

Identificación de RFLP en genes relacionados con el crecimiento en dorada *Sparus aurata* L., 1758

I. Sánchez-Ramos, M. Barrios, I. Cross y L. Rebordinos

Laboratorio de Genética. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Universidad de Cádiz. Polígono Río San Pedro, s/n. E-11510 Puerto Real (Cádiz), España. Correo electrónico: laureana.rebordinos@uca.es

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

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar el polimorfismo de los genes de la hormona de crecimiento (GH) y de la prolactina (PRL) en dorada *Sparus aurata* L., 1758 y buscar su posible asociación con los caracteres cuantitativos peso y talla. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron en total 279 individuos (131 reproductores y 148 descendientes). Una vez analizados los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) de los intrones en ambos genes, se ha encontrado una posible asociación entre el intrón I de la GH y los citados caracteres cuantitativos estudiados.

Palabras clave: PCR-RFLP, hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL), polimorfismo, crecimiento, acuicultura, mejoramiento por selección.

ABSTRACT

Identification of RFLP in growth-related genes in the gilthead seabream Sparus aurata L., 1758

The main objective of the present study was to analyse polymorphism of the growth hormone (GH) gene and of the prolactin (PRL) gene in the gilthead seabream Sparus aurata L., 1758, and to examine its possible association with quantitative characters, such as weight and size. In order to carry out this study, we used a total of 279 individuals (131 breeders and 148 offspring). Once the Restriction Fragment Length Polymorphisms of PCR products (PCR-RFLP) at the introns of both genes were analysed, we found a possible association between intron I of the GH and the quantitative characters studied.

Keywords: PCR-RFLP, growth hormone (GH), prolactin (PRL), polymorphism, growth, aquaculture, breeding selection.

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos primordiales en acuicultura es el aumento de la producción, aunque hasta el momento se haya centrado más en las mejoras de reproducción, patología y alimentación. En la actualidad, un campo que está adquiriendo mucha importancia para la introducción de avances en los cultivos son los programas de mejora en genética.

Gracias a la genética se han conseguido progresos espectaculares en la producción ganadera (Wiener, 1994). Sin embargo, la acuicultura, al ser una actividad mucho más reciente, ha tenido pocas oportunidades para beneficiarse de esta tecnología, pudiéndose encontrar ejemplos en salmónidos (Embrey y Hyford, 1925; Donaldson y Olson, 1955), ciprínidos (Hinitz y Moav, 1999) y otras especies de peces, como la tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (L., 1758) (Eknath *et al.*, 1998).

En un posible programa de mejora de dorada *Sparus aurata* L., 1758, uno de los caracteres que, sin duda, tendría una mayor relevancia económica en su cultivo sería el crecimiento. Aunque la totalidad de genes que afectan a este carácter poligénico se desconocen, sí se ha definido una serie de genes candidatos, como el gen de la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la somatolactina (SL), el factor de crecimiento de la insulina (IGF) y la miostatina (MSTN), por estar sus productos implicados en procesos fisiológicos y bioquímicos relacionados con el crecimiento.

Por esta razón, en este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de dos de estos genes: el de la GH y la PRL, con el objetivo de buscar marcadores moleculares del tipo RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), que podrían asociarse con la variación en el crecimiento de esta especie, y poder contribuir al diseño de programas de selección asistida por marcadores (MAS) para este carácter en una población cultivada.

La principal función de la GH en vertebrados es regular el crecimiento somático a través de la hipertrofia y (o) la hiperplasia celular. En los teleósteos desempeña, además, otras muchas funciones, como la osmorregulación (Bolton *et al.*, 1987; Mancera y McCormick, 1998), el control de la esmoltificación (Björnsson *et al.*, 2000) y la síntesis de proteínas anticongelantes (Idler *et al.*, 1989).

En el caso de la PRL, las funciones biológicas que esta hormona lleva a cabo, tanto en peces como en vertebrados, son muchas y variadas, participando en la osmorregulación, la reproducción, el comportamiento y la producción de mucus (Clarke y Bern, 1980). En los teleósteos, la función osmorreguladora es la de mayor importancia, ya que permite la supervivencia de muchas de sus especies de agua dulce o salobre al participar en el mantenimiento del balance hidromineral, disminuyendo la absorción de agua e incrementando la retención de iones (Hirano *et al.*, 1986).

El gen de la GH en la dorada tiene un tamaño aproximado de 4,3 kb y está formado por seis exones y cinco intrones (Almuly *et al.*, 2000), estructura similar a la de otros teleósteos, como el pez gato *Ictalurus punctatus* (Rafines-

que, 1818) (Tang *et al.*, 1993) y distintas especies de carpas (Chiou, Chen y Chang, 1990; Ho, Wong y Chan, 1991), pero diferenciándose de la que se encuentra en mamíferos (Chen *et al.*, 1989), aves (Tanaka *et al.*, 1992) y otros peces (Chiou, Chen y Chang, 1990; Tang *et al.*, 1993), que presentan cinco exones y cuatro intrones. El segundo gen en estudio, el de la PRL, posee un tamaño menor, 3,5 kb, y está organizado en cinco exones y cuatro intrones (Astola *et al.*, 2003), estructura similar a la de otros peces, como la carpa *Ciprinus carpio* L., 1758 (Chen, Chiou y Chang, 1991) y el salmón del Pacífico *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum, 1792) (Xiong, Chin y Hew, 1992).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se muestrearon en total 131 individuos reproductores, 48 machos y 83 hembras, con un peso medio de $2\,433,51 \pm 51,08$ g y una talla media de $54,07 \pm 0,36$ cm. El cultivo en las instalaciones disponibles, tanto de los individuos reproductores como de su descendencia, fue realizado en condiciones de temperatura ambiente.

La descendencia (F1) de los reproductores muestreados fue clasificada en estadios tempranos de su desarrollo, cuando alcanzaron unos pesos medios aproximados de 0,5-1,0 g (1.ª clasificación), 3,0 g (2.ª clasificación) y 10-20 g (3.ª clasificación). Tras la clasificación inicial, a los 44 días tras la eclosión, se muestrearon 76 individuos de la 2.ª clasificación con un peso medio de $4,78 \pm 0,41$ g y una talla media de $6,67 \pm 0,18$ cm. Y a los 201 días se muestrearon 72 individuos de la 3.ª clasificación con peso medio $7,58 \pm 0,36$ g y talla media $7,80 \pm 0,14$ cm.

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de sangre (Martínez *et al.*, 1998). La amplificación de los intrones I y III del gen de la GH se llevó a cabo con los cebadores (*primers*) descritos por Almuly *et al.* (2000). Para la amplificación del resto de las secuencias se diseñaron parejas de cebadores utilizando el programa informático Primer 3 (Rozen y Skaltsky, 2000). La localización y secuencia de los cebadores utilizados se muestran en la figura 1 y la tabla I.

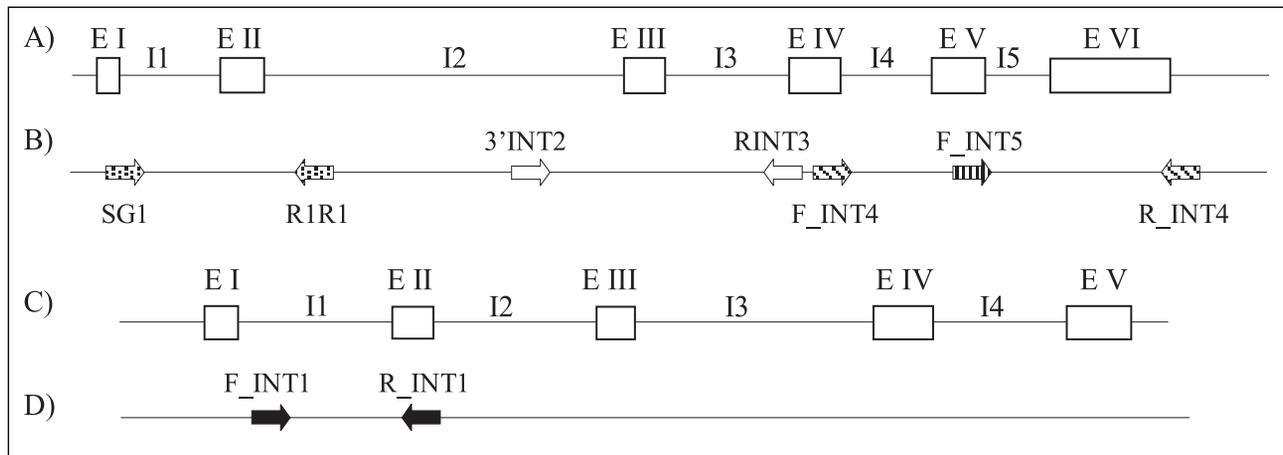


Figura 1: Estructura de los genes en estudio y esquema de unión de los *primers* para el gen de la hormona de crecimiento (A,B) y la prolactina (C,D).

Las reacciones de PCR y las digestiones con las enzimas de restricción se llevaron a cabo según Sánchez-Ramos, Cross y Rebordinos (2004). Los diferentes productos de PCR y los fragmentos de la digestión se visualizaron en geles de agarosa con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), utilizando un marcador de peso molecular para determinar el tamaño.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la amplificación de la secuencia del intrón I de la GH se determinó que el rango de

tamaño estaba comprendido entre 1,1 kb y 1,9 kb, encontrándose en total 16 alelos distintos, pudiendo describir 21 genotipos diferentes. Tal como se aprecia en la figura 2, la distribución de genotipos para los tres grupos analizados (reproductores y descendientes de las clasificaciones 2.^a y 3.^a) es similar: los genotipos más abundantes en los reproductores (DD, EE, FF y BB) también lo son en los descendientes. Sin embargo, si se observa el número de individuos homocigotos y heterocigotos, hay que destacar la casi inexistencia de heterocigotos para el grupo de descendientes de la 2.^a clasificación y el alto número de individuos hetero-

Tabla I. Secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación de los distintos fragmentos objetivo del estudio.

Secuencia	Cebadores empleados		
	Nombre	Secuencia	Autores
Intrón I GH	SG1	5'-AGAACCTGAACCAGACATGG-3'	Almuly <i>et al.</i> , 2000
	R1R1	5'-CTGCTGCCAGAGAATTACTG-3'	
Intrón III GH	3'INT2	5'-AGTGGACCATAACTCTCTGC-3'	Almuly <i>et al.</i> , 2000
	RINT3	5'-ACAGCAGCTTCAACACCTAG-3'	
Intrón IV GH	F_INT4	5'-GTTCTCTGTCTGGCGTTCT-3'	Sánchez-Ramos, Cross y Rebordinos, 2004
	R_INT4	5'-AGCAACTGGGTCTAATGAATGT-3'	
Intrón V GH	F_INT5	5'-CGCTGAGACGAACCTACGA-3'	Sánchez-Ramos, Cross y Rebordinos, 2004
	R_INT4	5'-AGCAACTGGGTCTAATGAATGT-3'	
Intrón I PRL	F_INT1	5'-GACTTTAACATGACCTGGAGGA-3'	Sánchez-Ramos, Cross y Rebordinos, 2004
	R_INT1	5'-TGGTTTCTCTGTGAGCCATCT-3'	



Figura 2: Distribución de genotipos según PCR del intrón I de la GH para los tres grupos de individuos.

cigotos para los descendientes de la 3.^a clasificación.

La digestión de estos productos con la enzima *Hae*III originó 25 patrones diferentes, y su distribución en los tres grupos de individuos fue similar. En el caso de las digestiones con *Hap*II se encontraron 26 patrones en los grupos de individuos estudiados, también de distribución similar (datos no mostrados).

El tipo de polimorfismo encontrado en los patrones de RFLP para estas dos enzimas se ha asociado a una diferencia en la longitud de los productos de amplificación, como consecuencia de la presencia de secuencias repetidas, del tipo micro o minisatélites, presentes en esta secuencia (Almuly *et al.*, 2000). La existencia de polimorfismos para este gen ha sido descrita también para muchas especies de peces, como *Salmo trutta* L., 1758 (Gross y Nilsson, 1995), *Salmo salar* L., 1758 (Park, Moran y Dightman, 1995), *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1752) (Forbes *et al.*, 1994), *Alburnus alburnus* (L., 1758) (Schlee *et al.*, 1996) y *Abramis brama* (L., 1758) (Gross *et al.*, 1996).

Los productos de PCR de los intrones IV y V fueron de igual tamaño para todos los individuos reproductores, y los patrones de corte con las diferentes enzimas de restricción fueron también los mismos para todos los individuos, por lo que, debido a esta ausencia de polimorfismo, no se llevó a cabo el análisis de la descendencia.

En el análisis de la secuencia del intrón I de la PRL se encuentran dos alelos, distribuidos en un total de tres genotipos. Para los tres grupos de

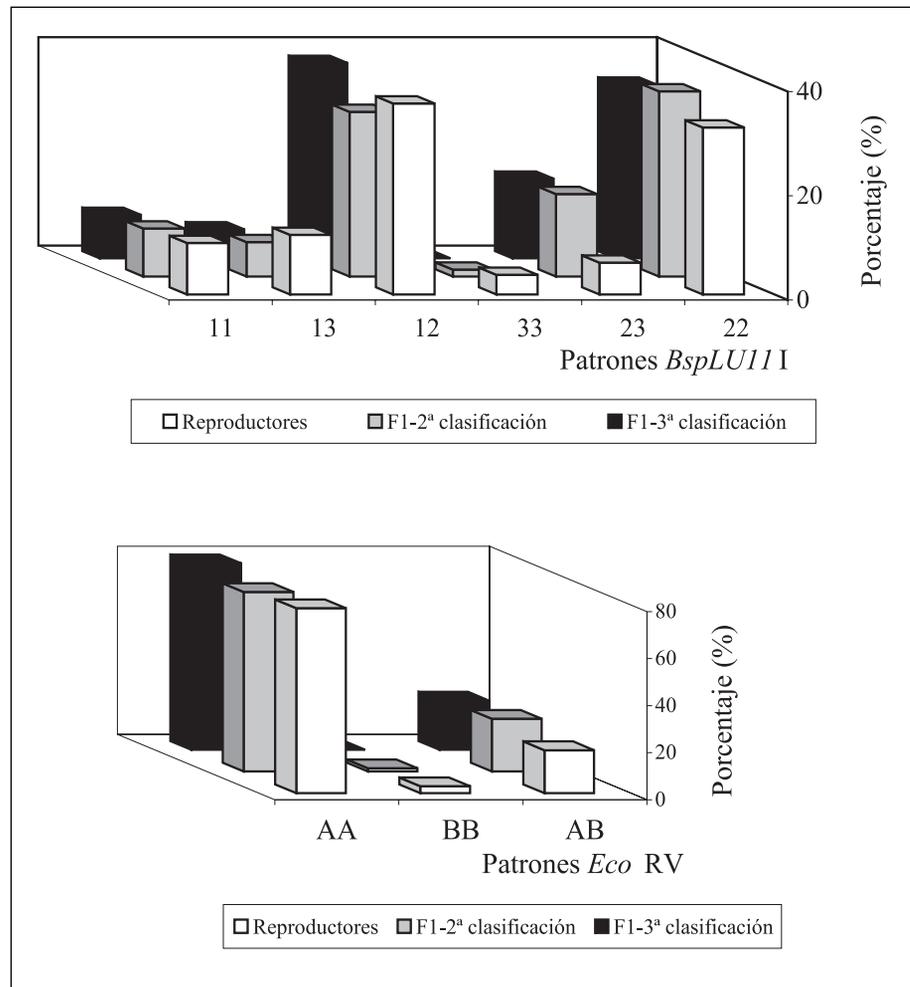
individuos, esta distribución de genotipos fue similar. El genotipo más abundante en los tres grupos es el AA, seguido por el heterocigoto AB; hay que destacar la casi inexistencia del genotipo BB, que solo está presente en los reproductores y en los descendientes de la 2.^a clasificación. En cuanto al porcentaje de heterocigotos es muy similar para los tres grupos (datos no mostrados).

La digestión de estos productos con la enzima *Eco*RV originó tres patrones diferentes, y con la enzima *Bsp*LU1II se originaron seis; la distribución de estos patrones en los tres grupos fue similar. Tal y como se puede observar en la figura 3, el patrón más abundante en el caso de *Eco*RV fue el A, seguido por el C; y en el caso de las digestiones con *Bsp*LU1II los patrones C y F fueron los más representativos de cada grupo.

Los polimorfismos detectados con *Eco*RV responden a una diferencia en la longitud de los fragmentos generados. Y los polimorfismos detectados con *Bsp*LU1II fueron consecuencia tanto de una diferencia en la longitud de los fragmentos como de una diferencia en la secuencia de nucleótidos en las dianas de restricción.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 11.5.1 para determinar si los grupos de individuos analizados presentaban diferencias significativas, o no, con respecto a las variables biométricas disponibles (talla y peso). En nuestro caso, la variable independiente la constituyen los genotipos o los patrones

Figura 3: Distribución de los patrones de RFLP del intrón I de la PRL para los tres grupos de individuos.



enzimáticos, identificados para cada uno de los individuos pertenecientes a los distintos grupos diferenciados entre reproductores y su descendencia. Los individuos, tanto reproductores como sus descendientes, fueron agrupados en función del genotipo o patrón enzimático identificado en cada uno de ellos, y para cada uno de estos grupos se calcularon los pesos y las tallas medias.

El análisis de la varianza (anova) llevado a cabo con el intrón I de la GH permitió encontrar correlaciones significativas ($p < 0,05$), tanto con la talla como con el peso, en el caso de los descendientes (tabla II).

Este tipo de asociación entre polimorfismos en el gen de la GH y caracteres cuantitativos y cualitativos ha sido descrita en animales de granja para caracteres como el crecimiento y la calidad de la carne en ganado vacuno (Choi *et al.*, 1997), la concentración de grasa en leche en el

mismo ganado (Hoj *et al.*, 1993) y la producción de huevos y la resistencia a enfermedades en aves (Kuhnlein *et al.*, 1997). La asociación entre peso y polimorfismos en el gen de la GH también ha sido descrita en otras especies de peces, como *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel, 1846) (Kang *et al.*, 2002), *S. salar* (Gross y Nilsson, 1999) y *Salvelinus alpinus* (L., 1758) (Tao y Boulding, 2003).

Los RFLP descritos para el intrón I de la PRL no presentaron ninguna correlación significativa con los caracteres biométricos estudiados (tabla III). No existen estudios previos en los que se relacione polimorfismo de la PRL con caracteres biométricos, y los resultados del presente trabajo indican que no existe una correlación entre los polimorfismos observados y los caracteres cuantitativos estudiados, al menos en las etapas de crecimiento y los ejemplares analizados de *S. aurata*.

Tabla II. Valores de probabilidad (p) para el análisis de la varianza del intrón I de la GH. (*): $p < 0,05$.

Variables	Reproductores			Descendientes		
	Genotipo	RFLP <i>Hae</i> III	RFLP <i>Hap</i> II	Genotipo	RFLP <i>Hae</i> III	RFLP <i>Hap</i> II
Talla	0,525	0,525	0,528	0,003*	0,002*	0,003*
Peso	0,760	0,760	0,741	0,001*	0,001*	0,001*

Tabla III. Valores de probabilidad (p) para el análisis de la varianza del intrón I de la PRL.

Variables	Reproductores			Descendientes		
	Genotipo	RFLP <i>Eco</i> RV	RFLP <i>Bsp</i> LU111	Genotipo	RFLP <i>Eco</i> RV	RFLP <i>Bsp</i> LU111
Talla	0,173	0,173	0,202	0,874	0,874	0,965
Peso	0,220	0,220	0,274	0,813	0,813	0,966

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto Petri (Petri-PTR1995-0648-OP-03-03) y por la Universidad de Cádiz mediante la concesión de una beca FPI a I. Sánchez Ramos.

BIBLIOGRAFÍA

- Almuly, R., B. Cavari, H. Ferstman, O. Kolodny y B. Funkenstein. 2000. Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding gene: Identification of minisatellite polymorphism in intron I. *Genome* 43: 836-845.
- Astola, A., M. Ortiz, J. A. Caldach-Giner, J. Pérez-Sánchez y M. M. Valdivia. 2003. Isolation of *Sparus auratus* prolactin gene and activity of the cis-acting regulatory elements. *General and Comparative Endocrinology* 134: 57-61.
- Björnsson, B. T., G. I. Hemre, M. Bjornevik y T. Hansen. 2000. Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during induced smoltification of under-yearling Atlantic Salmon. *General and Comparative Endocrinology* 119: 17-25.
- Bolton, J. P., N. L. Collie, H. Kawauchi y T. Hirano. 1987. Osmoregulatory actions of growth hormone in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal Endocrinology* 112: 63-68.
- Chen, E. Y., Y. C. Liao, D. H. Smith, H. A. Barrera-Saldana, R. E. Gelinas y P. H. Seeburg. 1989. The human growth hormone locus: Nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 4: 479-497.
- Chen, H. T., C. S. Chiou y W. C. Chang. 1991. Cloning and characterization of the carp prolactin gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1088: 315-318.
- Chiou, C. S., H. T. Chen y W. C. Chang. 1990. The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1087: 91-94.
- Choi, Y., D. Yim, J. Cho, B. Cho, K. Na y M. Baik. 1997. Analysis of restriction fragment length polymorphism in the bovine growth hormone gene related to growth performance and carcass quality of Korean native cattle. *Meat Science* 45: 405-410.
- Clarke, W. C. y H. A. Bern. 1980. Comparative endocrinology of prolactin. En: *Hormonal Proteins and Peptides*. C. H. Li (ed.): 105-197. Academic Press. Nueva York.
- Donaldson, L. R. y P. R. Olson. 1955. Development of rainbow trout broodstock by selective breeding. *Transactions of the American Fisheries Society* 85: 93-101.
- Eknath, A. E., M. M. Dey, M. Rye, B. Gjerde, T. A. Abella, R. C. Sevilleja, M. M. Tayament, R. A. Reyes y H. B. Bentsen. 1998. Selective breeding of Nile tilapia from Asia. En: *Proceedings of 6th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production* (11-16 de enero, 1998. Armidale, Australia). L. Haworth, M. Little e I. Schmidt (eds) 27: 89-96. Edita: el comité organizador del congreso. Armidale (Nuevo Gales del Sur), Australia.
- Emboly, G. C. y C. D. Hyford. 1925. The advantage of rearing brook trout fingerlings from selected breeders. *Transactions of the American Fisheries Society* 55: 135-138.
- Forbes, S. H., K. L. Knudsen, T. W. North y F. W. Allendorf. 1994. One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 1628-1631.
- Gross, R. y J. Nilsson. 1995. Application of heteroduplex analysis for detecting variation within the growth hormone 2 gene in *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 74: 286-295.
- Gross, R. y J. Nilsson. 1999. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. *Aquaculture* 173: 73-80.
- Gross R., P. Schlee, H. Stein y O. Rottmann. (1996). Detection of allelic variation within the growth hormone gene in common bream using heteroduplex analysis. *Journal of Fish Biology* 48: 1283-1287.

- Hinitz, Y. y B. Moav. 1999. Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 173: 285-296.
- Hirano, T., T. Ogasawara, J. P. Bolton, N. L. Collie, S. Hasegawa y M. Iwata. 1986. Osmoregulatory role of prolactin in lower vertebrates. En: *Comparative Physiology of Environmental Adaptations*. R. Kirsch y B. Lahlou (eds.): 112-124. Karger, Basilea, Suiza.
- Ho, W. K. K., M. W. Wong y A. P. Y. Chan. 1991. Cloning and sequencing of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) growth hormone gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1090: 245-248.
- Hoj, S., M. Fredholm, N. J. Larsen y V. H. Nielsen. 1993. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Animal Genetics* 24: 91-98.
- Idler, D. R., G. L. Fletcher, S. Belkhome, M. J. King y S. J. Hwang. 1989. Regulation of antifreeze protein production in winter flounder: a unique role for growth hormone. *General and Comparative Endocrinology* 74: 327-334.
- Kang, J. H., S. J. Lee, S. R. Park y H. Y. Ryu. 2002. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 68: 494-498.
- Kuhnlein, U., S. Weigend, L. Ni, J. S. Gavora, W. Fairfull y D. Zadworny. 1997. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. *Animal Genetics* 28: 116-123.
- Mancera, J. M. y S. D. McCormick. 1998. Osmoregulatory actions of the GH:IGF axis in non-salmonid teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 121: 43-48.
- Martínez, G., E. M. Shaw, M. Carrillo y S. Zanuy. 1998. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques* 24: 238-239.
- Park, L. K., P. Moran y D. A. Dightman. 1995. A polymorphism in intron D of the chinook salmon growth hormone 2 gene. *Animal Genetics* 26: p. 285.
- Rozen, S. y H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. S. Krawetz y S. Misener (eds.): 365-386. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, EE UU.
- Sánchez-Ramos, I., I. Cross y L. Rebordinos. 2004. Determination of RFLP's in genes related to growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). En: *Biotechnologies for Quality: Extended Abstracts and Short Communications*. S. Adams y J. A. Olafsen (eds.): 713-714. European Aquaculture Society, Barcelona, España.
- Schlee, P., H. Fuchs, T. Werner, O. Rottmann y H. Stein. 1996. Genetic polymorphism in the intron of the growth hormone gene of the bleak. *Journal of Fish Biology* 48: 1275-1277.
- Tanaka, M., Y. Hosokawa, M. Watahiki y K. Nakashima. 1992. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene* 112: 235-239.
- Tang, Y., C. M. Lin, T. T. Chen, H. Kawauchi, R. A. Dunham y D. A. Powers. 1993. Structure of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 2: 198-206.
- Tao, W. y E. Boulding. 2003. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Heredity* 91: 60-69.
- Wiener, G. 1994. *Animal Breeding*. MacMillan. Londres: 208 pp.
- Xiong, F., R. A. Chin y C. L. Hew. 1992. A gene encoding chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) prolactin: gene structure and potential cis-acting regulatory elements. *Molecular Marine Biology Biotechnology* 1: 155-164.