

QB⁰⁸

Quaderns blaus
DOCUMENTS DE TREBALL

La genètica en la identificació de productes pesquers

Sandra Mallo
Biologia Animal. Universitat de Girona

QB008

**La genètica
en la identificació
de productes
pesquers**

Carles Pla

Laboratori d'Ictiologia Genètica – UdG

Pesca i ciència 2002

Jornades de divulgació al sector pesquer dels resultats de la recerca.

CRÈDITS

Edita:	Càtedra d'Estudis Marítims (Universitat de Girona i Ajuntament de Palamós) i Museu de la Pesca
© del text:	Carles Pla Zanuy
Assessorament lingüístic:	Jaume Fina
Disseny de les cobertes i format interior:	Lluís Pareras Disseny Gràfic
Imprès a Catalunya per:	Copisteria Miracle
Patrocina:	Generalitat de Catalunya. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca. Direcció General de Pesca i Afers Marítims.
Col·labora:	Diputació de Girona Federació Territorial de Confraries de Pescadors de Girona
Secretaria de publicacions:	Museu de la Pesca Pl. Països Catalans, s/n 17230 Palamós T 972 60 12 44 F 972 31 21 44 Museudelapesca@palamos.org
Dipòsit Legal: ISBN: 84-933396-0-1	

Es prohibeix la reproducció total o parcial d'aquesta obra, en qualsevol de les seves formes, gràfica o audiovisual, sense autorització prèvia i escrita de l'editor, llevat de citacions a revistes, diaris o llibres, sempre que es faci esment de la seva procedència.

Utilització de l'anàlisi genètica en gestió pesquera

Podem definir el concepte de gestió pesquera com l'aplicació dels coneixements científics a l'obtenció de millors produccions comercials o al control de la pesca esportiva (Everhart & Youngs, 1981). Al 1976, la "Fishery Conservation and Management Act" dels EUA va definir els objectius d'una gestió pesquera com l'augment del nombre de captures que permet, a més, la seva conservació com a recurs biològic per a les properes generacions. D'aquesta manera ens adonem de com és d'essencial per a la gestió de qualsevol espècie la comprensió dels seus principis biològics.

En general, fins ara, els programes de gestió pesquera només han tingut en compte aquells principis relacionats amb els caràcters més interessants des del punt de vista de l'explotació, com són, per exemple, l'abundància i la grandària dels individus. Així, aquest camp ha estat dominat pràcticament per l'ecologia i la dinàmica de poblacions.

Ara bé, la principal manera d'explotació pesquera són les captures fetes sobre poblacions naturals, per la qual cosa, el problema més clàssic i bàsic en els programes de gestió pesquera és la identificació dels grups o unitats amb què es treballa. Les espècies tenen una estructura poblacional i s'hi observa, a vegades, l'existència de sub-poblacions més o menys discretes o diferenciades. Espècies marines com el bacallà o l'arengada estan freqüentment dividides en grups amb diferents àrees de posta que poden presentar també diferències morfològiques i ecològiques. No sempre, però, aquestes diferències poden ser associades a l'existència de diferències genètiques entre els diferents

grups poblacionals de l'espècie. D'aquesta manera, els mètodes genètics d'anàlisi poblacional es converteixen en un important instrument per a la gestió pesquera, en permetre identificar la base genètica de les diferències que puguin existir (Pla & García-Marín , 1990).

Exemple clar d'aquesta tendència és l'evolució del concepte d'estoc com a unitat biològica d'importància en la gestió pesquera. Fins ara un estoc es definia per les seves diferències fenotípiques respecte a altres poblacions coespecífiques, a partir de l'examen comparatiu de caràcters morfològics, com el nombre de escates en les sèries laterals o el gruix relatiu del cos. Malgrat que aquests caràcters tenen l'inconvenient de ser altament sensibles a la variació ambiental, actualment es reconeix que aquestes diferències estan acoblades a una diferenciació genotípica i, per tant, poden utilitzar-se marcadors genètics en la caracterització de l'estoc (Allendorf & Utter, 1979).

Per altra part, totes les poblacions de peixos, naturals o de repoblació, que es troben en explotació comercial o esportiva, sofreixen inevitablement canvis en el seu contingut genètic per efecte de la pròpia explotació o per les condicions ambientals. Quan es produeix una disminució en la grandària de la població, hom espera la pèrdua d'informació genètica per efecte de determinats processos genètics que s'originen en la població. Així doncs, el control de la variabilitat genètica present en les poblacions de peixos és també important per assegurar la rendibilitat de la seva explotació.

Per tot això, les tècniques genètiques tenen una important aplicació en programes de gestió pesquera, tant pel que fa a recursos naturals com a

recursos de centres piscícoles (Allendorf, Ryman & Utter, 1987). La caracterització de poblacions per mitjà de marcadors genètics permet la utilització d'aquests marcadors en el control de la variabilitat genètica, necessària d'altra banda per assegurar les possibilitats d'explotació de les poblacions piscícoles. Tanmateix, aquests marcadors poden també ser utilitzats per a la identificació d'estocs comercials que puguin arribar barrejats o per identificar productes pesquers corresponents a espècies diferents i que, freqüentment, arriben catalogats amb el seu nom genèric, amb el perjudici que això representa en el seu valor econòmic (Roldán & Pla, 2000).

Objectius

Qüestions com les plantejades abans i altres de similars tenen resposta a partir del coneixement de l'estructura genètica poblacional d'una espècie i la identificació d'aquells gens que puguin ser usats com a marcadors genètics diferencials, poblacionals o d'espècie, tal i com ha estat descrit amb anterioritat. Així doncs, des del punt de vista de la identificació, són objectius de l'anàlisi genètica:

1. Caracteritzar genèticament una espècie a partir de les àrees que són objecte de mostratge.
2. Inferir l'estructura poblacional d'aquesta espècie des del punt de vista genètic.
3. Verificar l'existència de possibles nous estocs biològics.
4. Catalogar gens que puguin ser usats com a marcadors genètics per a la identificació i autenticació d'una determinada espècie.

Metodologia

El **gen** és la unitat física fonamental de l'herència, i consta d'una seqüència de DNA que conté informació biològica. En un individu, tot caràcter ve determinat, com a mínim, per un parell de gens que ha rebut dels seus progenitors i poden portar informació diferent. Anomenem **genotip** al conjunt de gens que determinen un caràcter. Si els dos gens són diferents diem que el genotip de l'individu per a aquest caràcter és **heterozigot (Aa)**; mentre que parlem de genotip **homozigot** quan els dos gens porten la mateixa informació (**AA** o **aa**). El **fenotip** és la manifestació externa del caràcter i és el resultat de l'acció dels dos gens (el genotip) en relació a l'ambient en què s'hagi desenvolupat aquest caràcter. El Quadre 1 mostra els fenotips que es poden obtenir per a diferents genotips, segons la relació que existeixi entre el parell de gens. Cal fer notar que en cas de dominància d'un gen sobre l'altre un mateix fenotip (**A**) pot ser obtingut de dos genotips diferents (**AA** i **Aa**).

Quadre 1. Manifestació fenotípica d'un caràcter segons la relació que existeix entre els dos gens.

	Genotip	Fenotip
Dominància	AA	A
	Aa	A
	aa	a
Codominància	AA	A
	Aa	Aa
	aa	a

Els mètodes d'anàlisi genètica d'una espècie piscícola poden ser de tipus morfològic o molecular. En l'anàlisi morfològica, els gens que determinen un caràcter han de ser inferits a partir de l'estudi de la seva manifestació externa (el seu fenotip). A conseqüència de l'especial relació genotip-fenotip present en els caràcters morfològics, generalment aquest tipus d'anàlisi només és efectiva quan els caràcters estudiats són de tipus qualitatiu i estan determinats per molt pocs gens. Això deixa fora d'estudi la gran majoria de caràcters morfològics de tipus quantitatiu, siguin mètrics o merístics, freqüentment utilitzats per a descriure i identificar varietats de peixos. En canvi, en l'anàlisi molecular els gens són identificats directament a partir del seu material genètic (DNA) o del producte que originen (proteïnes) sense cap possibilitat d'error.

Actualment, existeixen dues estratègies importants, des del punt de vista metodològic, per a la identificació genètica d'una població o una espècie a escala molecular. La primera es basa en el reconeixement de variants proteïques, generalment enzims, per obtenir una caracterització del DNA que ha determinat la seqüència d'aminoàcids d'aquestes proteïnes; és la tècnica d'electroforesi de proteïnes desenvolupada a partir dels treballs de Lewontin & Hubby (1966) i Harris (1966). La segona consisteix a examinar directament les seqüències del DNA dels gens que volem analitzar. Ambdues estratègies tenen avantatges i inconvenients.

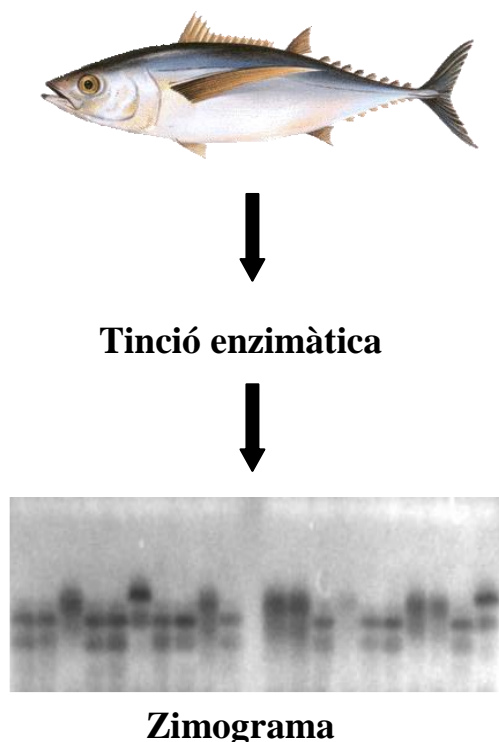
Anàlisi d'enzims: electroforesi de proteïnes

L'electroforesi de proteïnes, el sistema utilitzat pel nostre laboratori en molts estudis d'identificació, ha estat fins ara la tècnica més emprada en la caracterització genètica de nombroses espècies de peixos, car és poc

costosa i permet una bona identificació d'una població quan el nombre de sistemes enzimàtics utilitzats és gran (Pla & García-Marín, 1990). També hi ha la possibilitat de trobar els anomenats "gens diagnòstics", variants electroforètiques d'un determinat enzim, que només es troben en una espècie (o raça, o població) i que, per tant, ens serveixen per a la seva ràpida i inequívoca identificació, sense necessitat d'haver d'analitzar un nombre elevat d'enzims. Aquesta tècnica té en canvi la restricció que les mostres de teixit han de ser fresques i, per tant, han d'haver estat conservades congelades fins al moment de la seva anàlisi.

La Figura 1 mostra l'esquema general de la tècnica d'electroforesi. Bàsicament, la tècnica consisteix en la separació de les diferents variants d'una proteïna a partir del material biològic desitjat (generalment múscul, fetge i cor). El procés es realitza provocant un camp elèctric en un medi de suport (generalment un gel de midó) on s'han col·locat les proteïnes. S'hi deixen migrar les proteïnes durant un cert temps i després es tenyeix amb un producte químic que permet reconèixer específicament l'activitat d'un enzim, de forma que així es pot detectar la seva posició dins del suport. La mobilitat relativa és generalment una funció de la grandària, forma i càrrega elèctrica de la molècula. Si dues proteïnes amb igual funció tenen diferent seqüència d'aminoàcids, probablement tindran diferències en la seva mobilitat electroforètica perquè les diferències en la seqüència provoquen normalment canvis en la grandària o en la càrrega elèctrica. Així, aquestes dues proteïnes apareixeran com dues bandes diferents dins del gel, i s'accepta generalment que cada banda representa un gen diferent corresponent a cada una de les dues variants.

Figura 1. Esquema general d'una electroforesi de proteïnes on es mostra el zimograma de bandes.



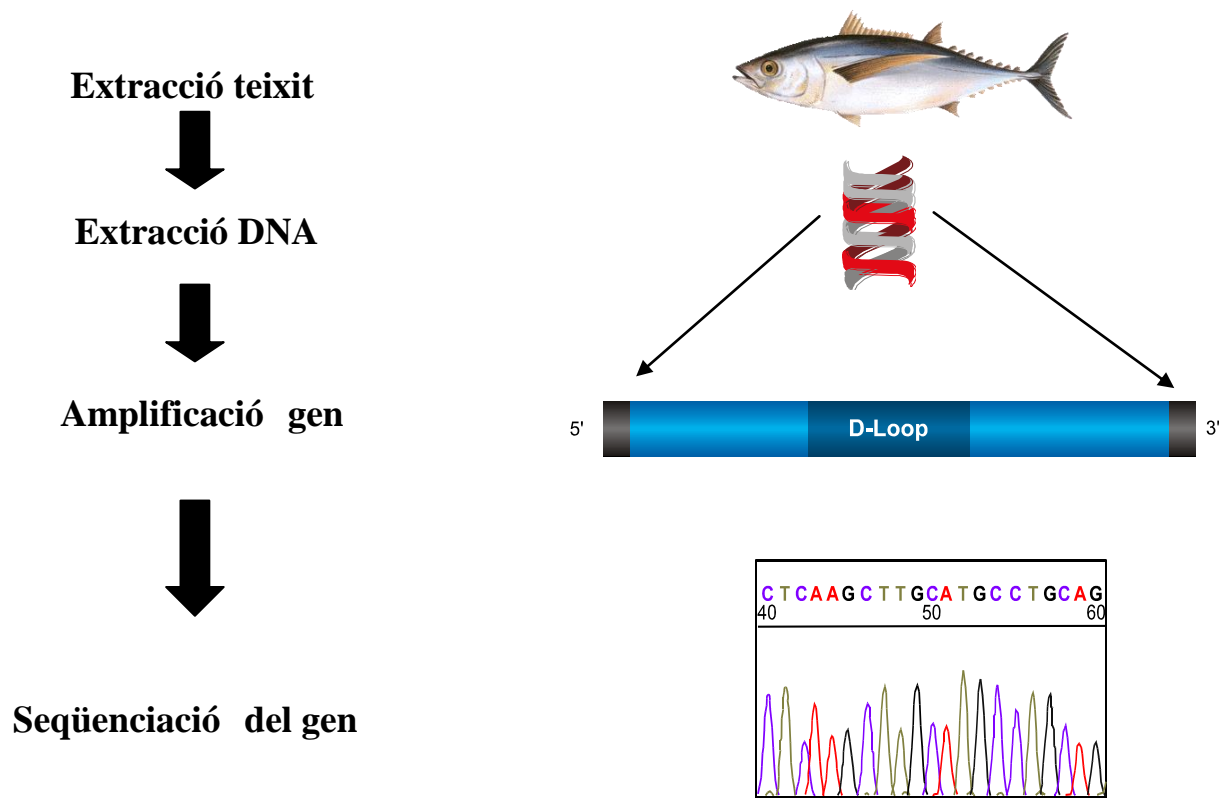
Anàlisi del DNA: seqüenciació de gens

La gran expansió de les tècniques moleculars ha permès la possibilitat d'accedir directament al DNA d'un organisme i analitzar regions concretes del seu material genètic. Una darrera tècnica anomenada PCR (Reacció en Cadena de la Polimerasa), permet l'amplificació ràpida de gens (o fragments) del DNA i la seva posterior seqüenciació. És una tècnica cara però d'utilització molt adequada per resoldre problemes d'identificació d'espècies i varietats comercials, procedents de mostres conservades de les maneres més diverses (seques, congelades, en oli, en formol, etc.) i independent del temps de la seva conservació i del tipus de mostra biològica (teixit cel·lular, escates, espines, dents, etc.).

L'estandardització dels protocols d'aquestes tècniques i la catalogació de marcadors genètics diagnòstics, s'ha traduït en la posta a punt de "kits" específics d'identificació per a moltes espècies d'interès comercial.

La Figura 2 mostra l'esquema general de la metodologia d'anàlisi a partir del DNA d'un organisme. En síntesi, consisteix en l'extracció de DNA a partir de la mostra biològica, l'amplificació ràpida i específica del fragment gènic desitjat, la posterior seqüenciació del fragment i la seva lectura en un aparell automàtic de seqüenciació. El resultat final és l'obtenció de la seqüència de bases del fragment analitzat que pot ser utilitzada directament per a l'objectiu de l'estudi.

Figura 2. Esquema general de la tècnica d'anàlisi del DNA.



Aplicacions pesqueres de l'anàlisi genètica

Pel que fa a la gestió de recursos pesquers, les aplicacions principals de la genètica són tres: identificació de productes pesquers, gestió de pesqueres, i control i millora de la cria de peixos en captivitat.

Identificació comercial de productes pesquers

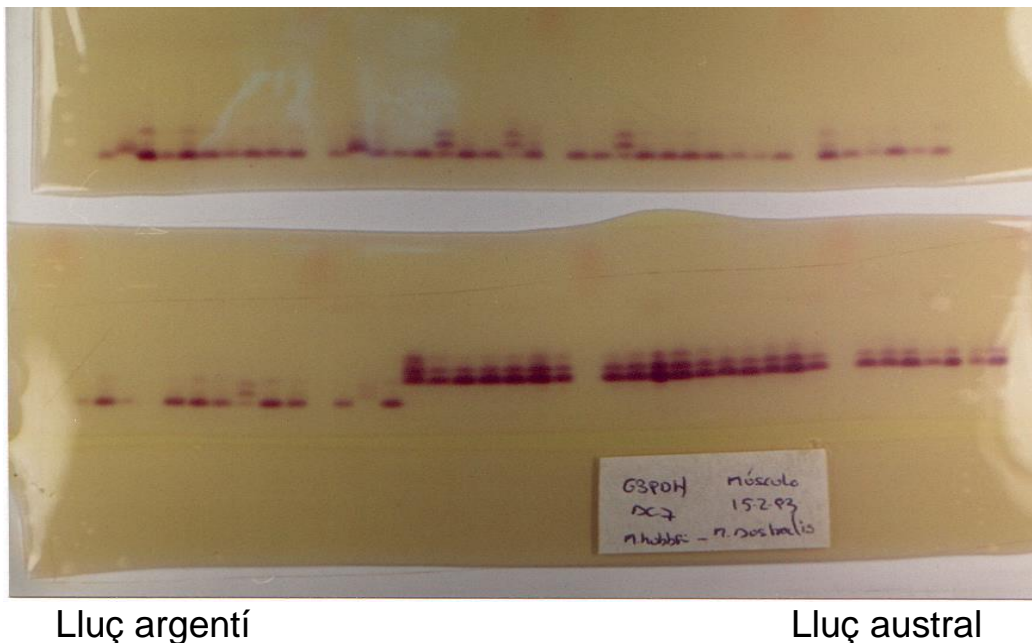
La identificació comercial d'un producte pesquer és de gran utilitat, tant des del punt de vista del consumidor com des del punt de vista del productor. En el primer cas, es garanteix la confiança de la relació comercial pel que fa a la qualitat del producte venut. En el segon cas, es pot obtenir un valor econòmic afegit del producte en autenticar el seu origen. La identificació del producte pesquer pot ser feta tant a productes frescos com a congelats i tant per resoldre problemes d'identificació en l'àmbit d'espècie com d'estocs pesquers.

En productes frescos, la utilitat de la identificació genètica es manifesta quan es treballa amb espècies diferents que presenten una morfologia molt semblant. En productes congelats, o conservats, la identificació genètica és l'única possible pel fet que el processament del producte normalment ha fet desaparèixer els trets externs característics de l'espècie. Davant dos filets de peix processats, hom no pot assegurar la identificació del producte per simple comprovació visual.

La Figura 3 presenta una electroforesi de proteïnes realitzada en mostres de múscul de lluç, per a una identificació entre les espècies de lluç argentí (*Merluccius hubbsi*) i lluç austral (*M. australis*) que conviuen a la

part més austral de l'Atlàntic argentí. La caracterització genètica de cada espècie ha permès catalogar una sèrie de variants gèniques, diferents en cada una, que poden ser usades com a marcadors diagnòstics per a la seva identificació.

Figura 3. Gel d'una electroforesi de proteïnes mostrant el diferent patró de bandes obtingut per a dues espècies de lluç.



D'una manera semblant, l'anàlisi molecular del DNA permet l'obtenció de seqüències de DNA que són específiques per a cada grup d'espècie analitzada. En un estudi realitzat al laboratori en dues espècies de túnids de la Mediterrània, la tonyina i la bacora, s'obtingueren 100 seqüències de l'anàlisi de mostres de múscul. Les seqüències obtingudes, encara que amb petites diferències en cada una, es distribuïren en dos grups ben diferenciats, segons l'espècie origen de la mostra. Aquesta distribució diferencial permet usar l'agrupació de seqüències com a catàleg identificador de cada una de les espècies estudiades. Aquest

catàleg pot ser ampliat a totes les espècies de túnids i ser utilitzat en genètica forènsica per a resoldre problemes d'identificació en mostres de tonyina en conserva.

Gestió de pesqueres

La identificació de productes pesquers en relació a estocs biològics té una clara aplicació a la gestió pesquera, a part de la pròpia importància que té la seva identificació com a estoc des del punt de vista comercial. Des del vessant pesquer, la identificació d'estocs biològics pot ser usada per introduir una gestió diferenciada dels diferents estocs establerts, en mesures de pesca tan importants com poden ser el control de captures i vedes entre altres.

Tanmateix, la identificació d'estocs biològics diferents en una espècie pot ser aplicada també per a una denominació d'origen del producte, que garanteixi unes determinades característiques comercials com pot ser l'origen de la seva captura. Exemples d'aquesta aplicació són les diferenciacions trobades pel nostre laboratori pel que fa al lluç europeu (Mediterrani, versus Atlàntic est); l'anxova mediterrània (golf de Lleó, versus mar d'Alborán), i tonyina (Mediterrani/Atlàntic est, versus Atlàntic oest).

Control i millora de la cria de peixos en captivitat

Pel que fa al conreu de peixos en captivitat, la genètica pot aportar també el seu coneixement per aplicar-lo al control i millora de la cria de

peixos en relació a: (i) escollir reproductors en funció de la seva constitució genètica i l'àrea on està localitzat el centre piscícola; (ii) controlar la variabilitat genètica dels estocs a fi d'evitar-ne la consanguinitat; (iii) conèixer el genoma de l'espècie a conrear per millorar la seva producció.

Referències

ALLENDORF, F. W. & F. M. UTTER. 1979. *Population genetics. A: Fish Physiology*, vol 8. W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett (eds.). Academic Press, N.Y. pp 407-454.

ALLENDORF, F. W.; N. RYMAN & F.M. UTTER. 1987. *Genetics and Fishery Management: Past, present and future. A: Population genetics and fishery management*, N. Ryman & F.M. Utter (eds.). University of Washington Press. Seattle and London. pp 1-19.

EVERHART, W.H. & W.D. YOUNGS. 1981. *Principles of Fishery Science*, 2nd ed. Cornell University Press. Ithaca. NY.

HARRIS, H. 1966. *Enzyme polymorphism in man. Proc. Roy. Soc. B.*, 164:298-310.

LEWONTIN, R.C.& J.L. HUBBY . 1966. *A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural population. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54:595-609.

PLA, C. & J.L. GARCIA-MARIN. 1990. *Utilización de la variabilidad genética en estudios diferenciales de peces. Scientia gerundensis*, vol. 16, Actas del V Congreso Español de Limnología.

ROLDÁN, M.I. & C.PLA. 2000. *Species identification of two sympatric hakes by allozymic markers. Scientia Marina*, 65(1): 81-84.