

Pagurta, híbrido interespecífico de pargo *Pagrus pagrus* (L., 1758) (♀) × hurta *Pagrus auriga* Valenciennes, 1843 (♂): caracterización fenotípica y molecular

M. Manchado¹, M. Ponce¹, E. Asensio¹, C. Infante¹, R. de la Herrán²,
F. Robles², M. A. Garrido-Ramos², M. Ruiz Rejón² y S. Cárdenas¹

¹ IFAPA (Instituto de Formación Agraria y Pesquera de Andalucía) Centro El Toruño. Junta de Andalucía. Apdo. 16. E-11500 El Puerto de Santa María (Cádiz), España. Correo electrónico: manuel.manchado.ext@juntadeandalucia.es

² Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Avenida de Fuentenueva, s/n. Universidad de Granada. E-18071 Granada, España.

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

RESUMEN

Los híbridos suscitan gran interés en la acuicultura. Sin embargo, su aplicación industrial en espáridos ha estado limitada por las dificultades técnicas que ocasiona su desarrollo. En este trabajo se describe el nacimiento no inducido, o espontáneo, de híbridos entre pargo *Pagrus pagrus* (L., 1758) y hurta *Pagrus auriga* Valenciennes, 1843 cuando dichas especies coexisten en un mismo tanque. Estos híbridos surgieron durante los meses de marzo y abril de 2004, cuando se registraron las puestas más abundantes de ambas especies. Fenotípicamente, presentaron características propias de ambas especies parentales. La aplicación de marcadores mitocondriales y nucleares (microsatélite y satélite) permitieron confirmar que eran híbridos intergenéricos de *P. pagrus* (♀) × *P. auriga* (♂) a los que se denominó pagurta. El cruce recíproco no se detectó.

Palabras clave: Acuicultura, ADN mitocondrial, microsatélite, satélite *EcoRI*, puesta natural.

ABSTRACT

Pagurta: An interspecific hybrid of common seabream *Pagrus pagrus* (L., 1758) female and banded seabream males *Pagrus auriga* Valenciennes, 1843 male: phenotypic and molecular characterization

Hybrids are of great interest in aquaculture. In the present study, we report for the first time an interspecific hybrid between common seabream *Pagrus pagrus* (L., 1758) females and red banded seabream *Pagrus auriga* (Valenciennes, 1843) males, which has been named the pagurta. This hybrid was detected in natural spawns during the period from March to April 2004. Phenotypically, the hybrid possessed morphological and meristic characteristics of both parental species. Mitochondrial and nuclear (microsatellite and satellite) molecular markers were used to confirm they were hybrids. The reciprocal cross was not detected.

Keywords: Aquaculture, mitochondrial DNA, microsatellite, satellite *EcoRI*, natural spawnings.

INTRODUCCIÓN

La hibridación de distintas especies de peces es una herramienta habitual para la mejora de las capacidades productivas en acuicultura. Su objetivo es la búsqueda de caracteres hereditarios de interés basada en la realización de cruces intra o interespecíficos. De esta forma se consigue aumentar la tasa de crecimiento, la transferencia de características de interés entre especies, combinar características de dos especies en un mismo grupo de peces, reducir la reproducción indeseada a través de peces estériles, obtener descendencia de un mismo sexo o aumentar la resistencia al medio (revisado en Bartley, Rana e Immink, 2001).

Los espáridos comprenden un amplio grupo de aproximadamente 100 especies que viven en aguas cercanas a la costa en zonas templadas y tropicales. Veinticuatro especies se han descrito en el Atlántico noroeste y las costas mediterráneas (Bauchot y Hureau, 1986). Aunque muchas de estas especies despiertan un gran interés en pesquerías a escala reducida o semiindustrial, hay que destacar el papel relevante de algunas de estas especies en acuicultura, como la dorada *Sparus aurata* Linnaeus, 1758, y de forma secundaria otras, como el pargo *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758), la hurta *Pagrus auriga* (Valenciennes, 1843), el sargo picudo *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777), el dentón *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758) o el sargo común *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758).

La hurta *P. auriga* y el pargo *P. pagrus* son espáridos marinos muy apreciados comercialmente en Andalucía. Su distribución geográfica abarca el mar Mediterráneo (ausente en el mar Negro) y el océano Atlántico, desde Portugal hasta Angola (Bauchot y Hureau, 1986). Ambas especies son hermafroditas proteroginas, aunque la inversión sexual es más temprana en el pargo (Cárdenas y Calvo, 2003). La hurta presenta buenas tasas de crecimiento en cautividad (Padilla, Sánchez-Lamadrid y Cárdenas, observación no publicada), mientras que el pargo muestra un crecimiento adecuado durante periodos de frío (citado en Paspatis *et al.*, 1999). El cruce de estas dos especies sería interesante para combinar sus tasas de crecimiento y mejorar la producción, así como para amortiguar, en caso de

que se demuestre su esterilidad, el impacto que las fugas durante el cultivo en jaulas puedan tener sobre las poblaciones naturales.

La adaptación a la cautividad de distintas especies de espáridos ha posibilitado el desarrollo de híbridos intergenéricos, como *S. aurata* × *P. pagrus* (Temiminc y Schlegel, 1843) (Paspatis *et al.*, 1999), *S. aurata* × *Pagrus major* (Gorshkov *et al.*, 1998), *S. aurata* × *D. puntazzo* (Dujaković y Glamuzina, 1990), *S. aurata* × *Diplodus vulgaris* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1817) (Dujaković y Glamuzina, 1990), *D. sargus* × *D. dentex* (Dujaković y Glamuzina, 1993), *S. aurata* × *Acanthopagrus bifasciatus* (Forsskål, 1775) (Gorshkova *et al.*, 1998), *D. dentex* × *P. pagrus* (Kraljević y Dulčić, 1999), *P. major* × *D. dentex* (Kraljević y Dulčić, 1999) y *Acanthopagrus latus* (Houttuyn, 1782) × *Sparidentex hasta* Munro, 1948 (Bartley, Rana e Immink, 2001). Sin embargo, la aplicación de estos híbridos a la acuicultura está limitada por la escasa eficiencia de los tratamientos hormonales y fecundaciones in vitro o la ausencia de caracteres de interés productivo (Gorshkov *et al.*, 2002).

En este estudio se describe por primera vez el nacimiento espontáneo de híbridos entre *P. pagrus* y *P. auriga*, denominados pagurta, al mantener en cautividad ambas especies parentales conjuntamente. Estos híbridos se han caracterizado desde un punto de vista fenotípico. Además, la aplicación de marcadores moleculares mitocondriales y nucleares ha permitido verificar dicha condición.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estabulación de hurta y pargo

Se estabularon 121 ejemplares de hurta y 27 de pargo durante 2003 en un tanque de forma rectangular de 250 m³ de volumen. Estos animales se sometieron a un régimen de circulación de agua en circuito cerrado (90 % del volumen del mismo). De forma sistemática se procedió a la evaluación de la calidad del agua con una turbidez de 0,65 ± 0,74 ntu, un régimen de temperaturas entre 14,5 y 25,3 °C y niveles aceptables de oxígeno disuelto, salinidad, pH, amonio y nitrito. No se detectaron enfermedades relevantes.

Marcadores moleculares

Procesado de las muestras y extracción de ADN

Una porción de músculo de dos individuos de *P. pagrus* y *P. auriga*, así como de dos de los híbridos (referidos como híbridos 1 y 2), fue cortada e inmediatamente conservada a -80°C . El ADN genómico total fue aislado de 150 mg de tejido usando FastDNA kit (Bio 101 Inc.). Todo el procedimiento de extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante.

Marcadores moleculares mitocondriales

Se analizó un fragmento de 380 pb del ARN ribosómico (ARNr) 16S en *P. pagrus*, *P. auriga* y los híbridos 1 y 2. Para ello, los cebadores se situaron en áreas conservadas de dicho gen.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μl , que contenían 16,75 μl de agua destilada esterilizada, 2,5 μl de dNTP (10 mM), 1 μl de MgCl_2 (2 mM), 2,5 μl de tampón 10X (Ecogen), 0,5 μl de cada cebador, directo $-\text{CCTCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTC}-$ e inverso $-\text{TAATAGCGGCTGCACCATTAGGATGTCCTG}-$ (0,2 μM), 1 μl de ADN de músculo y 0,25 μl de *EcoTaq* polimerasa (Ecogen). Las condiciones de reacción fueron 94°C , 2 min, 30 ciclos de 30 s a 94°C , 15 s a 60°C y 30 s a 72°C .

Los productos amplificados se cargaron en un gel de agarosa al 2 % y se visualizaron mediante luz ultravioleta. Posteriormente se purificaron con el kit Concert™ Rapid PCR Purification System (Marligen Biosciences). La secuenciación se realizó utilizando didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (BigDye v. 3.1, Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron con el programa Seqman (DNASTar Inc.).

Marcadores moleculares nucleares

Como marcadores nucleares se utilizaron el microsatélite PauGTTAH4 y ADN satélite. El locus PauGTTAH4, específico de hurta (Ponce *et al.*, observación no publicada), se analizó mediante PCR en un volumen final de 10 μl , conteniendo 6,1 μl de agua destilada esterilizada, 1 μl de dNTP

(10 mM), 0,4 μl de MgCl_2 (2 mM), 1 μl de tampón 10X (Ecogen), 0,2 μl de cada cebador, directo $-\text{CAGGACACCCTCAGAGGTCTGAAGTCCAT}-$ e inverso $-\text{TTATGAGATCAAAGACAAATTTCCACATTG}-$ (10 μM), 1 μl de ADN de músculo y 0,1 μl de *EcoTaq* polimerasa (Ecogen). El cebador reverso se marcó con fluorescencia (6-FAM™). Las condiciones de reacción fueron 94°C , 2 min, 35 ciclos de 30 s a 94°C , 15 s a 60°C y 45 s a 72°C . Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 4,25 % en un secuenciador automático Abiprism 377. Los tamaños obtenidos fueron determinados con el programa GeneScan v. 3.1.2 (Applied Biosystems). Finalmente, la familia de ADN satélite *EcoRI*, que ha demostrado su utilidad para diferenciar las distintas especies de espáridos, se analizó siguiendo el protocolo previamente descrito por Garrido-Ramos *et al.* (1999).

El análisis filogenético se realizó con el programa PAUPv4beta10 software (Swofford, 2003). Para darle robustez al análisis, se incluyeron secuencias disponibles en nuestro laboratorio para las especies *S. aurata* y *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768).

RESULTADOS

Reproducción

Se mantuvieron en cautividad distinto número de reproductores de pargo y hurta en un mismo tanque en las instalaciones del CIFPA El Toruño. La hurta presentó su periodo de puesta desde septiembre de 2003 hasta abril de 2004, con un número de descendencia viable creciente hasta alcanzar los 2 072 individuos en abril. En cambio, las puestas de pargo sólo se observaron de enero a abril de 2004, alcanzando el mayor número de descendientes en las puestas de marzo-abril (1 249 individuos).

Los híbridos sólo se detectaron en las puestas más abundantes de ambas especies, durante los meses de marzo-abril. Dada la similitud fenotípica con *P. pagrus*, los híbridos se incubaron con las puestas correspondientes a dicha especie. Sólo se pudieron diferenciar en fase juvenil, estimándose la cantidad total de híbridos fenotípicamente en, aproximadamente, un 5 % de la producción de *P. pagrus* para este periodo.

Descripción fenotípica del híbrido

Para la caracterización fenotípica se utilizaron 13 híbridos atendiendo a caracteres morfológicos. Todos ellos presentaron (tabla I): aleta dorsal con 12 radios duros y 11-12 blandos; aleta anal con 3 duros y 8-9 blandos; 46 escamas en la línea lateral; cuerpo oval, alto y comprimido; coloración gris oscura; mancha oscura desde la frente hasta la comisura de la boca, pasando por el ojo; borde del opérculo negro; escamas presentes en el preopérculo; franja oscura desde la nuca a la boca, pasando por el ojo; cuatro bandas oscuras en el cuerpo, siendo la primera el doble de ancha que las demás, y estrechas la segunda y la cuarta. La tercera fue ancha pero menor que la primera.

Las aletas pectorales fueron de color claro y las pelvianas oscuras, pero más en su parte distal. La aleta anal fue negra en la parte anterior y clara en la posterior. La aleta caudal fue clara, con dos pequeñísimos lóbulos blancos en las puntas. El cuerpo fue oblongo, no muy pronunciado, más bajo que largo, y con una zona oscura en la axila de la aleta pectoral.

Caracterización molecular de los híbridos

Análisis de marcadores moleculares mitocondriales

Para investigar la especie que actuó como madre en la formación del híbrido se analizó un fragmento del gen mitocondrial ARNr 16S. Para ello se amplificó un fragmento de 380 pb en dos individuos identificados previamente como *P. pagrus*, *P. auriga*, así como dos híbridos diferentes (referidos como híbridos 1 y 2).

El análisis de las secuencias detectó la existencia de 17 sitios polimórficos interespecíficos entre *P. pagrus* y *P. auriga*. Ambos híbridos difirieron en la posición 87, indicando la existencia de, al menos, dos líneas maternas diferentes en la formación de los híbridos. El análisis filogenético (figura 1) permitió diferenciar claramente ambas especies parentales (100 % *bootstrap*). Los híbridos, en ambos casos, se agruparon junto a *P. pagrus*. Dado que el ADN mitocondrial tiene una herencia materna, al menos dos madres de la especie *P. pagrus* participaron

en las puestas que dieron lugar a los híbridos pagurta.

Análisis de marcadores moleculares nucleares

Para confirmar que ambos individuos eran híbridos, se utilizó el marcador microsatélite PauGTTAH4. Experimentos previos de amplificación cruzada en 11 especies diferentes de espáridos indicaban que dicho microsatélite amplificaba específicamente en *P. auriga* y no en *P. pagrus* (Ponce *et al.*, observación no publicada). Además, su rango alélico osciló entre 120-150 pb, con un número total de 7 alelos diferentes al genotipar 22 reproductores (Ponce *et al.*, en evaluación). Al genotipar los híbridos se detectó, en todos los casos, la existencia de un único alelo de 127 pb, indicando la presencia de secuencias nucleares de *P. auriga*. Los controles mostraron dos alelos claramente diferenciados (127 y 131 pb) en *P. auriga* mientras que la amplificación fue negativa para *P. pagrus*. Para el ADN satélite *EcoRI*, se observaron resultados similares, con la presencia simultánea de unidades repetidas específicas de hurta y pargo en los híbridos (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Este trabajo describe, por primera vez, el híbrido entre pargo y hurta, al que se ha denominado pagurta. Desde un punto de vista filogenético, ambas especies pertenecen al mismo género y están cercanas evolutivamente, según se deduce de los datos moleculares (Reina *et al.*, 1994; Garrido-Ramos *et al.*, 1995; Hanel y Sturmbauer, 2000). Son numerosos los híbridos descritos entre especies de espáridos, incluso entre especies filogenéticamente más distantes de distintos géneros tales como *Sparus* y *Pagrus*. En todos estos casos, se ha podido constatar la existencia de un mismo número de cromosomas ($2n = 48$), aunque diferentes en su morfología (Vitturi *et al.*, 1992; Gorshkov *et al.*, 1998).

Fenotípicamente, pagurta posee un número de radios en la aleta dorsal coincidente con *P. pagrus* (tabla I), mientras que en la aleta anal es similar a *P. auriga*. Además, el híbrido presenta

Tabla I. Características fenotípicas del pargo *P. pagrus*, la hurta *P. auriga* y los híbridos considerados.

	Pargo	Hurta	Híbridos
Aleta dorsal	XI-XIII + 9-10	XI + 10-12 Primeros 2 radios más cortos	XI-XII + 11-12
Aleta anal	III + 7-8	III + 8-9	III-IV + 8-9
Cuerpo	Oval y comprimido moderadamente alto	Oval y comprimido alto	Oval y comprimido, altura intermedia
Preopérculo	Escamas visibles	Escamas apenas visibles	Escamas visibles
Coloración	Rosa plateado	Rosa plateado	Gris oscura
Bandeado	No posee bandas	4 bandas anchas y estrechas transversales rojo oscuro	4 bandas anchas y estrechas transversales gris oscuro pero difusas
Coloración cabeza	Parte frontal oscura	Banda roja oscura desde la frente hasta la comisura de la boca	Banda gris oscura desde la frente hasta la comisura de la boca
Coloración aleta caudal	Rosa con dos lóbulos blancos	Rosa anaranjado	Gris con dos lóbulos blancos pequeños

dos pequeñísimos lóbulos blancos en las puntas de la aleta caudal, característica típica de *P. pagrus*, aunque de mayor tamaño, y el bandeo típico de *P. auriga*, aunque menos acentuado.

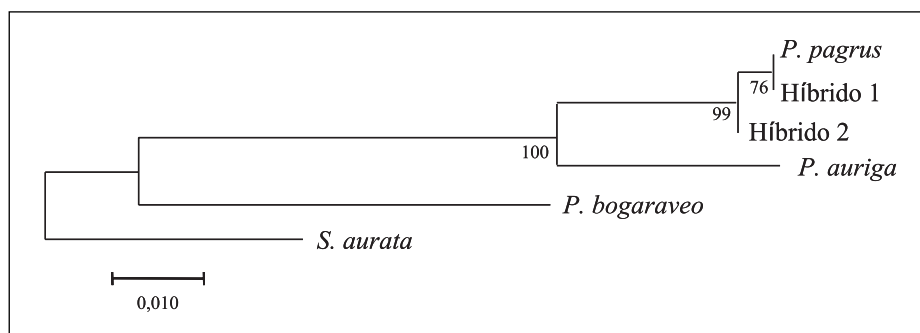
Nuestros datos indican la existencia de híbridos de pargo hembra con hurta macho. En concreto, se han observado dos líneas maternas mitocondriales de pargo, sugiriendo que, por lo menos, dos hembras de esta especie han participado en las puestas que dieron lugar a los híbridos. Por otro lado, el microsatélite y satélite *EcoRI* han permitido verificar cómo estos híbridos portan secuencias específicas de hurta y pargo simultáneamente, demostrando su utilidad para la identificación de los híbridos.

El híbrido *P. auriga* × *P. pagrus* no se ha detectado en ningún caso. Dado que los híbridos pagurta se han detectado en fase de desarrollo juvenil, no se puede excluir la hipótesis de que el híbrido *P. auriga* × *P. pagrus* también ocurri-

se y las larvas no fuesen viables. Otros híbridos como los de *S. aurata* × *P. pagrus* (Paspatis *et al.*, 1999), *S. aurata* × *D. puntazzo* (Dujaković y Glamuzina, 1990), *S. aurata* × *D. vulgaris* (Dujaković y Glamuzina, 1990) han mostrado una alta mortalidad larvaria al inicio de la alimentación externa, mientras que los híbridos de *S. aurata* y *A. bifasciatus* morían en el día trigésimo (Gorskova *et al.*, 1998). Además, se ha observado que los híbridos *P. pagrus* × *S. aurata* morían tras la reabsorción del vitelo, a diferencia de los híbridos del cruce recíproco (Paspatis *et al.*, 1999).

Finalmente, es necesario destacar que todos los trabajos en los que se describen híbridos de la familia Sparidae recurrieron a fertilización artificial a partir de gametos extraídos manualmente. Por ello, pagurta se podría considerar la primera descripción de un híbrido entre espáridos obtenido por nacimiento espontáneo al

Figura 1. Arbol filogenético de *P. pagrus*, *P. auriga* y los híbridos 1 y 2, según el gen mitocondrial ARNr 16S. Se han incluido las especies *Pagellus bogaraveo* y *Sparus aurata* como grupos externos. Se indican los valores de bootstrap.



mantener conjuntamente ambas especies parentales. La importancia de este hecho radica en la dificultad de obtener un número adecuado de híbridos, por la calidad deficiente de las puestas tras la estimulación hormonal, así como por la incierta supervivencia, especialmente durante los primeros estadios del desarrollo (Kraljević y Dulčić, 1999; Paspatis *et al.*, 1999). Estas limitaciones han obstaculizado su aplicación práctica en términos de coste-beneficio y también la producción de un número importante, a nivel comercial, de híbridos basados en una metodología de fertilización artificial. Sin embargo, el nacimiento espontáneo del híbrido pagurta indica que un proceso adecuado, mediante la creación de lotes de reproductores de ambas especies durante el periodo de solapamiento de puesta, permitiría obtener larvas de forma económica y rápida.

AGRADECIMIENTOS

A los evaluadores por sus comentarios para mejorar la comprensión y contenido de este artículo. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos Jacumar (Promoción del cultivo de espáridos) y Redaqua (Interreg III-B).

BIBLIOGRAFÍA

- Bartley, D. M., K. Rana y A. J. Immink. 2001. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 325-337.
- Bauchot, M. L. y J. C. Hureau. 1986. Sparidae. En: *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. P. J. P. Whitehead, M. L. Bauchot, J. C. Hureau, J. Nielsen y E. Tortonese (eds.): 883-907. Unesco. París.
- Cárdenas, S. y A. Calvo. 2003. Reproducción en el mar y en cautividad del pargo común o bocinero, *Pagrus pagrus* (Pisces: Sparidae). En: *I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*. <http://www.civa2003.org>
- Dujaković, J. J. y B. Glamuzina. 1990. Intergeneric hybridization in Sparidae. I. *Sparus aurata* female × *Diplodus puntazzo* male and *Sparus aurata* female × *Diplodus vulgaris* male. *Aquaculture* 86: 369-378.
- Dujaković, J. J. y B. Glamuzina. 1993. Intergeneric Hybridization in Sparidae: 2. *Diplodus sargus* ♀ × *Dentex dentex* ♂. *Journal of Applied Aquaculture* 2: 105-114.
- Garrido-Ramos, M. A., M. Jamilena, R. Lozano, S. Cárdenas, C. Ruiz Rejón y M. Ruiz Rejón. 1995. Phylogenetic relationships of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) inferred from satellite-DNA. *Hereditas* 122: 1-6.
- Garrido-Ramos, M. A., R. de la Herrán, M. Jamilena, R. Lozano, C. Ruiz Rejón y M. Ruiz Rejón. 1999. Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 200-204.
- Gorshkov, S., G. Gorshkova, A. Hadani, H. Gordin y W. Knibb. 1998. Chromosome set manipulations and hybridization experiments in gilthead seabream (*Sparus aurata*). I. Induced gynogenesis and intergeneric hybridization using males of the red seabream (*Pagrus major*). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgheh* 50: 99-110.
- Gorshkov, S., G. Gorshkova, A. Hadani, H. Gordin y W. Knibb. 2002. Chromosome set manipulations and hybridization experiments in gilthead seabream (*Sparus aurata*). II. Assessment of diploid and triploid hybrids between gilthead seabream and red seabream (*Pagrus major*). *J. Appl. Ichthyol.* 18: 106-112.
- Gorshkova, G., S. Gorshkov, H. Gordin y W. Knibb. 1998. Chromosome set manipulation and interspecific hybridization in marine fish (Sparidae, Serranidae). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgheh* 50: 210-211.
- Hanel, R. y C. Sturmbauer. 2000. Multiple recurrent evolution of trophic types in Northeastern Atlantic and Mediterranean seabreams (Sparidae, Percoidae). *J. Mol. Evol.* 50: 276-283.
- Kraljević, M. y J. Dulčić. 1999. Intergeneric hybridization in Sparidae (Pisces: Teleostei): *Dentex dentex* female × *Pagrus pagrus* male and *P. major* female × *D. dentex* male. *J. Appl. Ichthyol.* 15: 171-175.
- Paspatis, M., G. Markakis, G. Koumoundouros y M. Kentouri, 1999. Preliminary results on rearing of *Sparus aurata* × *Pagrus pagrus* hybrids. Performance comparison with the parental species. *Aquaculture International* 7: 295-306.
- Reina, J., G. Martínez, A. Amores, y M. C. Álvarez, 1994. Interspecific genetic differentiation in western Mediterranean sparid fish. *Aquaculture International* 12: 47-57.
- Swofford, D. L. 2003. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)*. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, EE UU. [CD-Rom].
- Vitturi, R., E. Mazzola, E. Catalano y M. Lo Conte. 1992. Karyotype characterization of four Mediterranean sparid fish (Pisces, Perciformes) using conventional and banding techniques. *Kytobios* 72: 107-115.