# CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE TRUCHA COMUN AUTÓCTONA (Salmo trutta) PRESENTES EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ARAGÓN

Monclús C.[1], Larrayad R.[1,2],Villalta M. [1,3],Blasco J.M.[1], Cortey M.[4] y García-Marín J.L.[4]

[1] Unidad de Sanidad Animal, S.I.A./ D.G.A. (Zaragoza)

[2] Dirección General del Medio Natural, D.G.A. (Zaragoza)

[3] Servicios Veterinarios Oficiales de Salud Pública, D.G.A. (Albarracín-Teruel)

[4] Laboratorio de Ictiología Genética de la Universidad de Girona

## INTRODUCCIÓN

La trucha común es una especie originaria de Eurasia y Norte de África que presenta una gran plasticidad fenotípica y distintas variantes ecológicas, lo que ha llevado a una considerable confusión taxonómica (Bernatchez, 2001). En Aragón, se comenzaron los estudios genéticos en 1997 con ejemplares de ríos pertenecientes a la Confederación Hidrográfica del Ebro y del Júcar, utilizando como herramienta molecular la zona de control (D-loop) y genes adyacentes del ADN mitocondrial (mtDNA) mediante tecnología PCR-RFLPs (Villalta et al., 1998; Larrayad et al., 1999). Más recientemente, se caracterizaron los RFLPs resultantes para establecer las distancias genéticas entre las diferentes poblaciones autóctonas "mediterráneas" identificadas, así como su relación genética con las truchas repobladas de origen "atlántico". A su vez, y para confirmar los resultados obtenidos con esta técnica, también se estudió la secuencia nucleotídica del D-loop de individuos representativos de cada una de las poblaciones de trucha anteriormente identificadas. Del análisis conjunto de ambas técnicas se obtuvieron resultados coincidentes, destacando que en los ríos y afluentes aragoneses podemos encontrar dos razas de trucha común autóctona "mediterránea": ME1 y ME2.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 1401 ejemplares de ríos y afluentes de nuestra Comunidad Autónoma, así como de las piscifactorías oficiales. A su vez, se incluyeron truchas procedentes de otras cuencas como controles externos. El estudio se llevó a cabo a partir de ADN de aleta adiposa donde se amplificó un fragmento de 2.75 Kb que comprende la zona de control o D-loop y genes adyacentes del mtDNA para, posteriormente, caracterizarse con enzimas de restricción (Villalta et al., 1998). Las distancias genéticas calculadas a partir de los RFLPs y sus representaciones gráficas se obtuvieron con el software Lane Manager y ADA de TDI. Asimismo, también se secuenció la región de control o D-loop (1 Kb) de 59 individuos representativos de las diferentes poblaciones identificadas. La secuenciación automática se llevó a cabo en un ABI PRISM-310 Genetic Analyzer, alineando las secuencias con el software Seq.Ed.v.1.3.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el estudio genético de las poblaciones de trucha implicadas se han encontrado 14 enzimas de restricción de utilidad filogenética que han resultado en 43 haplotipos mitocondriales diferentes (RFLPs) -designados desde la letra A a la D-. De su análisis, se obtuvieron 108 fragmentos de restricción que han

servido para la obtención de una matriz de distancias genéticas utilizando como criterio la presencia o ausencia del fragmento (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Genotipos mitocondriales obtenidos por RFLPs donde se indica el origen macrogeográfico. ME: mediterráneo; AT: atlántico y DU: cuenca del Duero. ME1: ríos Huecha, Alto Ara, Lubierre, Pitarque y Pancrudo. ME 2: ríos Mesa, Guadalope y Acirón. DU 1: ríos Duero y Pedroso. AT 1: rías Camariñas y Lires. AT 2: ría Camariñas. AT 3: Piscifactoría de Planduviar (Huesca). AT 4: Piscifactoría de Planduviar (Huesca) y río Rudrón. *S. salar*: salmón atlántico.

| mtDNA genotipo | Hpa II | Mbo I | Alu I | Taq I | Dde I | Fok I | Hinf I | Alw 26 I | Hha I | Ita I | Mae I | Mae III | Nci I | Nla IV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ME 1 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| ME 2 | A | B | B | B | A | A | A | A | A | A | C | A | A | A |
| DU 1 | B | A | C | A | A | A | A | B | C | B | B | A | B | A |
| AT 1 | A | B | B | B | A | B | B | A | B | B | B | A | A | B |
| AT 2 | A | C | B | B | A | B | B | A | B | B | B | A | A | B |
| AT 3 | A | B | B | B | B | B | B | A | A | B | B | A | A | B |
| AT 4 | B | B | B | B | A | B | B | A | A | B | B | A | B | B |
| S. salar | C | C | D | C | C | C | C | C | A | C | D | B | C | C |

De este modo, se han identificado 7 genotipos mitocondriales diferentes que han sido codificados con las sucesivas letras de cada haplotipo. Más en concreto, se han detectado 2 genotipos "mediterráneos" –denominados ME1 y ME2-, que presentan una distancia genética media entre ellos de 0.73%. Asimismo, también se han identificado 2 genotipos alóctonos "atlánticos" –AT3 y AT4- presentes en nuestros ríos y piscifactorías encargadas de los programas de repoblación. A su vez, y debido a la inclusión de ejemplares de otras cuencas hidrográficas como control externo –Duero y Norte-, se ha caracterizado un genotipo "autóctono" endémico de la cuenca del Duero (DU 1) que presenta una distancia genética media de 1.6% con nuestros genotipos autóctonos "mediterráneos" (ME1 y ME2) y de 2.4% con los genotipos autóctonos de origen "atlántico" identificados en la cornisa cantábrica (AT1 y AT2). Como conclusión, la representación gráfica de estas distancias genéticas revela la presencia de tres agrupamientos filogenéticos principales: 1) un ensamblaje "mediterráneo" (ME 1 y ME 2) que incluiría nuestra trucha común autóctona "aragonesa", 2) otro de origen "atlántico" constituido por genotipos autóctonos de las cuencas del Norte (AT 1 y AT 2), así como por genotipos "alóctonos" (AT 3 y AT 4) presentes en nuestras piscifactorías oficiales y ríos sometidos a repoblación y, finalmente, 3) un linaje "autóctono" exclusivo para la cuenca del Duero (DU 1) que posiciona entre los dos agrupamientos anteriores (no se muestran los dendogramas).

Tabla 2. Distancias genéticas (% diferenciación nucleotídica) entre los distintos genotipos mitocondriales identificados mediante PCR-RFLPs a partir de los programas Lane Manager y ADA de TDI (Nei and Li, 1979).

| | ME 1 | ME 2 | DU1 | AT1 | AT 2 | AT 3 | AT 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ME 1 | | 0.7327 | 1.5237 | 1.9246 | 2.1376 | 1.6846 | 1.8960 |
| ME 2 | 0.7327 | | 1.6666 | 1.3144 | 1.4183 | 1.0821 | 1.4179 |
| DU 1 | 1.5237 | 1.6666 | | 2.3261 | 2.5428 | 1.9804 | 1.4188 |
| AT 1 | 1.9246 | 1.3144 | 2.3261 | | 0.3560 | 0.2218 | 0.8048 |
| AT 2 | 2.1376 | 1.4183 | 2.5428 | 0.3560 | | 0.5769 | 0.9053 |
| AT 3 | 1.6846 | 1.0821 | 1.9804 | 0.2218 | 0.5769 | | 0.5755 |
| AT 4 | 1.8960 | 1.4179 | 1.4188 | 0.8048 | 0.9053 | 0.5755 | |

Por último, para comprobar la fidelidad de nuestros resultados obtenidos por RFLPs se procedió a la secuenciación automática del D-loop. Del análisis

de las secuencias nucleotídicas obtenidas de 59 individuos representativos de las distintas poblaciones anteriormente caracterizadas por RFLPs, se duplicó el número de genotipos mitocondriales identificados (14 secuencias diferentes) obteniéndose, en consecuencia, una mayor sensibilidad con esta técnica que permite detectar mutaciones en nucleótidos que escaparon del alcance de las 14 endonucleasas de restricción utilizadas (Tabla 3). En particular, en las truchas "mediterráneas" –ME 1 y ME 2- se han encontrado 3 genotipos diferentes para cada linaje (a, b y c, respectivamente), estando algunos de ellos circunscritos en ríos aragoneses específicos. Por tanto, resulta evidente el interés de este método analítico para la caracterización "microgeográfica" de nuestras poblaciones de trucha. De la misma manera, se debe indicar que las distancias genéticas derivadas de este estudio coinciden plenamente con las obtenidas a partir del análisis previo por RFLPs, así como la distribución de agrupamientos filogenéticos (datos no presentados). En definitiva, este estudio demuestra la idoneidad de ambas técnicas –RFLPs y secuenciación- y la del marcador molecular utilizado –mtDNA- para la caracterización genética de esta especie.

Tabla 3. Genotipos mitocondriales detectados por secuenciación completa del D-loop donde se indican las posiciones variables. (1): indica la nomenclatura asignada a los genotipos en el Laborario de Ictiología Genética del Dr. García-Marín

| mtDNA genotipos | (1) | POSICIONES VARIABLES del D-loop | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 1 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 4 | 5 | 7 | 8 | 8 | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| | | 2 | 4 | 1 | 4 | 9 | 6 | 8 | 8 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 7 | 9 | 0 | 0 | 3 | 5 | 7 | 8 |
| | | 4 | 9 | 1 | 5 | 5 | 1 | 8 | 9 | 2 | 9 | 9 | 2 | 6 | 6 | 9 | 2 | 6 | 5 | 9 | 5 | 9 |
| ME 1 (a) | lb. 12 | C | | | | | C | T | C | C | T | | | | | G | | | | | | |
| ME 1 (b) | lb. 85 | C | | | | | C | T | | C | T | | | | | G | | | | | | |
| ME 1 (c) | lb. 87 | C | T | | | | C | T | C | C | T | | | | | G | | | | | | |
| ME 2 (a) | lb. 24 | C | | | A | C | | T | C | C | T | | | | C | G | | | | C | | |
| ME 2 (b) | lb. 67 | C | | | | C | | T | C | C | T | | | | C | G | | | | C | | |
| ME 2 (c) | lb. 86 | C | | | | C | | T | C | C | T | | | | C | G | | | | C | G | |
| DU 1 (a) | lb. 2 | | | | | | | | | | T | T | | C | | G | G | | | | | |
| DU 1 (b) | lb. 90 | | | | | | | | | | | T | G | C | | G | G | | | | | |
| AT 1 (a) | lb. 7 | | | C | A | | | | | | | | | | | | | | A | | | C |
| AT 1 (b) | lb. 88 | | | C | A | | | | | | | | | | | | | T | | | | C |
| AT 1 (c) | lb. 89 | | | C | A | | | | | | | | | | | | G | | A | | | C |
| AT 3 (a) | lb. 14 | | | | | | | | | | T | | | | | | | | A | | | |
| AT 3 (b) | lb. 30 | | | | | | | | | | T | | | | | | | A | A | | | |
| AT 4 (a) | lb. 15 | | | | | | | | | | T | | | | | | | | | | | |

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Bernatchez, 2001, Evolution.

Villalta et al., 1998, Cahiers Options Méditerranéennes, 34:247-264.

Larrayad et al., 1999, ITEA 1999, pag. 303-305.

Nei and Li, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5269-5273.