

Creación y caracterización de un banco de esperma de lubina *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) de una población mediterránea

A. García Alcázar¹, O. Chereguini², J. M. Porta³, J. Porta³,
M. C. Álvarez Herrero³ y E. Abellán Martínez¹

¹ Centro Oceanográfico de Murcia. Instituto Español de Oceanografía. Carretera de la Azohía, s/n. E-30860 Puerto de Mazarrón (Murcia), España. Correo electrónico: alicia.garcia@mu.ieo.es

² Centro Oceanográfico de Santander. Instituto Español de Oceanografía. Barrio Corbanera, s/n. E-39012 Santander (Cantabria), España.

³ Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Campus Universitario Teatinos. E-29071 Málaga, España.

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

RESUMEN

Con el objetivo de conservar los recursos genéticos de la lubina *Dicentrarchus labrax* (L., 1758), se ha creado un banco de esperma con 42 machos de una población mediterránea. Se determinaron las características del esperma –concentración, motilidad y duración de la activación– que resultaron adecuadas para la fertilización artificial. La variabilidad genética de las lubinas procedentes del medio natural fue analizada mediante un conjunto de 10 *loci* microsatélites. A partir del genotipo de estos marcadores se obtuvo la huella de ADN de cada individuo con fines de identificación y estudios de paternidad. El análisis conjunto de todos los individuos permitió determinar los registros de las variables genéticas de este grupo. Los resultados muestran unos niveles altos de variabilidad genética representativos de una población natural y acentúan la importancia de este grupo como reservorio de esta especie en términos genéticos.

Palabras clave: Acuicultura de peces, conservación, recursos genéticos, *Dicentrarchus labrax*, criopreservación, banco de esperma.

ABSTRACT

Establishment and characterization of a sperm bank of Mediterranean seabass *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) stock

With the aim of the conservation of the genetic resources of the European seabass *Dicentrarchus labrax* (L., 1758), a sperm bank of 42 males from a Mediterranean population has been established. The sperm characteristics –concentration, motility and duration of fertility– were assessed, and they proved suitable for artificial fertilization. The genetic structure of the original seabass broodstock from the wild was assessed by means of a set of 10 microsatellites. These genotype markers make it possible to obtain genetic fingerprinting from each individual for identification purposes. The population structure and genetic variability parameters found agree with those of natural populations from the same species, confirming its wild origin and enhancing its value as a genetic resource for the species in terms of genetic variability.

Keywords: Fish aquaculture, conservation, genetic resources, *Dicentrarchus labrax*, cryopreservation, sperm bank.

INTRODUCCIÓN

Aunque es difícil hacer una estimación real de la abundancia de las poblaciones de lubina *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) en el medio natural, es notoria la escasez de capturas en la zona mediterránea, oscilando en torno a 1 000 t anuales (<http://fao.org/figis/>). El estado de las pesquerías y el incremento del cultivo de lubina, con las inevitables fugas de individuos cultivados al medio natural, hacen peligrar la conservación de los genotipos silvestres de esta especie. Esta situación hace necesaria la puesta en marcha de actuaciones encaminadas a conservar el germoplasma de una población aparentemente amenazada de extinción. La creación y caracterización de un banco de esperma permitiría disponer de un instrumento útil para futuros programas de conservación de la diversidad en poblaciones naturales y de corrección de deficiencias en poblaciones cultivadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El *stock* de partida estaba formado por 60 ejemplares sexualmente maduros de lubina (42 machos y 18 hembras) capturados en la costa mediterránea de Murcia (sureste de España) mediante el arte de pesca denominado moruna durante dos periodos: de enero a marzo de 2000 y de noviembre a marzo de 2001. Los peces se marcaron con microchips y actualmente se mantienen en un tanque de 45 m³ en condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo, con una alimentación a base de pienso para reproductores y pescado fresco.

Criopreservación

Durante la segunda quincena de febrero de 2005, una vez completada la espermatogénesis, los machos de lubina fueron anestesiados con aceite de clavo (40 ppm). Después de eliminar la orina, se extrajo el esperma por presión abdominal empleando una jeringa estéril de 5 ml sin aguja, y se mantuvo sobre hielo picado hasta su uso. La concentración de espermatozoides se determinó mediante recuento en cámara Neu-

bauer tras diluir la muestra de esperma en una solución de formólico al 1 % (1:400). La motilidad se valoró mediante observación microscópica ($\times 400$) de una muestra de esperma, previamente diluida en la solución inmovilizante Ringer 200 mOsm (Chereguini *et al.*, 1997) a 1:5, y posteriormente activada con agua de mar (1:20); se asignaron valores de 0 a 5 según la escala de Sánchez-Rodríguez (1975). Además, se determinó la duración de la activación del esperma. La criopreservación del esperma se realizó sobre vapores de nitrógeno líquido en pajuelas de 0,5 ml y criotubos de 2 ml, según el protocolo de Chereguini *et al.* (2003), utilizando como diluyente el medio Mounib (Mounib, 1978); la dilución esperma-diluyente fue 1:1.

Genética

La caracterización de la estructura genética del *stock* natural se llevó a cabo mediante el genotipado de muestras de sangre de todos los individuos usando un conjunto de 10 *loci* microsatélite: D1a11 (AY221749), D1a12 (AY125920), D1a6 (Y13158), D1a16 (AY262073), D1a9 (AY221747), D1a4 (AY221742), D1a119 (AY302259), D1a20 (AY262077), D1a116 (AY302256) y D1a8 (AY221746). Los productos de amplificación de estos *loci* se analizaron en un secuenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems).

Para caracterizar la población se emplearon las siguientes variables genéticas: número de alelos por *locus* (K), heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e respectivamente), contenido de información polimórfico (PIC) y las probabilidades de exclusión 1 y 2 (EXC 1 y EXC 2) (la exclusión 1 es la probabilidad de asignación correcta de un individuo a su pareja parental cuando no se conoce ninguno de los parentales, y la 2 es esa misma probabilidad cuando se conoce uno de los padres) y utilizando el software Cervus v. 2.0 (Marshall *et al.*, 1998). Además, se estudió si este grupo cumplía las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (valores p), así como el posible déficit o exceso de heterocigotos (Fis) utilizando el software Genepop v. 3.3 (Raymond y Rousset, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Criopreservación

Durante la época de obtención de muestras todos los machos estaban fluyentes. El volumen de esperma de cada macho presentó una gran variabilidad (3-10 ml) ($5,5 \pm 2,3$ ml, media \pm d.e.). La tabla I muestra los resultados de motilidad y concentración del esperma por individuos. Los altos valores de motilidad del esperma, superiores a 3 en la mayoría de los individuos, permitieron completar el proceso de criopreservación con la totalidad de los peces. La concentración media del esperma fue $21,83 \pm 5,67 \times 10^9$ spz ml⁻¹ y la duración de la motilidad tras la activación fue 40-50 s. En la figura 1 se muestra la evolución de la motilidad del esperma a corto plazo conservado en Ringer a 4 °C. Los resultados indican que es posible mantener el esperma durante 48 h en estas condiciones, hasta su utilización.

Caracterización genética

Los resultados de la caracterización genética de la población muestran unos niveles de varia-

bilidad genética representados por: un número medio de alelos por *locus* de 16,8, una heterocigosidad media observada y esperada de 0,798 y 0,842 respectivamente y un contenido medio de información polimórfico de 0,816. El valor de exclusión total 1 y 2 es de 0,99981 y 0,999998 respectivamente. Por otro lado, la población se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,001$), mostrando un ligero déficit de heterocigotos para algunos de los *loci*.

Los registros de las variables genéticas se muestran en la tabla II.

Si bien estos resultados parecen indicar que los individuos tomados del medio natural corresponden a una población salvaje, las desviaciones en la proporción de heterocigotos en algunos de los *loci* podría deberse a un posible efecto Walhund o a la influencia de la acuicultura sobre las poblaciones naturales, como se describe en trabajos anteriores (Abdel *et al.*, 2004).

De forma adicional, la disponibilidad del marcaje individual mediante el genotipado de 10 *loci*, va a permitir su identificación genética con alta probabilidad. Esta identificación se va a poder utilizar en distintas aplicaciones de segui-

Tabla I. Motilidad y densidad (n.º de espermatozoides $\times 10^9$)/ml del esperma criopreservado, por individuos, del *stock* de lubina mediterránea.

Código	Motilidad	Densidad	Código	Motilidad	Densidad
24906	4	12,8	2A31	5	33,2
760C	3	14,2	5517	5	21,4
6750	5	14,4	4969	5	23,3
6E56	4	23,1	F57	4	20,0
5C5A	3	10,6	5540	5	22,5
33E	4	11,8	866	4	22,0
2F29	5	20,3	554A	5	25,4
464B	3	18,3	9936	5	24,7
497A	5	33,3	0650	4	–
4508	5	34,7	3E4B	4	–
6D25	5	17,9	020B	3	–
7528	5	17,5	016C	5	–
3272	5	24,4	385D	4	–
729	5	21,6	2936	4	–
2C46	5	18,5	1046	4	22,7
3D3D	5	22,3	6747	5	25,2
7360	5	21,3	747E	4	19,0
3C7C	5	22,7	2C70	5	26,3
1950	4	20,6	6364	5	21,9
386B	5	21,9	6536	5	22,6
162A	4	33,6	2D32	5	20,1

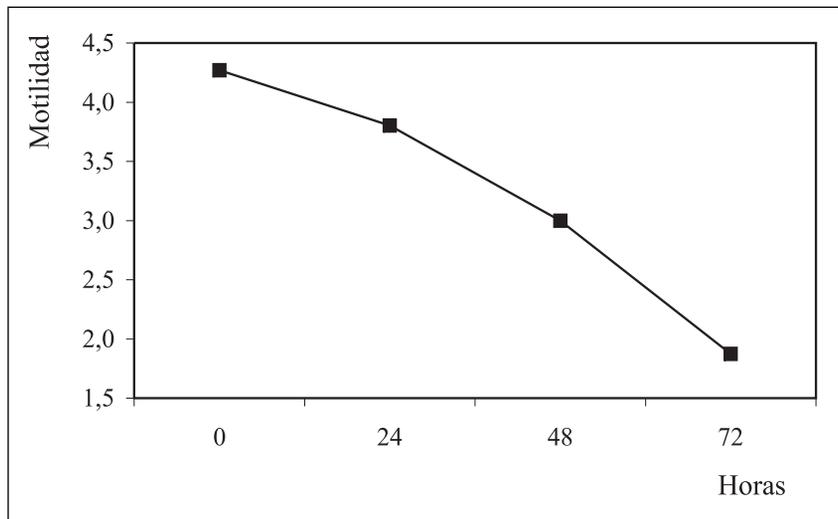


Figura 1. Conservación a corto plazo de esperma de lubina en Ringer 200 mOsm.

Tabla II. Registros de las variables genéticas poblacionales del *stock* de lubina mediterránea. (K): número de alelos por *locus*; (Ho): heterocigosidad observada; (He): heterocigosidad esperada; (HW(p-val)): valores para las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg; (Fis): indicador de déficit o exceso de heterocigotos; (PIC): contenido de información polimórfico; (EXC 1): probabilidad de exclusión 1; (EXC 2): probabilidad de exclusión 2. (*): existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre la heterocigosidad observada y la esperada para cada uno de los *loci*.

Locus	N.º acceso	K	Ho	He	HW(p-val)	Fis	PIC	EXC 1	EXC 2
Dla11	AY221749	19	0,814	0,926	0,0236	0,122*	0,913	0,717	0,835
Dla12B	AY12592	17	0,881	0,91	0,5498	0,032	0,895	0,673	0,805
Dla6	Y13158	9	0,579	0,685	0,3662	0,155	0,625	0,265	0,431
Dla16	AY262073	20	0,864	0,866	0,0551	0,002	0,844	0,567	0,724
Dla9	AY221747	17	0,915	0,915	0,624	0	0,9	0,685	0,813
Dla4	AY221742	11	0,797	0,827	0,2894	0,037	0,8	0,485	0,657
Dla119	AY302259	19	0,847	0,859	0,008	0,014	0,839	0,559	0,719
Dla20	AY262077	11	0,759	0,764	0,3372	0,008	0,737	0,396	0,581
Dla116	AY302256	6	0,583	0,719	0,0087	0,19*	0,667	0,299	0,473
Dla8	AY221746	39	0,948	0,95	0,1884	0,002	0,939	0,798	0,887

miento del esperma o de trazabilidad de la descendencia que se genere con el banco de esperma desarrollado.

AGRADECIMIENTOS

El proyecto RZ03-022 en el que se enmarca este trabajo ha sido financiado por el Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias, del Plan Nacional I+D+i del MCYT.

BIBLIOGRAFÍA

Abdel, I., G. Catanese, M. Manchado y A. García Alcázar. 2004. Genetic study of wild sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caught in the Mediterranean Sea.

European Aquaculture Society. Special Public. 34: 89-90.

Chereguini, O., R. Cal, C. Dreanno, B. Ogier de Baulny, M. Suquet y G. Maise. 1997. Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources* 10: 251-255.

Chereguini, O., I. García de la Banda, M. Herrera, C. Martínez y M. de la Hera. 2003. Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. *Aquaculture Research* 34 (9): 739-747.

Marshall, T. C., J. Slate, L. Kruuk y J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7 (5): 639-655.

Mounib, M. S. 1978. Cryogenic preservation of fish and

- mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 53: 13-18.
- Raymond, M. y F. Rousset, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Sánchez-Rodríguez, M. 1975. *Contribution à l'étude de l'insemination artificielle de la truite (Salmo gairdneri): les possibilités de manipulation des gamètes et de conservation du sperme*. DEA Physiology et Reproduction, Université Paris VI. Paris.