de cultivo tipo sistemas de recirculación (RAS) y las mejoras en los procedimientos de cultivo han permitido crear un nuevo modelo de negocio alternativo al estero tradicional y ha supuesto el impulso de la acuicultura de esta especie, lo cual es necesario para consolidar este sector en la región como una fuente importante de riqueza y empleo. Esta producción, con un alto grado tecnológico, de lenguado, tanto de alevines como de engorde en sistemas RAS han hecho que las cifras aumenten a las 500 Tm (más de 800 Tm en España) con una

alta demanda para nuevas instalaciones que permite constituirse en una actividad de futuro. Existe un amplio consenso sobre el importante papel y beneficios que las tecnologías genéticas y genómicas pueden aportar para la mejora de los principales caracteres productivos en las distintas etapas de producción en lenguado. Por ello, el principal de este trabajo es revisar los principales avances en estos campos en lenguado su impacto para la acuicultura del lenguado.

Investigación biotecnológica y aplicaciones Genómica and mejora

El lenguado tiene 21 parejas de cromosomas (3 metacéntricos, 2 submetacéntricos, 4 subtelocéntricos y 12 acrocéntricos). Durante los últimos años de investigación genómica en lenguado han sido varios los trabajos que han tratado caracterizar estos cromosomas a través de mapas integrados tanto citogenéticos, físicos y genéticos (Manchado *et al.*, 2016; 2019). En 2013 se describió el primer ensamblaje físico del genoma de lenguado con 34 176 fragmentos y un tamaño N50 de 85.6kb (Manchado *et al.*, 2016). Posteriormente en 2016, se consiguió un genoma mucho más completo de una hembra con el uso de lecturas largas de Nanopore y cortas de Illumina (Guerrero-Cozar *et al.*, 2020). Este genoma tuvo sólo 5 748 fragmentos con un N50 de 339,9 Kb y 608,0 Mbp. Ya más reciente se ha conseguido secuenciar el genoma de un macho con sólo 3 403 fragmentos y un N50 de 512,7 kb y un tamaño global de 609,4 Mbp Este último genoma permitió identificar 28 988 genes codificantes y 21 123 genes no codificantes. A pesar de obtener estos mapas físicos, estos estudios per sé no fueron capaces de ensamblar los 21 cromosomas esperados en lenguado. Por ello, varios autores han intentado localizar y ordenar los fragmentos a través de los mapas genéticos integrados. De un lado, se ha hecho un importante esfuerzo en la integración de mapas citogenéticos y físicos lo cual ha permitido validar mediante análisis de imagen y posicionamiento directo fragmentos específicos de BAC en cada cromosoma. De esta forma se ha conseguido posicionar al menos un BAC en cada brazo cromosómico (García *et al.*, 2019). Otra estrategia complementaria se basa en la integración de mapas físicos y genéticos. Recientemente, nuestro laboratorio ha construido un mapa de ligamiento a partir de 16 287 SNPs que se agruparon en 21 grupos de ligamiento. Posteriormente, mediante desarrollos bioinformáticos se ha conseguido anclar el mapa genético y físico del macho de tal forma que se han posicionado 1 665 fragmentos en los 21 pseudo-cromosomas que representa el 89.9% del mapa físico y por tanto ya podemos disponer de una herramienta basada en genoma para los estudios de asociación y QTLs.

Los mapas físicos que se han explicado anteriormente han sido claves para varios trabajos realizados orientados a la identificación de marcadores ligados al sexo en lenguado. En un trabajo publicado en 2018 sobre hibridación de especies, se analizaron SNPs en 41 hembras y 33 machos salvajes usando como referencia el

genoma de hembra y identificó un marcador que estaba débilmente ligado al sexo (Souissi *et al.*, 2018). Estudios posteriores de mapeo de lecturas de genoma de macho y hembra encontraron regiones cromosómicas polimórficas entre sexos y se validaron marcadores que estaban débilmente asociados al sexo (Claros, comunicación personal). Más recientemente, mediante el uso de familias y de forma controlada para más de 20 000 SNPs se ha identificado una región ligada al sexo en el LG18 de lenguado. Este hallazgo es muy novedoso y abre la vía a su aplicación para generar poblaciones monosexo en lenguado.

Además de la genómica como herramienta fundamental para avanzar en el conocimiento evolutivo y de factores reguladores, la producción acuícola necesita del desarrollo de programas de mejora genética. Para su desarrollo y en colaboración con empresas del sector hemos diseñado programas basados en puestas masales y reconstrucción de pedigrí mediante marcadores moleculares. Para ello, hemos establecido 4 sistemas de PCR múltiple de alta variabilidad para la asignación de parentesco para el posterior cálculo de los valores genéticos aditivos y estimas de heredabilidad. De esta forma, estamos realizando estudios para mejorar el crecimiento y la calidad morfológica obteniendo valores de heredabilidad altos a 400 días de cultivo para la mayoría de caracteres (0.57-0.62). Al sacrificio estos valores son menores, pero aún siguen siendo mayores de 0.4 lo que indica un alto componente genético que permite avanzar en la capacidad productiva de lenguado mediante selección genética. Además, estos estudios se están completando con el uso de arrays de genotipado de baja densidad para encontrar QTLs relacionados con el peso y longitud habiendo encontrado actualmente 2 marcadores asociados al crecimiento cuya función principal está relacionada con la provisión de energía celular y la modificación epigenética.

Regulación epigenética

La regulación epigenética o impronta genética representa otra estrategia muy innovadora complementaria a la estrategia clásica de selección y que en lenguado podría ser una opción para mejorar la producción. La impronta se beneficia de la plasticidad de los primeros estadios de desarrollo de los peces para influir en su diferenciación sexual o el desarrollo muscular y mejorar así los índices de crecimiento. Los últimos estudios muestran que factores ambientales y nutricionales durante el cultivo son capaces de provocar efectos a largo plazo sobre el crecimiento la diferenciación sexual y otras funciones fisiológicas y patológicas comunes (Piferrer, 2013). La temperatura se ha identificado como uno de los principales factores de regulación epigenética en peces lo que se conoce como "impronta térmica". Dicha interacción entre temperatura y diferenciación muscular es compleja y está muy influenciada por la especie, duración de la impronta o el intervalo de desarrollo en los que se aplican los tratamientos. El lenguado no es ajeno a estos efectos y se ha demostrado que la

temperatura durante la incubación de embriones puede determinar un efecto duradero en la composición y desarrollo muscular. Los embriones incubados a temperaturas frías (15°C) tienen un menor desarrollo muscular modificando ligeramente la expresión de algunos genes implicados en el desarrollo muscular y estrés en fases tempranas (Campos *et al.*, 2013b). Además, la temperatura fría en lenguado activa la expresión las metiltransferasas dependientes de citosina *dnmt1* y *dnmt3b* e incrementa la metilación del promotor del gen *myod* reduciendo su expresión (Campos *et al.*, 2013a). Sin embargo, estos estudios sólo han evaluado los efectos a corto plazo (no más de 30 días) con pequeñas diferencias entre tratamientos. Además, los termociclos entre el día y la noche de $\pm 3^{\circ}\text{C}$ han demostrado una inversión en la ratio de sexos (Blanco-Vives *et al.*, 2011). Nuestro grupo ha conseguido modificar las ratios sexuales, así como las tasas de crecimiento mediante cultivo a bajas temperaturas (Manchado, comunicación

personal). En la mayoría de casos, la *dnmt3aa* es un indicador de metilación que asocia a menor crecimiento. Sin embargo, este es un campo aún en desarrollo que requiere estudios más completos sobre sus efectos durante el desarrollo embrionario ligado a la fase de desarrollo y durante períodos más largos para establecer de forma más precisa la naturaleza de los cambios observados y poder implementar protocolos de impronta para el beneficio de las empresas abriendo así nuevas vías a la innovación en los procedimientos de producción.

Conclusión

La investigación genética y genómica realizada en lenguado está permitiendo importantes avances para su aplicación en la industria acuícola. Su integración con las tecnologías epigenéticas representa una visión holística para conseguir una acuicultura más sostenible y competitiva a largo plazo del lenguado.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por los proyectos RTA2017-00054-C03-01 y RTA2017-00054-C03 financiados por MCIU/AEI/FEDER, UE y cofinanciado en un 80% por el Programa Operativo FEDER de Andalucía 2014-2020, proyecto PP.AVA.AVA201601.9 SOLEALGAE, y por el Fondo Europeo Marítimo y de Pesca (FEMP) código PR.FEM.PPA201700.15

Referencias

- Blanco-Vives, B., Vera, L. M., Ramos, J., Bayarri, M. J., Mananos, E. and Sanchez-Vazquez, F. J. (2011). Exposure of larvae to daily thermocycles affects gonad development, sex ratio, and sexual steroids in *Solea senegalensis*, kaup. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 315: 162-169. <https://doi.org/10.1002/jez.664>
- Campos, C., Valente, L. M., Conceicao, L. E., Engrola, S. and Fernandes, J. M. (2013a) Temperature affects methylation of the myogenin putative promoter, its expression and muscle cellularity in Senegalese sole larvae. *Epigenetics*, 8 (4): 389-397. <https://doi.org/10.4161/epi.24178>
- Campos, C., Valente, L. M., Conceicao, L., E., Engrola, S., Sousa, V., Rocha, E. and Fernandes J.M. (2013b). Incubation temperature induces changes in muscle cellularity and gene expression in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Gene*, 516 (2): 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.074>
- García, E., Cross, I., Portela-Bens, S., Rodríguez, M. E., García-Angulo, A., Molina, B., Cuadrado, A., Liehr, T. and Rebordinos, L. (2019). Integrative genetic map of repetitive DNA in the sole *Solea senegalensis* genome shows a Rex transposon located in a proto-sex chromosome. *Sci Rep*, 9: 17146. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53673-6>
- Guerrero-Cózar, I., Perez-García, C., Benzekri, H., Sánchez, J., Seoane, P., Cruz, F., Gut, M., Zamorano, M. J., Claros, M. G. and Machado, M. (2020). Development of whole-genome multiplex assays and construction of an integrated genetic map using SSR markers in Senegalese sole. *Sci. Reports. In press*, 21905. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78397-w>
- Manchado, M., Planas, J. V., Cousin, X., Rebordinos, L. and Claros, M. G. (2016). Current status in other finfish species: Description of current genomic resources for the gilthead seabream (*Sparus aurata*) and soles (*Solea senegalensis* and *Solea solea*). *Genomics in Aquaculture*, 195-221. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801418-9.00008-1>
- Manchado, M., Planas, J. V., Cousin, X., Rebordinos, L. and Claros, M. G. (2019). Genetic and genomic characterization of soles. In: *The Biology of Sole*. ed. by J. Muñoz-Cueto, Mañanós-Sánchez, E. and Sánchez-Vázquez, F. 375-394 Boca Raton, CDC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315120393-19>
- Piferrer, F. (2013). Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Dev Dyn*, 242: 360-370. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23924>
- Souissi, A., Bonhomme, F., Machado, M., Bahri-Sfar, L. and Gagnaire, P. A. (2018). Genomic and geographic footprints of differential introgression between two divergent fish species (*Solea* spp.). *Heredity*, 121: 579-593. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0079-9>