

Optimización de técnicas de extracción de ADN y amplificación de marcadores QTL en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Optimization of DNA extraction and amplification techniques of QTL markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Bibiana C. Rogel, Valeria C. Marcucci, y Pedro De Carli
rogelbibiana@gmail.com, pdecarli@uarg.unpa.edu.ar

Unidad Académica Río Gallegos – Universidad Nacional de la Patagonia Austral.
Campus Universitario – Lab. C5/D8. Río Gallegos – Santa Cruz (Argentina)
ICASUR / UARG – UNPA

Recibido: 21/05/2018. Aceptado: 05/07/2019

RESUMEN

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es un salmónido resistente, de crecimiento rápido, y tolerante a una amplia gama de ambientes y manipulaciones, lo que le otorga un gran potencial para la acuicultura.

Actualmente, la producción de trucha arco iris representa aproximadamente el 30% de la producción acuícola de Argentina, que durante el 2015 tuvo una producción de 3.900 t. La producción es absorbida por el mercado local y también se la exporta a Estados Unidos de América. La trucha de cultivo patagónica tiene gran valor debido a que se produce en condiciones seguras de inocuidad sanitaria y sin uso de antibióticos. El cultivo en la provincia de Santa Cruz se realiza en sistemas intensivos en estanques en tierra o extensivos mediante la siembra en lagos y lagunas. En el año 1992, la Estación Municipal de Piscicultura Isla Pavón (EMPIP) se constituye como el primer y único centro de producción de trucha arco iris en la provincia de Santa Cruz. Desarrolla un programa de mejoramiento genético realizando cruzamientos sucesivos y dirigidos, de individuos con alta tasa de crecimiento y buen filete. La productividad y sostenibilidad de la piscicultura se ve favorecida por la posibilidad de producir organismos de mejor calidad en un menor tiempo.

El uso de marcadores moleculares para selección en generaciones tempranas constituye una herramienta que permite identificar los genotipos, y de esta manera reforzar la selección basada en características fenotípicas. Su aplicación permite seleccionar los reproductores con mayor potencial productivo a través de la identificación de alelos de interés económico (QTL).

En relación a la identificación de QTLs en trucha arco iris, diversos autores han trabajado con marcadores de ADN nuclear para distintas características de interés productivo, entre ellas, resistencia a enfermedades, tasa de crecimiento, maduración sexual, producción de ovas, entre otras.

En el presente estudio se optimizaron técnicas de extracción de ADN a partir de tejido, se evaluaron distintos marcadores QTL descritos en la bibliografía y se optimizaron técnicas de amplificación para un marcador seleccionado. El análisis realizado representa una de las herramientas que permitirá a la EMPIP conocer el estado del stock de reproductores mediante su caracterización genotípica.

Palabras clave: acuicultura; salmónidos; caracteres cuantitativos; mejoramiento genético.



ABSTRACT

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is a resistant salmonid, that growing fast and tolerant of a wide range of environments and manipulations, which gives it great potential for aquaculture. Currently, in Argentina, production of rainbow trout represents about 30% of aquaculture production, which in 2015 had a production of 3,900 t. Production is absorbed by the local market and also exported to United States. The trout cultivate in patagonia is great value because it occurs under health safety conditions, without antibiotics. Cultivation in Santa Cruz is done in intensive (pools) or extensive system by seeding in lakes and ponds. In 1992, the Municipal Cultivate Fish Station Isla Pavón (EMPIP) becomes in the first and only center that produce rainbow trout in the province of Santa Cruz. Develops a breeding program performing successive and crossbreeding of individuals with high growth rate and good fillet. Productivity and sustainability of fish farming is favored by the hability to produce better quality organisms in less time.

Using molecular markers for selection in early generations is a tool to identify genotypes, and thus reinforce the selection based on phenotypic characteristics. Its application allows players to select the most productive potential through the identification of alleles economic interest (Quantitative trait loci); in this way it favored the development of particular genotypes with subsequent improvement of recurrent selection populations.

The analysis represents one of the tools that allow the EMPIP at a later instance, the status of broodstock and phenotypically characterize the entire population to be used as parents in generating subsidiaries subject to selection.

Regarding the identification of QTLs in rainbow trout, several authors have worked with nuclear DNA markers for different characteristics of productive interest, including disease resistance, growth rate, sexual maturation, egg production, among others. So far, there are no history of QTL identification markers of STR type for *O. mykiss* in Argentina.

The aim of the present study was to optimize DNA extraction techniques from tissue, to evaluate different QTL markers described in the literature and to optimize amplification techniques for selected markers, as well as to perform an assessment of QTL determination techniques of the type STR.

Key words: aquaculture; salmonid; quantitative trait loci; genetic selection.

INTRODUCCIÓN

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es un salmónido resistente, de crecimiento rápido, y tolerante a una amplia gama de ambientes y manipulaciones, lo que le otorga un gran potencial para la acuicultura. Es nativa de la costa del Océano Pacífico en América del Norte. Entre 1904 y 1910 fue traída al país desde Estados Unidos. En 1906 fue introducida en Santa Cruz (Dyer, 2000; Pascual *et al.*, 2001). La introducción en el país se intensificó después de 1950 con sustento en las reservas de Dinamarca (Mac Crimmon, 1971) y mantenido por el criadero de Bariloche. Este último se convirtió en el principal centro de propagación de salmónidos en aguas argentinas.

Actualmente, la producción de trucha arcoiris representa aproximadamente el 30% de la producción acuícola de Argentina, que durante el 2015 tuvo una producción de 3.900 t (FAO, 2016). La producción es absorbida por el mercado local y también se la exporta a Estados Unidos. La trucha de cultivo patagónica tiene gran valor debido a que se produce en condiciones seguras de inocuidad sanitaria y sin uso de antibióticos.



El cultivo en la provincia de Santa Cruz se realiza en sistemas intensivos en estanques en tierra o extensivos mediante la siembra en lagos y lagunas (Marcos, 2000; Pascual y Lancelotti, 2006). Los sistemas de producción intensiva, basados en la selección fenotípica buscan obtener individuos con características de interés productivo más acentuadas, de mayor calidad y en menor tiempo. En el año 1992, la Estación Municipal de Piscicultura Isla Pavón (EMPIP) se constituye en el primer y único centro de producción de trucha arco iris en la provincia de Santa Cruz. Desarrolla un programa de mejoramiento con bases fenotípicas, realizando cruzamientos sucesivos y dirigidos de individuos con alta tasa de crecimiento y buen filete (cuerpo corto y ancho). La productividad y sostenibilidad de la piscicultura se ve favorecida por la posibilidad de producir organismos de mejor calidad en un menor tiempo. La selección mediada por marcadores moleculares constituye una de las herramientas que brinda la genética para alcanzar dicho objetivo.

La investigación y el desarrollo en el campo de la acuicultura en pos de formular planes de mejora genética en especies cultivadas, se encuentran en crecimiento, y acompaña la tendencia de crecimiento sostenido de la acuicultura en los últimos años. El uso de marcadores moleculares para selección en estadíos tempranos de desarrollo constituye una herramienta que permite identificar los genotipos, y de esta manera reforzar la selección basada en características fenotípicas. Su aplicación permite seleccionar los reproductores con mayor potencial productivo a través de la identificación de alelos de interés económico; de esta manera se ve favorecido el desarrollo de genotipos particulares con el posterior mejoramiento de poblaciones por selección.

En relación a la identificación de QTLs en trucha arco iris, diversos autores han trabajado con marcadores de ADN nuclear para distintas características de interés productivo, entre ellas, resistencia a enfermedades, tasa de crecimiento, maduración sexual, producción de ovas, entre otras.

O'Malley y colaboradores (2002) propusieron una línea de trabajo vinculada a la identificación de QTL relacionados con el peso corporal en salmónidos, en trucha arco iris (*O. mykiss*) y salmón del atlántico (*Salmo salar*). Mediante marcadores microsatélites identificaron QTLs asociados a tres grupos de ligamiento distintos: dos fueron registrados sólo en *O. mykiss* (Ots4BML- OmyRGT31TUF) y uno en ambas especies (Ssa68NVH).

Haidle y Danzmann (2008) trabajaron en la detección de QTL relacionados a la maduración temprana. Esta característica tiene un control genético asociado al sexo, es por eso que se evaluaron por separado distintos lotes de progenies femeninas y masculinas, a fin de identificar los grupos de ligamiento con mayor efecto sobre la maduración. A través de la utilización de marcadores microsatélites (STR) se obtuvieron resultados satisfactorios y similares a los registrados para la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*; Moghadam *et al.*, 2007): la mayor densidad de QTL en los grupos de hembras se localizó en el grupo de ligamiento RT-30, y para los machos en el RT-8 y RT-24. Haidle y Danzmann (2008) concluyó que la detección de los marcadores para identificar QTL vinculados a la madurez precoz localizados en el grupo de ligamiento RT-24, es independiente del sexo, por lo que se recomienda trabajar con el microsatélite OMM1320 (Rexroad, 2008).

Moghadam y colaboradores (2007) realizó el mapeo del gen IGF2 (factor de crecimiento insulínico tipo 2) para el género Salmonidae, y lo ubicó en el grupo de ligamiento RT-27. Wringe y colaboradores (2010) trabajó con la identificación de loci relacionados al crecimiento en trucha silvestre y doméstica; utilizando marcadores microsatélites previamente

desarrollados detectó una mayor densidad de QTL en machos, y que los grupos de ligamiento más fuertemente relacionados con el carácter bajo estudio son RT-24 y RT-27. De esta manera, se concluyó que el gen IGF2 se encuentra dentro de la misma región que los QTL que regulan el crecimiento en trucha arco iris y otros salmónidos.

En referencia a estudios realizados con *O. mykiss* en el país, y más específicamente en la provincia de Santa Cruz, Riva Rossi y colaboradores (2004) utilizó ADN mitocondrial de Región Control (CR o D-Loop) con la finalidad de establecer el origen de poblaciones anádromas y residentes en el río Santa Cruz, incluyendo el análisis de individuos del criadero de Isla Pavón. Como sugirió anteriormente el análisis por microsatélites realizado por Pascual y colaboradores (2001), el ADNmt reforzó la idea de que las poblaciones de truchas anádromas y residentes del río Santa Cruz tienen un ancestro común. Por otro lado, fue posible concluir que la población salvaje es diferente del stock de criadero, obteniendo evidencia suficiente para determinar que las poblaciones de Santa Cruz tuvieron su origen en las truchas californianas importadas a Argentina durante la primera década del siglo XX, y las de criadero son de origen danés, las cuales fueron ampliamente propagadas en la región después de 1950. Adicionalmente, los resultados demostraron que el ingreso accidental de peces del criadero en la población salvaje no fue significativo.

Hasta la fecha, no hay antecedentes de identificación de marcadores QTL de tipo STR para *O. mykiss* en Argentina.

En el presente estudio se optimizaron las técnicas de extracción de ADN a partir de tejido, se evaluaron distintos marcadores QTL descritos en la bibliografía y se optimizaron las técnicas de amplificación para los marcadores seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó sobre individuos del stock de reproductores de la Estación Municipal de Piscicultura Isla Pavón (50° 0.2' S, 68° 56.2' O). La misma se ubica en proximidades a la localidad de Cte. Luis Piedra Buena, provincia de Santa Cruz (Argentina), más específicamente en la Isla Pavón, ubicada en el río Santa Cruz.

Se tomaron muestras de 18 individuos, 9 machos y 9 hembras. A cada ejemplar se le registró peso, longitud total y longitud de circunferencia a la altura de la aleta dorsal; y se seccionó un segmento de aleta caudal y de aleta adiposa, para obtener el tejido para análisis genético, que fueron conservados en etanol al 95% a 4 °C.

El ADN total se extrajo con el método de extracción salina (Aljanabi y Martínez, 1997) modificado; el mismo consiste en colocar 100 mg de tejido en microtubos de 1.5 ml con 400 µl de solución buffer de lisis (Tris, EDTA, NaCl y SDS) y 20 µl de proteinasa K a 65 °C (en algunos casos el tejido fue previamente homogeneizado en mortero); luego se adicionaron 200 µl de NaCl saturado (6M), se llevó a -20°C por 10 minutos, y se centrifugó por 10 min a 10.000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un tubo con 900 µl de etanol absoluto frío y se centrifugó por 10 minutos a 13.000 rpm, se descartó el sobrenadante; y el precipitado se lavó con etanol 70% centrifugando a 13.000 rpm por 5 minutos; luego se resuspendió con 100 µl de agua.

El ADN total extraído fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (45 minutos a 90 V).

Para la amplificación de marcadores microsatélites a través de PCR, se pusieron a prueba *primers* diseñados para amplificar los segmentos IGF2 y OMM1320 en *O. mykiss* (Tabla 1). La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador MultiGene™ OptiMax (LabNet). La reacción de amplificación se preparó en un volumen final de 20 µl, conteniendo Taq polimerasa (1U, PBL), MgCl₂ (1,5 mM), buffer para PCR (1X), dNTPs (0,2 mM), 2 primers (0,2 µM), extracto de ADNt (1 ng) y agua ultrapura. El protocolo de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C por 10 minutos; seguida de 35 ciclos con las siguientes temperaturas: desnaturalización a 94 °C, hibridación a 58 °C, extensión a 72 °C, cada una de ellas durante 30 segundos, y por último, una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

El ADN amplificado fue valorado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (90 minutos a 75 V).

Se realizó la optimización del protocolo de PCR mediante ensayo de gradiente térmico (42-64°C). Tabla 1. Primer utilizados (1) Palti *et al.* (2002) (2) Moghadam *et al.* (2007).

Tabla 1. Primer utilizados (1) Palti *et al.* (2002) (2) Moghadam *et al.* (2007).

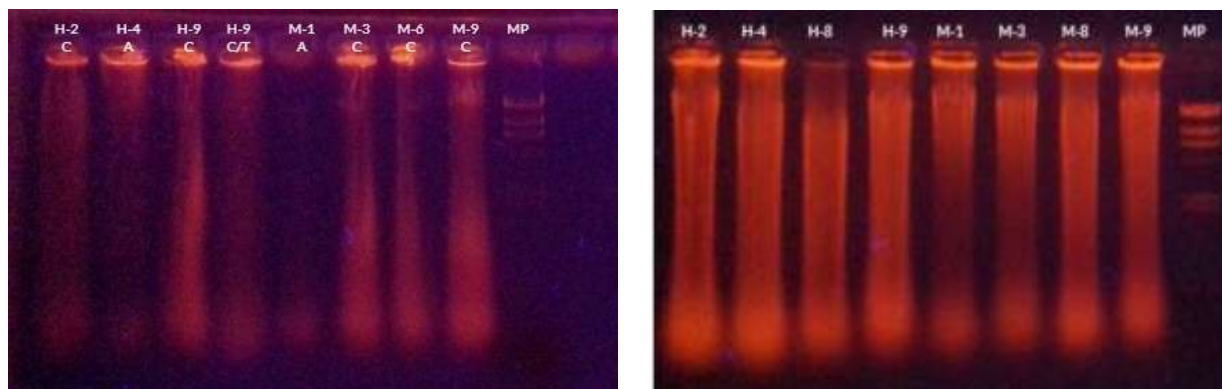
Primer	Código Genbank	Secuencia	Tm (°C)
OMM1320	G73558 ⁽¹⁾	F:GAAAGTGTCTGTCTGTCCGC R:GGTGAATACTTTCGCAAGCCA	58
IGF2	EF450082 ⁽²⁾	F:TTGACTGTCTCTCGCTCTCG R:CGCCCTTTCATATGCAATCT	55

RESULTADOS

El método de extracción salina modificado (Aljanabi y Martínez, 1997) permitió la extracción de ADN. Al comparar los resultados obtenidos a partir de tejido de aleta adiposa y caudal, se observaron diferencias en la extracción, obteniendo una mayor concentración de ADN al hacerlo a partir de tejido de aleta caudal sin homogeneizar previamente en mortero (Figura 1).

Como resultado de la PCR para los marcadores seleccionados de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se obtuvieron productos de amplificación para IGF2 y OMM1320. El análisis de la electroforesis de los productos de amplificación de las muestras de machos presentó registros en ambos marcadores. En tanto en las hembras, se obtuvieron productos de amplificación para ambos marcadores, pero la electroforesis presentó bandas con mayor intensidad para el marcador IGF2 (Figura 2).

A partir de estos resultados, sólo se realizó PCR de gradiente de temperatura para el marcador OMM1320, empleando las muestras de ADN extraído de machos cuyo ADN total resultó de mayor calidad a partir del análisis de la electroforesis (Figura 1), con un gradiente de temperatura entre los 42 °C y 64 °C. A partir de la electroforesis de los productos de amplificación de gradiente se determinó una temperatura óptima entre los 55 °C y 61 °C.



a. aleta adiposa

b. aleta caudal, sin homogeneizar previamente en mortero

Figura 1. Fotografía de electroforesis de ADN total, extraído a partir de tejido de diferentes aletas de trucha arco iris (*O. mykiss*) (M: machos, H: hembras, C: tejido de aleta caudal, A: tejido de aleta adiposa, T: homogeneizado previamente en mortero, MP: marcador de peso lambda HindIII de PBL).

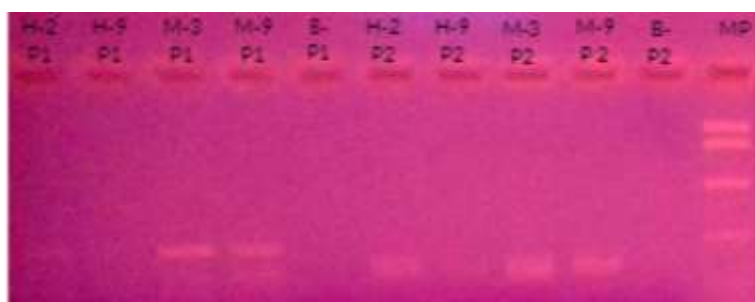


Figura 2. Fotografía de electroforesis de productos de amplificación (PCR) de (*O. mykiss*) para los marcadores OMM1320 (P1, calles 1-5) y IGF2 (P2, calles 6-10), en ambos casos las primeras dos muestras pertenecen a hembras (H), las dos siguientes a machos (M) y la última a un blanco o control negativo (B-), y MP: marcador de peso (masa precisión PBL, se observan las bandas de 2.000, 1.500, 800 y 400 bp).

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Los resultados de la amplificación de marcadores QTL ensayados concuerdan con los observados en investigaciones previas, en las que se analizaron marcadores vinculados a la madurez sexual y al peso corporal (Rexroad *et al.*, 2008; Wringe *et al.*, 2010) ya que se detectaron QTL vinculados a ambas características, independientemente del sexo, aunque se observó una mayor amplificación de marcadores QTL en machos.

El ensayo de extracción de ADN permite recomendar el protocolo a partir de tejido de aleta caudal, dado que la cosecha de ADN ha resultado mayor, contra la alternativa de tejido de aleta adiposa, como dos alternativas para el estudio de ADN de ejemplares de trucha arco iris (*O. mykiss*) en cautiverio.

Se sugiere continuar el estudio aumentando el número de muestras, realizar la extracción de ADN a partir de tejido de aleta caudal mediante protocolo de extracción salina modificado

(Aljanabi y Martinez, 1997), y amplificar el marcador OMM1320 con una temperatura de hibridación de 61°C en el ciclo de PCR.

Estudios recientes realizan un análisis genómico a fin de identificar loci que afectan el peso corporal y características del filet, reconociendo marcadores SNPs que explican un mayor porcentaje de varianza genética para estas características (Gonzalez Pena *et al.*, 2016; Al-Tobasei *et al.*, 2017), y que podría ser considerada una herramienta alternativa a la analizada en este trabajo.

El análisis realizado representa una de las herramientas que permitiría a la Estación Municipal de Piscicultura Isla Pavón, en una instancia más avanzada, conocer el estado del stock de reproductores y caracterizar genotípicamente a toda la población que será utilizada en la selección de parentales.

AGRADECIMIENTOS

Esta publicación es resultado del trabajo llevado a cabo por el grupo de investigación de genética de poblaciones de la UNPA UARG, gracias al aporte de los subsidios PDTs UNPA 29/A381, PE SPU 3408/15 y PVT SPU 6241UNPA/16, la beca de investigación para estudiantes de grado UNPA, y el trabajo del personal de la EMPIP.

BIBLIOGRAFÍA

- ALJANABI M.S. y MARTINEZ I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-techniques. *Nucleic Acids Res.* 25(22), 4692-4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- AL-TOBASEI R., ALI A., LEEDS T.D., LIU S., PALTÍ Y., KENNEY B. y SALEM M. (2017). Identification of SNPs associated with muscle yield and quality traits using allelic- imbalance analyses of pooled RNA-seq samples in rainbow trout. *BMC Genomics*, 18:582. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3992-z>
- DYER B. (2000). Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Estud.Oceanol* 19, 77-98.
- FAO (2016). *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2016*. Informe Anual.
- GONZALEZ PENA D., GAO G., BARANSKI M., MOEN T., CLEVELAND B.M., KENNEY P.B., VALLEJO R.L., PALTÍ Y. y LEEDS T.D. (2016). Genome-wide association study for identifying loci that affect fillet yield, carcass, and body weight traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Front. Genet.*, 7:203. doi: 10.3389/fgene.2016.00203. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00203>
- HADLE L. y DANZMANN R.G. (2008). Determination of Quantitative Trait Loci (QTL) for early maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotechnol*, 10: 579–592. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9098-5>
- MAC CRIMMON H.R. (1971). World distribution of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can*, 28: 1699–1725. <https://doi.org/10.1139/f71-098>
- MARCOS F. (1999). La meseta de las truchas. Búsqueda de alternativas. Revista Alimentos Argentinos, 25. SAGPyA. Argentina.

- MOGHADAM H.K., FERGUSON M.M., REXROAD C.E., COULIBALY I., DANZMANN R.G. (2007). Genomic organization of the IGF1, IGF2, MYF5, MYF6 and GRF / PACAP genes across Salmonidae genera. *Animal Genetics*, 38, 527–532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01645.x>
- O'MALLEY K.G., SAKAMOTO T., DANZMANN R.G. y FERGUSON M.M. (2002). Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes. *J of Heredity*, 94(4), 273-284. <https://doi.org/10.1093/jhered/esg067>
- PALTI Y., FINCHAM M.R. y REXROAD C.E. (2002). Characterization of 38 polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Mol. Ecol.*, 2(4), 449-452. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00274.x>
- PASCUAL M.A., BENTZEN P., RIVA ROSSI C., MACKEY G., KINNISON M. y WALKER R. (2001). First documented case of anadromy in a population of introduced rainbow trout in Patagonia, Argentina. *T. Am. Fish. Soc.*, 130: 53-67. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(2001\)130<0053:FDCOAI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(2001)130<0053:FDCOAI>2.0.CO;2)
- PASCUAL M.A. y LANCELOTTI J.L. (2006). *Memoria del Taller de Trabajo “La producción e impacto del cultivo extensivo de trucha arco iris exótica en lagunas de la zona del Lago Strobel, provincia de Santa Cruz”*. Grupo técnico SPSC-GESA (CENPAT-CONICET). Reporte Técnico 1-06. pp 16.
- REXROAD C.E, PALTI Y., GAHR S.A. y VALLEJO R.L. (2008). A second generation genetic map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genetics*, 9: 74. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-74>
- RIVA ROSSI C., LESSA E. y PASCUAL, M. (2004). The origin of introduced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Santa Cruz River, Patagonia, Argentina, as inferred from mitochondrial DNA. *Can J Fish Aqua. Sci*, 61: 1095–1101. <https://doi.org/10.1139/f04-056>
- WRINGE B., DEVLIN R., FERGUSON M., MOGHADAM H., SAKHRANI D. y DANZMANN R. (2010). Growth-related quantitative trait loci in domestic and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genetics*, 11: 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-63>