



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DESARROLLO DE UN MAPA DE LIGAMIENTO BASADO EN  
MICROSATÉLITES EN EL LENGUADO  
SENEGALÉS (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) Y ESTUDIOS DE  
SINTENIA

Tesis doctoral

M<sup>a</sup> Jesús Molina Luzón

Granada, Julio 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: M<sup>a</sup> Jesús Molina Luzón  
D.L.: GR 226-2013  
ISBN: 978-84-9028-307-3

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DESARROLLO DE UN MAPA DE LIGAMIENTO BASADO EN  
MICROSATÉLITES EN EL LENGUADO  
SENEGALÉS (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) Y ESTUDIOS DE  
SINTENIA

Memoria para optar al grado de

Doctor en Biología presentada por:

**M<sup>a</sup> Jesús Molina Luzón**

D. **Roberto de la Herrán Moreno**, Profesor Titular de la Universidad de Granada y  
D. **Rafael Navajas Pérez**, Investigador Ramón y Cajal de la Universidad de Granada.

## **HACEN CONSTAR**

Que la presente memoria con título “**Desarrollo de un mapa de ligamiento basado en microsatélites en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) y estudios de sintenia**” que presenta M<sup>a</sup> **Jesús Molina Luzón** para optar al grdo de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección. Y considerando que representa el trabajo de Tesis Doctoral, autorizan su presentación y defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos expiden y firman la presente autorización en Granada, 28 de Junio de 2012.

**Dr. Roberto de la Herrán Moreno**

**Dr. Rafael Navajas Pérez**

**M<sup>a</sup> Jesús Molina Luzón**

Parte de los resultados que se presentan en esta memoria, han sido enviados para publicar en:

"Validation and comparison of microsatellite markers derived from Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) genomic and expressed sequence tags libraries". María Jesús Molina-Luzón, Jose López, Rafael Navajas-Pérez, Francisca Robles, Carmelo Ruiz-Rejón, Roberto de la Herrán. *Molecular Ecology Resources*, doi: 10.1111/j.1755-0998.2012.03163.

Asimismo, parte de los resultados, han sido presentados en el siguiente congreso:

"Chromosomal manipulation in Senegal sole: obtaining of gynogenetic and triploid offspring". Molina-Luzón MJ, Mora MJ, Navajas-Pérez R, Robles F, Herrera M, Ruiz-Rejón C, de la Herrán R, Navas JL. *Aquaculture Europe 2011*, 18-21 October, Rhodes, Greece.

Este trabajo ha sido financiado por un Proyecto de Excelencia del Ministerio de Ciencia e Investigación (AGL2009-11872), por el Proyecto Ingenio Consolider AQUAGENOMICS (CSD2007-00002) y por el Proyecto PLEUROGENE (Pleurogene-Flatfish Genomics: Enhancing Commercial Culture Of Atlantic Halibut and Senegal Solea) a través de Fundación GENOMA –ESPAÑA (Ministerio de Economía y Competitividad; el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; el Ministerio de Industria, Energía y Turismo; el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y la Junta de Andalucía).

## RESUMEN

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) es una especie de pez plano de gran interés para la industria acuícola, debido a su gran demanda y gracias a su rápido desarrollo larvario y las altas tasas de crecimiento de los juveniles. En la actualidad, se cultiva a lo largo de las costas del sur de España y Portugal y su producción aumenta todos los años considerablemente. Hasta ahora, las investigaciones en el cultivo del lenguado se han centrado en áreas como la alimentación y las patologías. Sin embargo, se dispone de muy pocos datos genéticos, y falta información de aspectos de gran interés como son la estructura genética y diversidad de las poblaciones tanto cultivadas como naturales. Estos estudios genéticos permitirían la aplicación de programas de selección, con los que se optimizarían los recursos acuícolas y se podrían mejorar y aumentar su producción.

Con este trabajo, se pretende avanzar en estos aspectos, mediante el desarrollo del primer mapa de ligamiento en el lenguado, que entre otras características, permite la localización de genes relacionados con caracteres cuantitativos (QTLs) de interés económico y la selección asistida por marcadores (MAS). Para ello, se requiere de un número alto de marcadores moleculares que cubran el genoma y de familias adecuadas que permitan el seguimiento de la segregación alélica. Los marcadores empleados en este trabajo han sido los microsatélites, que han demostrado ser muy útiles para la construcción de estos mapas. Los microsatélites se han caracterizado de librerías genómicas realizadas a partir de ADN de *S. senegalensis*, de una base de secuencias ESTs de esta especie, previamente desarrolladas por otros autores y, por último, pertenecientes a otras especies de peces planos. Finalmente hemos dispuesto de un total de 144 microsatélites para el análisis de ligamiento.

Las técnicas de manipulación cromosómica para la inducción de ginogénesis, necesaria para la obtención de las familias de referencia, se llevaron a cabo en el Centro del IFAPA Agua del Pino (Huelva) a partir de ejemplares en él cultivados. De esta forma, se consiguieron dos familias ginogenéticas haploides, para la distribución de microsatélites en los grupos de ligamiento, y una ginogenética diploide, para la localización del centrómero.

El mapa consenso resultante está representado por 27 grupos de ligamiento en los que se distribuyen 129 marcadores microsatélites, abarcando un tamaño aproximado de 1004cM. Estos marcadores se distribuyen con una media de 4.7 por grupo de ligamiento. Adicionalmente, existe 15 marcadores que no han podido ser agrupados (no ligados).

Las secuencias de los marcadores (regiones flanqueantes y motivos repetidos) han sido enviadas a la base de datos de GenBank para conocer su anotación y clasificación según términos GO.

Además, a partir de las secuencias microsatélites desarrolladas en esta memoria, se ha realizado estudios evolutivos basados en la homología de estas secuencias. Así, se han comparado con bases de datos de ESTs de otros peces planos como el rodaballo (6.170 secuencias), la platija (13.869 secuencias) y el halibut (20.886 secuencias) para analizar su grado de conservación en estas especies y poder hacer inferencias filogenéticas.

Por último, las homología de estas secuencias con genomas de especies modelo de peces como espinoso (32), tetraodon (29), medaka (32), fugu (38) y danio (21) han servido para hacer estudios de sintenia con estas especies modelos y con peces planos.

## Tabla de contenidos

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
I.1. El lenguado senegalés.....	10
I.1.1. Cultivo del lenguado senegalés .....	11
I.1.2. Genética del lenguado senegalés .....	12
I.2. Marcadores moleculares .....	14
I.2.1. Marcadores Microsatélites (SSRs) .....	16
I.3. Mapas de ligamiento.....	17
I.4. Construcción de mapas de ligamiento .....	19
I.4.2. Poblaciones de referencia. Familias ginogenéticas .....	19
I.4.3. Análisis de ligamiento .....	21
I.4.4. Localización de marcadores con respecto al centrómero .....	23
I.5. Conservación y sintenia.....	24
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
III.1. Material biológico .....	29
III.2. Aislamiento y optimización de microsatélites .....	29
III.2.1. Caracterización de microsatélites a partir de genotecas .....	29
III.2.2. Caracterización de microsatélites a partir de la base de datos de ESTs.....	31
III.2.3. Microsatélites descritos en el lenguado por otros autores .....	31
III.2.4. Microsatélites de otros peces planos.....	31
III.2.5. Puesta a punto de los microsatélites.....	31
III.3. Análisis de la variabilidad de los microsatélites .....	32
III.4. Obtención de las familias de referencia .....	32
III.4.1. Obtención de las progenies ginogenéticas haploides y diploides .....	32
III.4.2. Confirmación de la ginogénesis.....	33
III.4.3. Extracción de ADN genómico .....	33
III.5. Construcción del mapa de ligamiento.....	34
III.5.1. Análisis de los microsatélites en las familias ginogenéticas haploides .....	34
III.5.2. Análisis de ligamiento.....	34
III.5.3. Análisis de los microsatélites en la familia ginogenética diploide .....	36
III.5.4. Estimación de la distancia microsatélite-centrómero .....	36
III.6. Análisis de la conservación de los microsatélites .....	36
III.6.1. Búsqueda de anotaciones .....	36
III.6.2. Búsqueda de terminos GO .....	37
III.6.3. Localización en regiones traducidas y en regiones UTRs .....	37
III.6.4. Estudio de la homología y conservación en otros peces planos .....	37
III.7. Estudios de sintenia.....	38
III.7.1. Sintenia con especies modelo de peces.....	38
III.7.2. Sintenia con otras especies de peces planos .....	38
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
IV.1. Desarrollo de marcadores moleculares .....	41
IV.1.1. Aislamiento y optimización de microsatélites .....	41
IV.2. Obtención de las familias de referencia.....	44
IV.2.1 Creación de las familias ginogeneticas haploides y diploides.....	44

IV.2.2. Verificación de la ginogenesis.....	44
IV.3. Desarrollo del mapa de ligamiento.....	46
IV.3.1. Análisis de ligamiento de la 1ª familia haploide.....	46
IV.3.2. Analisis de ligamiento de la 2ª familia haploide.....	47
IV.3.3. Construcción del mapa consenso.....	47
IV.3.4. Localización del centrómero.....	52
IV.4. Estudios evolutivos. Análisis de conservación y sintenia.....	53
IV.4.1. Anotación, asignación de términos GO y zonas UTRs.....	54
IV.4.2. Conservación de las secuencias de microsatélites de lenguado en otras especies de peces planos.....	55
IV.4.3. Estudios de sintenia.....	58
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
V.1. Desarrollo de marcadores microsatélites.....	69
V.1.1. Genotecas enriquecidas.....	69
V.1.2. Microsatélites en ESTs.....	70
V.1.3. Amplificación cruzada.....	71
V.1.4. Análisis de la variabilidad.....	72
V.2. Obtencion y empleo de familias ginogenéticas.....	73
V.3. Mapa de ligamiento.....	74
V.4. Estimás de distancia con respecto al centrómero.....	75
V.5. Estudios evolutivos. Análisis de conservación y sintenia.....	76
V.5.1. Anotación, clasificación y zonas UTRs.....	76
V.5.2. Conservación y evolución de los microsatélites.....	77
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>84</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>102</b>
ANEXO I.....	103
ANEXO II.....	103
ANEXO III.....	105
ANEXO IV.....	106
ANEXO V.....	107
ANEXO VI.....	107
ANEXO VII.....	109
ANEXO VIII.....	111
ANEXO IX.....	115
ANEXO X.....	118
ANEXO XI.....	119
ANEXO XII.....	123
ANEXO XIII.....	124
<b>IX. ABREVIATURAS.....</b>	<b>125</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**

---

Los peces planos (Orden Pleuronectiformes), por sus características morfológicas y biológicas, representan un grupo muy interesante dentro de los peces. Para comenzar, podemos destacar que su origen no está bien establecido datándose, posiblemente, en el Eoceno (Lauder y Liem, 1983; Vernau y col., 1994). Asimismo, existe mucha controversia en las relaciones filogenéticas entre sus taxones siendo, todavía hoy en día, muy discutidas (Pardo y col., 2005).

La característica morfológica más representativa de este grupo de peces es su asimetría corporal (Nelson, 2006), que se produce por metamorfosis en las primeras etapas del desarrollo larvario. Este llamativo rasgo, distintivo de este grupo de peces, forma parte importante de la historia de la teoría evolutiva ya que fue una de las características propuestas, entre otras, por George Mivart en 1871 en su libro “*On the Genesis of Species*”, como objeción a la teoría evolutiva por selección natural, propuesta por Darwin, debido a la ausencia de pruebas de etapas intermedias entre estas dos morfologías. Darwin tuvo muy en cuenta las objeciones de Mivart, a quien respondió en las últimas ediciones de “*The Origins of Species*”.

A parte de la importancia de estas especies, desde el punto de vista evolutivo, muchas de ellas presentan un gran interés económico y comercial, debido a la gran calidad de su carne, siendo explotadas extensivamente mediante su pesca desde la antigüedad y desarrollándose una industria acuícola alrededor de ellas cada vez más importante (Cañavate, 2005).

## I.1. El lenguado senegalés

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858), es un pez teleósteo perteneciente al orden Pleuronectiformes de la familia *Soleidae* que comprende 28 géneros y más de 100 especies (**Tabla 1**).

---

Superclase Gnatostomados ( <i>Gnathostomata</i> )
Clase Osteictios ( <i>Osteichthyes</i> )
Subclase Actinopterygios ( <i>Actinopterygii</i> )
Infraclase Actinopteros ( <i>Actinopteri</i> )
Superdivisión Neopterygios ( <i>Neopterygii</i> )
División Halecóstomos ( <i>Halecostomi</i> )
Subdivisión Teleósteos ( <i>Teleostei</i> )
Orden <b>Pleuronectiformes</b> ( <i>Pleuronectiformes</i> )
Familia Soleidos ( <i>Soleidae</i> )
Género <b><i>Solea</i></b>
Especie <b><i>senegalensis</i></b>

---

**Tabla 1:** Posición sistemática del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).

Al igual que otros peces planos, el lenguado se caracteriza por tener un cuerpo aplanado y asimétrico pues, aunque estos peces nacen con simetría bilateral, ésta se va perdiendo durante el desarrollo y la maduración (Moyle y col., 1996). De esta forma, los adultos, presentan una serie de características como un cuerpo plano (de ahí que sean conocidos como peces planos), los dos ojos en el costado superior, aletas sin radios espiniformes, aleta caudal homocerca (formada por dos lóbulos iguales, no siendo

prolongación de la columna vertebral) presentando el costado superior pigmentado y el inferior, sobre el cual se apoyan, sin pigmento (**Figura 1**).



**Figura 1:** Fotografía de la parte dorsal de un individuo adulto de *Solea senegalensis* (obtenida de <http://www.pleurogene.ca>).

Su forma de vida es marina y bentónica sobre fondos arenosos, pudiendo llegar a una profundidad de hasta 100 metros. El desove tiene lugar entre los meses de Enero y Marzo cuando la temperatura del agua oscila entre 13°C y 23°C (Anguis y col., 2005). Las larvas, planctónicas y con simetría bilateral, son arrastradas hacia la costa y a partir del undécimo día de vida inician la metamorfosis asimétrica característica. Una vez finalizada ésta, migran hacia fondos arenosos. La madurez sexual la adquieren aproximadamente a los tres años y su tamaño varía de 30-35 cm de longitud (Person Le Ruyet y col., 1989). No presentan dimorfismo sexual, pero los machos suelen ser de menor tamaño y crecen más lentamente. Se alimentan de pequeños crustáceos, poliquetos y moluscos bivalvos (Desoutter, 1990; Arellano y Sarasquete, 2005).

Esta especie se distribuye por las costas occidentales atlánticas de África y Europa llegando al Mediterráneo Occidental. En el Atlántico se extiende desde el norte de Senegal hasta la región de Pertuis-Charentais en Francia y en el Mediterráneo a lo largo de las costas de España, Golfo de León y norte de Túnez (CIESM, 2002).

### **I.1.1. Cultivo del lenguado senegalés**

El lenguado senegalés es una de las especies más prometedoras en la acuicultura española, pendiente de su despegue definitivo. En 2010 se produjeron 204 toneladas, un 8,5% más que en 2009, localizadas principalmente en Galicia, Canarias y Andalucía (Apromar, 2010). La irrupción de esta especie en la acuicultura ha sido debida fundamentalmente a dos características biológicas como son: su rápido desarrollo larvario y una alta tasa de crecimiento. Ambas características han favorecido al desarrollo de investigaciones centradas en la reproducción en cautividad y en las técnicas para la producción de alevines en criadero. Los primeros estudios sobre la biología del lenguado, orientadas a estos aspectos, tuvieron lugar en los años ochenta en el Golfo de Cádiz (Rodríguez, 1984) y en el estuario del río Tajo, Portugal (Dinis, 1986). En los noventa, estos estudios se basaron en la revisión de los diferentes tipos de cultivos, las ventajas e inconvenientes y la necesidad de optimizarlos (Vázquez y col., 1995; Flos y col., 1995; Rodríguez y col., 1995; Dinis y col., 1996). Desde entonces, y hasta la actualidad, se han centrado en aspectos como la fisiología y la reproducción (Ribeiro y col., 1999; García-

López y col., 2005; Cabrita y col., 2006; Agulleiro, 2008), la alimentación a base de piensos, que permite obtener ejemplares con un peso comercial en un año de cultivo (Dinis y col., 1999; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Olmedo y col., 2003; Rodríguez y Souto, 2003) y desarrollar individuos sanos gracias a una correcta composición de los mismos (Day y col., 1999; Aragão y col., 2004; Engrola y col., 2004; M. Sáenz de Rodrigáñez y col., 2005 y Borges y col., 2009) y la influencia de factores como la temperatura y la salinidad del agua (Dinis y col., 1999; Fernández-Díaz y col., 2001; Anguis y Cañavate 2005; Arjona y col., 2007; Salas- Leiton y col., 2008).

Sin embargo, aunque el cultivo del lenguado senegalés se encuentra en auge, no está exento de problemas. Las principales dificultades con las que se enfrentan tanto los centros de investigación como las empresas productoras son, entre otras:

1.- Durante la reproducción en cautividad, en algunos casos, hay ausencia de puestas o huevos inviables, debido principalmente a una escasa producción y/o mala calidad de esperma.

2.- En el desarrollo larvario, en ocasiones, aparecen problemas tales como malformaciones en la columna vertebral durante la metamorfosis, una incorrecta pigmentación, migración incorrecta del ojo y anomalías mandibulares (Soares y col., 2001; Gavaia y col., 2002; Aritaki y Seikai, 2004; Villalta y col., 2005). Estas malformaciones, no sólo inciden en la viabilidad de los ejemplares, sino en el mal aspecto para su venta.

3.- Para una correcta nutrición, tanto de larvas como de adultos, se requiere unos conocimientos en nutrición para la formulación de piensos. El destete (paso de alimento vivo a inerte) es un periodo crítico para las larvas, pudiéndose producir tasas de mortalidad altas (Dinis y col., 1999) y en los adultos el estrés causado por una incorrecta manipulación (Costas y col., 2011).

4.- Falta de respuesta inmunitaria que evite infecciones como pasteurelisis, vibriosis, mixobacteriosis y enfermedades virales (Zorrilla y col., 2003; Prat, 2003; Arijó y col., 2005; Díaz-Rosales y col., 2009).

5.- Limitados conocimientos en cuanto a las características genéticas de esta especie.

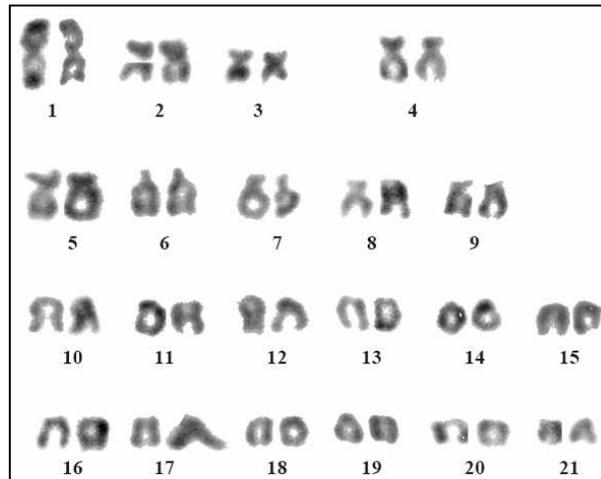
Aunque en relación con este último punto los avances en genómica y proteómica que se han producido en los últimos años en el estudio del lenguado senegalés, han contribuido a mejorar el conocimiento de su biología y su cultivo con el fin de reducir la problemática planteada.

### **I.1.2. Genética del lenguado senegalés**

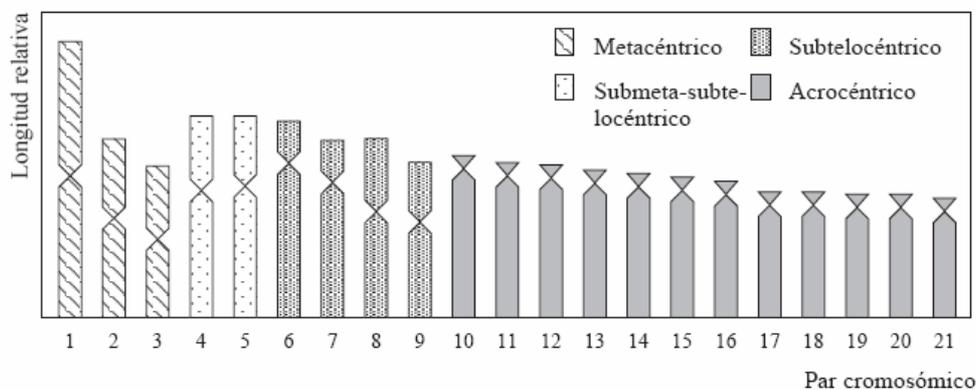
Los estudios genéticos realizados hasta ahora en el lenguado cubren diversos aspectos, tales como: el análisis citogenético, análisis de la expresión génica, el desarrollo de marcadores moleculares y la manipulación cromosómica, todos ellos enfocados al avance en su mejora genética y cultivo.

A pesar de que los estudios citogenéticos en peces planos son escasos, debido al tamaño reducido de sus cromosomas y a que poseen el menor contenido de ADN entre los teleósteos (Bouza, Sánchez y Martínez, 1994), en el lenguado senegalés Vega y col., (2002) estudiaron su cariotipo y observaron que está compuesto por 42 cromosomas con 60 brazos cromosómicos. En cuanto a la forma de las parejas cromosómicas, posee 3 parejas

metacéntricas, 2 parejas submeta-subtelocéntricas, 4 parejas subtelocéntricas y, por último, 12 pares cromosómicos acrocéntricos. Esto evidencia un cariotipo con rango amplio de variación en el tamaño y la forma de sus cromosomas. Además, encontraron cierto polimorfismo en cuanto al número de cromosomas y brazos cromosómicos. Estos polimorfismos indican que las reordenaciones cromosómica han podido desempeñar un importante papel en la evolución cromosómica de esta especie (Vega y col., 2002) (**Figuras 2 y 3**).



**Figura 2:** Cariotipo de *Solea senegalensis*, representado por 21 pares de cromosomas (Vega y col., 2002).



**Figura 3:** Idiograma de *Solea senegalensis* (Vega y col., 2002).

Asimismo, se han realizado estudios citogenéticos para la localización de los genes ribosómicos de esta especie, encontrándose que los genes 45S y 5S se co-localizan en el brazo corto de un par cromosómico submetacéntrico mediano, aunque el 5S presenta un locus adicional en otro par cromosómico de morfología acrocéntrica y de tamaño pequeño y en posición centromérica (Cross y col., 2006; Manchado y col., 2006).

En cuanto al análisis de la expresión génica se están llevando a cabo estudios de la expresión de genes implicados en los diferentes estadios del lenguado: larva, juvenil y adulto de diversas proteínas tales como el del gen que codifica la keratina cuya expresión varía

dependiendo de la concentración de sal en el agua (Infante y col., 2011), el de la lisozima en las infecciones bacterianas que pueda sufrir el lenguado (Fernández -Trujillo y col., 2008; Ponce y col., 2011) y el de las hormonas gonadotropinas, implicadas en el desove, entre los reproductores naturales y los cultivados (Guzmán y col., 2010). Por último, en este aspecto, podemos destacar el desarrollo de una plataforma bioinformática denominada *Soleamold*, basada en secuencias ESTs y microarrays (Cerdá y col., 2008) e impulsada por el proyecto de investigación Pleurogene para la mejora genética del lenguado.

Otros estudios genéticos realizados en el lenguado son los basados en el desarrollo de marcadores moleculares de ADN, de ARN y proteínicos (proteínas e isoenzimas) para el análisis de variabilidad. Aunque más adelante se profundizará en este tema, los marcadores genéticos son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético, siendo una herramienta esencial en la identificación de genes de interés, análisis de diversidad y estructura genética de poblaciones de cultivo y naturales y en el estudio comparativo, evolutivo y filogenéticos de estas especies. Así, se puede destacar el desarrollo de marcadores de microsátelites en el lenguado (Funes y col., 2004; Porta y col., 2004; Chen y col., 2008; Castro y col., 2006 y Molina-Luzón y col., in press) y su aplicación en la identificación de reproductores y en un test de paternidad (Porta y col., 2006a, 2006b; de la Herrán y col., 2008). También es destacable el desarrollo marcadores mitocondriales e isoenzimáticos y su posterior caracterización en diferentes poblaciones de lenguado (Vega y col., 2002; Manchado y col., 2006), así como los realizados entre poblaciones de halibut y de lenguado basados en las secuencias de las proteínas ribosómicas 60s y su expresión, considerándose como genes ortólogos y útiles en el estudio de la evolución de los Pleuronectiformes (Matsuoka y col., 2008) o los realizados en la proteína calsecuestrina considerada como un marcador filogenético, detectándose cuatro copias de su mismo gen en el genoma del lenguado haciendo evidente la duplicación de genes en Teleosteos (Infante y col., 2011).

Por último en cuanto a las técnicas de manipulación cromosómica, éstas se aplican en acuicultura para la obtención de individuos con tallas superiores a la media y en la producción de líneas monosexo (ginogenéticos y androgenéticos). Desde un punto de vista genético, estas técnicas se utilizan para diferentes fines como son: el establecimiento de la determinación sexual, el desarrollo de poblaciones *todohembras* o la construcción de mapas genéticos y el análisis de regiones específicas del genoma (Danzmann y Gharbi, 2001; Zimmerman y col., 2004; Fortes y col., 2004, 2008). Así, en el lenguado se han aplicado para la obtención de individuos ginogenéticos haploides, ginogenéticos diploides y triploides (de la Herrán y col., 2008; Molina-Luzón y col., 2011). Como se ha comentado, estas poblaciones modificadas cromosómicamente son muy útiles en programas de mejora genética, siendo una de sus principales aplicaciones la de su utilización para la construcción de mapas genéticos basados en marcadores moleculares, siendo éste, el principal objetivo del presente trabajo.

## **I.2. Marcadores moleculares**

Desde la prehistoria, el hombre ha seleccionado y mejorado especies vegetales, animales y microbianas basándose en el fenotipo. La mejora genética era posible gracias a la existencia de variabilidad fenotípica, sin embargo, con este método quedaban muchos aspectos sin conocer como: cuántos son los genes implicados en la expresión de un carácter, la localización de estos genes y su función fisiológica.

Es a partir de 1970 cuando se comienzan a desarrollar los denominados marcadores moleculares. Éstos están ayudando a eliminar los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, y permiten la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y reproducible.

Los primeros marcadores desarrollados se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen. Pero esta técnica tenía una limitación muy importante: no era capaz de detectar suficiente grado de polimorfismo que permitiera llevar a cabo cualquier intento de mapeo del genoma de una especie.

Es con el desarrollo de la genética molecular, y sobre todo con la aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a mediados de los años ochenta, cuando se produce un desarrollo explosivo en la puesta a punto de numerosos marcadores moleculares pero ya basados en la secuencia de ADN. Estos marcadores presentan una serie de ventajas como la de detectar un mayor grado de polimorfismo, no estar influenciados por factores ambientales y ser neutrales (Ajmone-Marsan y col., 2001).

Los principales marcadores moleculares de ADN que actualmente se utilizan en estudios genéticos son:

- a) **RFLPs** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) obtenidos mediante enzimas de restricción y técnicas de hibridación de ADN.
- b) **RAPDs** (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) obtenidos mediante amplificación por PCR con cebadores inespecíficos.
- c) **SSRs o microsatélites** (*Simple Sequence Repeat*) obtenidos amplificación por PCR con cebadores específicos.
- d) **AFLPs** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) se consideran una combinación de RFLPs y RAPDs generados por enzimas de restricción y con cebadores inespecíficos.
- e) **SNPs** (*Single Nucleotid Polymorphism*) generados por enzimas de restricción y con cebadores específicos.

La siguiente tabla resume las propiedades básicas de los marcadores moleculares mencionados:

<b>Marcador</b>	<b>Información de secuencia <i>a priori</i></b>	<b>Tipo de herencia</b>	<b>Locus investigado</b>	<b>Polimorfismo</b>
RFLP	Sí	Mendeliana-Codominante	Único	Bajo
RAPD	No	Mendeliana-Dominante	Múltiple	Intermedio
SSR	Sí	Mendeliana-Codominante	Único	Alto
AFLP	No	Mendeliana-Dominante	Múltiple	Alto
SNP	Sí	Mendeliana-Codominante	Único	Alto

**Tabla 2:** Tipos de marcadores y sus principales características (Modificado de Fortes, 2008).

Además, dependiendo de la secuencia de ADN, estos marcadores se pueden clasificar en dos grupos: tipo I o asociados a genes de función conocida y tipo II o asociados a secuencias anónimas de los que *a priori* se desconoce su función. Con los avances tecnológicos en secuenciación masiva, se están creando bases de datos de secuencias expresadas (bibliotecas de ESTs) para gran cantidad de especies, que son generadas a partir de ADNc. Los marcadores que se desarrollan a partir de estas secuencias (tipo I) son muy útiles en los estudios evolutivos, al presentar un alto grado de conservación en las regiones

de codificación y dan información sobre los genes implicados en diversos mecanismos fisiológicos (Cerdá y col., 2008).

En general, la importancia de estos marcadores en cuanto a procesos de mejora radica en que su utilización es fundamental para:

- i) conocer la variabilidad genética y estructura de una población en programas de mejora.
- ii) establecer las relaciones de parentesco para un manejo óptimo de *stocks*, evitando así problemas derivados de la consanguinidad.
- iii) desarrollo de mapas de ligamiento y posterior detección de QTLs (loci de caracteres cuantitativos), que son grupos de genes que contribuyen a la variación cuantitativa de algún carácter como el tamaño o resistencia a enfermedades y
- iv) desarrollo de programas de selección mediante mapas genéticos, lo que permitiría el seguimiento del patrón de herencia del marcador con el carácter que se desea mejorar. La integración de los QTLs en programas de mejora tipo MAS (Selección Asistida por Marcadores) optimiza la selección de reproductores con el carácter a mejorar vinculado al marcador.

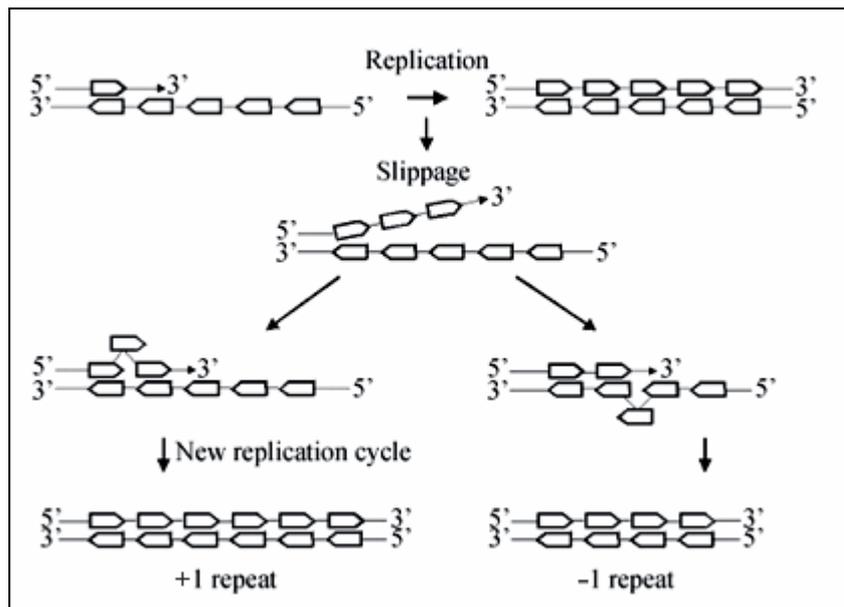
Concretamente, uno de los marcadores más utilizados para los estudios mencionados son los microsatélites o SSRs, debido principalmente a tres de sus características: su elevado grado de polimorfismo, la codominancia que presentan y su sencilla amplificación.

### **I.2.1. Marcadores Microsatélites (SSRs)**

Los microsatélites (SSRs) son secuencias cortas de ADN, formadas por repeticiones de una secuencia simple que puede variar en tamaño desde 2-6 pares de bases (pb) y que se encuentran distribuidas por todo el genoma de los organismos eucariotas (Tautz, 1989) y de algunos procariotas (Zane y col., 2002).

Las regiones flanqueantes de los microsatélites son secuencias únicas, aportando especificidad al microsatélite (Weber y col., 1989). En cambio, las secuencias microsatélites presentan un alto grado de polimorfismo debido a las variaciones en el número de repeticiones del motivo que lo caracteriza (Tautz y col., 1984; Weber, 1990).

El origen de este polimorfismo previsiblemente se deba a un “deslizamiento” (*slipagge*) durante la replicación del ADN (Schlötterer y col., 1992) en el que ya sea la cadena molde o la cadena codificante se desliza sobre la alternativa en al menos un motivo apareándose incorrectamente durante la replicación (Moxon y Willis, 1999) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Origen del polimorfismo en microsatélites mediante “slippage” (Modificado de Goldsteind y Schlotterer, 1999).

Otras posibles causas del polimorfismo en los microsatélites son las mutaciones tales como deleciones o inserciones, ya sea en el mismo microsatélite alterando su tamaño, o en las regiones flanqueantes, alterando el número de alelos del microsatélite como consecuencia de la formación de alelos nulos.

Los microsatélites presentan características que los hacen especialmente interesantes como marcadores genéticos:

1) son muy abundantes y uniformemente dispersos por el genoma, lo que permite disponer de gran número de ellos.

2) muestran niveles muy altos de variabilidad, lo que permite llegar a la caracterización inequívoca del individuo (Freire, 2005).

3) son marcadores codominantes (alelos detectables tanto en homocigotos como en heterocigotos) que se heredan de forma mendeliana, lo que les hace muy informativos en estudios de pedigrís (O’connell y Wright, 1997).

4) su análisis se realiza mediante la técnica de PCR, que es muy sensible y requiere cantidades mínimas de muestra, que además, se pueden obtener con técnicas no lesivas para el individuo y que no afectan a su supervivencia (Borrell, 2002).

5) son potencialmente transferibles entre especies próximas (Young y col., 1998), especialmente cuando el locus microsatélite se encuentra dentro de una secuencia génica (Pardo y col., 2005).

Por todo ello los microsatélites son ampliamente utilizados en la realización de mapas de ligamiento que abarcan estudios funcionales, estructurales y evolutivos del genoma.

### I.3. Mapas de ligamiento

Un mapa de ligamiento representa de una forma esquemática la localización y la distancia genética de un grupo de genes y/o marcadores moleculares formando los llamados

grupos de ligamiento (LGs). La distancia genética entre marcadores se calcula mediante su frecuencia de recombinación y es relativa, ya que algunos fenómenos como la interferencia e incluso la proximidad al centrómero afecta a la recombinación, por lo que varía según la zona del genoma en la que se encuentren los marcadores (Young 1998; Hartl y Jones 1998).

Un mapa de ligamiento constituye una de las principales herramientas genéticas que permiten: a) la identificación de genes relacionados con caracteres cuantitativos; b) analizar el comportamiento de los cromosomas y sus interacciones durante las divisiones celulares (Sakamoto y col., 2000); c) obtener información del tamaño del genoma y d) estudios evolutivos mediante la comparación de mapas entre especies relacionadas (Williams y col., 1998).

En la última década se han desarrollado mapas genéticos de un gran número de especies de interés acuícola basados en marcadores moleculares como los microsatélites, como por ejemplo, en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, la dorada, *Sparus aurata*, la lubina, *Dicentrarchus labrax*, y dentro de los peces planos, el rodaballo, *Scophthalmus maximus*, la platija japonesa, *Paralichthys olivaceus*, el halibut, *Hippoglossus hippoglossus* y el tongue solea (*Cynoglossus semilaevis*) (Tabla 3).

Espece	Nº marcadores	Autores
Rodaballo	463	Bouza y col.,2012
Platija japonesa	1.268	Castaño-Sánchez y col.,2010
Trucha arco iris	1.124	Rexroad y col.,2008
Platija japonesa	211	Kang y col.,2008
Rodaballo	242	Bouza y col.,2007
Halibut Atlántico	258	Reid y col.,2007
Dorada	288	Franch y col.,2006
Dorada	204	Senger y col.,2006
Lubina	162	Chistiakov y col.,2005
Lubina	111	Coimbra y col.,2003

**Tabla 3:** Mapas genéticos construidos para algunas especies de interés acuícola.

La utilidad de estos mapas de ligamiento se ha puesto de manifiesto en estudios basados entre otros, en la identificación y seguimiento de genes de interés económico mediante QTLs. Recientemente, un estudio realizado en la trucha arco iris mediante el genotipado de marcadores microsatélites y AFLPs ha permitido identificar tres regiones en los grupos de ligamiento 3, 8 y 23 relacionadas con el número de ciegos pilóricos, carácter involucrado en el crecimiento (Zimmerman y col., 2005). En el salmón atlántico (*Salmo salar*) se han detectado QTLs ligados con caracteres tales como la resistencia a ISA (anemia infecciosa), peso corporal y porcentaje de lípidos (Moen y col., 2004; Reid y col., 2005; Derayat y col., 2007). En la lubina (*Lates calcarifer*) se han detectado 5 QTLs relacionados con el peso y longitud corporal (Wang y col., 2006). Más recientemente, en el rodaballo se han detectado 3 QTLs relacionados con la resistencia y supervivencia frente a infecciones con *Aeromonas salmonicida* y siete QTLs frente al protozoo *Philasterides dicentrarchi* (Pardo y col. 2008; Millán 2010; Rodríguez-Ramilo y col., 2011) así como las regiones cromosómicas próximas al gen responsable de la diferenciación sexual en esta misma especie, y que se encuentran en el extremo del grupo de ligamiento 5 (Martínez y col., 2009).

## I.4. Construcción de mapas de ligamiento

### I.4.1. Base genética de un mapa de ligamiento

Al inicio del siglo pasado y redescubiertas las leyes de Mendel, Bateson y Punnett en el guisante dulce, y más tarde Morgan y Sturtevant en la mosca del vinagre, comprobaron que el patrón de herencia de dos caracteres se apartaba de la tercera ley de Mendel o principio de transmisión independiente de los caracteres. Al realizar cruzamientos de prueba entre hembras dihíbridas y machos homocigóticos recesivos obtuvieron unas proporciones alélicas diferentes a las esperadas 1:1:1:1. Observaron que las combinaciones alélicas parentales aparecían con mayor frecuencia que las no parentales (recombinantes), asumiendo que los caracteres que presentaban estos patrones de herencia se debían a genes localizados en el mismo cromosoma, es decir, ligados y tendían a transmitirse juntos.

Durante la meiosis I, concretamente en la profase, los cromosomas homólogos materno y paterno se emparejan e intercambian segmentos de sus cromátidas por entrecruzamiento, este fenómeno explicaría las combinaciones génicas menos frecuentes. Además, los dos genes ligados de un individuo dihíbrido pueden presentarse en cualquiera de sus dos configuraciones básicas, *cis* cuando ambos alelos dominantes se encuentran en el mismo cromosoma homólogo (fase de acoplamiento) y *trans*, cuando se encuentran en diferente homólogo (fase de repulsión).

El entrecruzamiento es un fenómeno que ocurre de forma aleatoria y la probabilidad de que ocurra en cualquier posición a lo largo del cromosoma es la misma, por lo que dos genes que se encuentren próximos serán separados por entrecruzamiento con menor frecuencia que dos que están más alejados. La frecuencia de que ocurra un entrecruzamiento entre dos genes es directamente proporcional a la distancia entre ambos.

Morgan propuso que las frecuencias de recombinación entre los alelos de los genes constituyen una herramienta muy útil para determinar el orden de los genes dentro del cromosoma y a partir de ellas estimar la distancia entre los mismos. Así, los genes cuya frecuencia de recombinación es menor a 50% se encuentran en el mismo cromosoma o ligados, y los que tienen una frecuencia de recombinación igual o mayor a 50% presentan una segregación independiente y se consideran no ligados. La distancia entre dos genes se conoce como unidad de mapa o centimorgan (cM).

En 1913, Sturtevant consideró a los cromosomas como entidades lineales y fue el primero en estimar la localización de tres genes a partir de su frecuencia de recombinación y ser representados en un mapa genético.

### I.4.2. Poblaciones de referencia. Familias ginogenéticas

La población que se utiliza en el desarrollo de un mapa genético de cualquier especie se conoce como población de mapeo o de referencia, y es obtenida mediante cruces experimentales. En la mayoría de cruces realizados para el análisis de ligamiento de marcadores, se requiere una identificación parental y la obtención de sucesivas generaciones, lo que se traduce en tiempo invertido y costes. Los avances en las técnicas de manipulación cromosómica en peces han permitido obtener familias androgenéticas y/o ginogenéticas, tanto haploides como diploides, que facilitan los análisis de ligamiento al obtener la información aportada por los marcadores en una única generación.

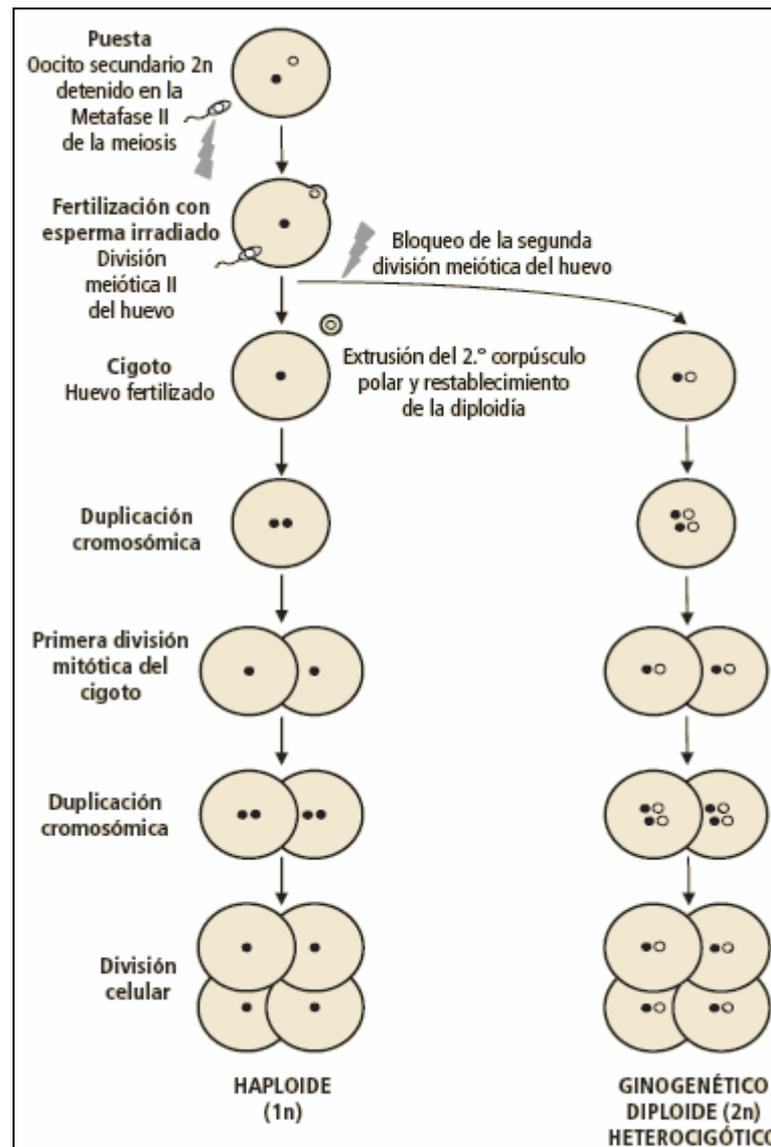
En este sentido, se distinguen entre líneas haploides ginogenéticas o androgenéticas cuando sólo existe una dotación cromosómica, siendo su procedencia de la madre, en el

primer caso y del padre, en el segundo. También podemos hablar de ginogenéticos diploides o androgenéticos diploides cuando nos referimos a individuos diploides pero cuyas dos dotaciones cromosómicas proceden de un solo progenitor, materno y paterno, respectivamente.

En peces, la manipulación cromosómica es relativamente sencilla y los individuos, en muchos casos, son viables. De hecho, es posible manipular su reproducción fundamentalmente mediante el manejo de los conjuntos cromosómicos. Esto ha permitido la obtención de diversas líneas de individuos de gran interés en acuicultura como son los propios ginogenéticos, los poliploides (triploides o tetraploides) o las poblaciones monosexo. Concretamente, los peces ginogenéticos tanto diploides como haploides han sido utilizados ampliamente para la de realización de mapas genéticos, para la determinación del sexo heterogamético y para obtener poblaciones todo-hembras o todo-machos.

El uso de estos individuos en el desarrollo de mapas genéticos es de gran interés, ya que con los haploides se obtiene la distribución de marcadores en los diferentes grupos de ligamiento, y con los diploides se posiciona el centrómero, en relación a los marcadores, en dichos grupos de ligamiento. Además, el hecho de que en las familias ginogenéticas haploides, sólo uno de los alelos de la hembra segregue en la descendencia, facilita el análisis de ligamiento. Los mapas consolidados que integran diferentes familias y marcadores constituyen una importante herramienta en el cartografiado de una especie (Sewell y col., 1999).

Las progenies ginogenéticas haploides, son obtenidas mediante la fertilización de huevos con esperma inactivado usando radiaciones (principalmente de luz ultravioleta) o tratamientos químicos. Para la obtención de los ginogenéticos diploides, el primer tratamiento es seguido de un choque térmico con el que se evita la expulsión del segundo corpúsculo polar, obteniéndose huevos ginogenéticos diploides heterocigotos (**Figura 5**).



**Figura 5:** Representación de la obtención de individuos ginogéneticos haploides y diploides (Modificado de Piferrer, Felip y Cal, 2009).

En peces planos se han obtenido ginogéneticos en rodaballo (Piferrer y col., 2004; Cal y col., 2006; Bouza y col., 2007), platija (Tabata y col., 1991; Yamamoto, 1999), halibut (Tvedt y col., 2006) y, recientemente, lenguado (de la Herrán y col., 2008; Molina-Luzón y col., 2011) para el desarrollo de sus respectivos mapas de ligamiento.

### I.4.3. Análisis de ligamiento

Para la construcción de un mapa de ligamiento basado en marcadores moleculares se sigue de forma ordenada y lógica una serie de pasos realizados por programas informáticos que, aplicando análisis matemáticos, permiten: 1º) el análisis de segregación de cada locus, 2º) la detección de ligamiento entre dos locus, 3º) estimación de las frecuencias de recombinación y distancia genética, 4º) la obtención de grupos de ligamiento y, por último

5º) la ordenación de cada locus dentro de cada grupo de ligamiento (López y Moncada, 2005).

En la actualidad, se dispone de diversos programas informáticos que difieren en los parámetros a analizar: tipo de población, algoritmos de estimación de frecuencias. Entre ellos podemos destacar algunos representados en la siguiente tabla.

Software	Aplicación	Referencia
CRI-MAP	Analiza marcadores codominantes en familias pequeñas, se ha extendido a pedigrís más generales y a sistemas de dominancia simple	Goldgar y col., 1989
JOINMAP	Todo tipo de poblaciones. Calcula las frecuencias de recombinación por pares y las distancias por puntuación LOD.	Stam, 1993; Stam y van Ooijen, 1995; VanOoijeny Voorrips, 2001
MAPMAKER	Herramienta de análisis multipunto. Cálculo de puntuación LOD. Analiza datos con muchos loci en pedigrís pequeños y en cruces entre líneas controladas.	Lander y col., 1987
MAP-MANAGER QTX	Cartografía loci mendelianos de retrocruzamiento, líneas consanguíneas recombinantes o cruzamientos entre líneas	Manly y col., 2001

**Tabla 4:** Programas de análisis de ligamiento (Modificado de Fortes, 2008).

El primer paso es la comprobación de que las frecuencias de recombinación de los alelos obtenidas se ajustan al tipo de segregación mendeliana según el cruce parental realizado. Por ejemplo, en un retrocruzamiento, los genotipos heterocigotos y homocigotos para cada marcador deben encontrarse en proporción 1:1 en la progenie, de esta forma, se seleccionarán aquellos marcadores que mejor se ajusten a las proporciones esperadas.

A continuación, para el cálculo de la distancia entre dos marcadores, se utiliza el método de máxima verosimilitud mediante puntuaciones LOD (logaritmo de *odds*) que compara las frecuencias de recombinación bajo dos hipótesis, la de transmisión independiente (hipótesis nula) cuya frecuencia de recombinación es del 50% y la de transmisión con presencia de ligamiento y cuya frecuencia de recombinación tendría valor  $\geq 0$  (Morton, 1995b; Ott, 1999). Si el resultado es mayor que un valor predeterminado, se considera un grado de ligamiento entre los marcadores. Por convención un valor de LOD igual a 3 representa una evidencia de 1000:1 a favor del ligamiento en un umbral de significación de  $p \leq 0.05$  (Strachan y Read, 1999). Cuanto más cercanos se encuentren dos marcadores, más alta será la puntuación LOD resultante (Ott, 1999). Así, bajo este criterio, los marcadores disponibles, se van agrupando y obteniéndose representaciones que minimizan las distancias y que se corresponden con los llamados grupos de ligamiento.

Una vez obtenidos los grupos de ligamiento, se recalcula la distancia entre los pares de marcadores de cada grupo, obteniéndose la posición lineal de ellos dentro de cada grupo de ligamiento. Llegados a este punto, en el análisis simultáneo de varias frecuencias de recombinación para el cálculo de las distancias, ha de tenerse en cuenta el efecto de la

interferencia, ya que los sucesos de recombinación no ocurren de forma independiente. Para corregir dicho efecto se aplican, las funciones de mapa que son ecuaciones matemáticas que relacionan el valor de las frecuencias de recombinación observada con la distancia de mapa corregida para los entrecruzamientos múltiples. Cada grado de interferencia ( $i$ ) se ajusta a una función de mapa diferente. Cuando la interferencia es completa ( $i=1$ ) la función de mapa es simple, es decir, la distancia de mapa ( $d$ ) se corresponde, directamente, con el valor de la frecuencia de recombinación ( $r$ ) y se conoce como función de Morgan (1928):  $d = r$ . Esta función se suele utilizar en caso de disponer de un número elevado de marcadores y estrechamente ligados, que no superasen los 50 cM. Cuando la interferencia se considera nula ( $i=0$ ) y entre los marcadores hay dobles entrecruzamientos, la función de mapa que se aplica, en este caso, es la de Haldane (1919):  $d = -\ln(1-2r)$ . Por último, considerando las situaciones intermedias ( $0 < i < 1$ ) es la función de Kosambi la que se suele aplicar. Esta función considera una disminución lineal de la interferencia a medida que aumenta la distancia de mapa ( $i = 1 - 2r$ ), por lo que  $d = \frac{1}{4} \ln \frac{1+2r}{1-2r}$ . Por lo general, se aplican las funciones de Haldane y Kosambi, convirtiendo las frecuencias de recombinación en distancias génicas aditivas.

#### I.4.4. Localización de marcadores con respecto al centrómero

La posición del centrómero constituye un paso importante en el desarrollo de un mapa de ligamiento ya que los múltiples entrecruzamientos que ocurren en los brazos cromosómicos entre los marcadores dificultan a veces su localización exacta. Sin embargo, los marcadores se pueden situar respecto a su centrómero mediante el análisis de medias tétradas (Thorgaard y col., 1983; Guyomard y col., 2006), utilizando una familia ginogenética diploide como ya se ha comentado.

Se sabe que la recombinación es menor en regiones próximas al centrómero y es máxima en los telómeros (Sakamoto y col., 2000; Danzman y Gharbi, 2001), por tanto si consideramos varios marcadores heterocigotos en la hembra los que den mayor descendencia homocigota procederán de la falta de recombinación con el centrómero situándose próximos a él, y segregarán en la primera división meiótica en cambio los marcadores con descendencia heterocigota proceden del entrecruzamiento con el centrómero situándose a una mayor distancia y segregarán en la segunda división meiótica. Cada marcador se analiza de forma individual y el resultado es más fiable a medida que la distancia entre marcador y centrómero disminuya, evitando así los entrecruzamientos múltiples (Danzmann y Gharbi, 2001; Ji y col., 2009).

Para cada marcador, la proporción de heterocigotos con respecto al total ( $y$ ), corresponde con la frecuencia de recombinación, a partir de la cual se calcula la distancia del marcador al centrómero ( $y/2$ ) y en la que sólo se tiene en cuenta la mitad de las cromátidas, como resultado se obtiene la distancia genética expresada en cM. Además, se deben aplicar las funciones de mapa dependiendo del grado de interferencia que se considere en cada caso.

En peces, debido al pequeño tamaño de los cromosomas, apenas tienen lugar entrecruzamientos múltiples, traduciéndose en un alto grado de interferencia, por lo que en muchos estudios se aplica la función de mapa con interferencia completa, pero esto no implica que haya interferencia completa, es decir, que puede tener lugar más de un entrecruzamiento (Bouza y Martínez, 2009). Aún así, en estudios realizados en rodaballo se ha observado que el ajuste de la distancia al centrómero variaba en cada grupo de ligamiento según la función de mapa aplicada (Martínez y col., 2008).

Por tanto, la falta de estudios en peces que detallen el patrón de entrecruzamientos en torno a los centrómeros lleva a elegir aquellos marcadores que no muestran heterocigotos en la descendencia, como los más óptimos para estimar la distancia al centrómero (Kauffman y col., 1995; Mohideen y col., 2000).

## I.5. Conservación y sintenia

Los avances en investigación genómica han permitido, en los últimos años, secuenciar genomas completos de varias especies de peces como: fugu (*Takifugu rubripes*; Aparicio y col., 2002) pez cebra (*Danio rerio*; Barbazuk y col., 2000), pez globo (*Tetraodon nigroviridis*; Jaillon y col., 2004), espinoso (*Gasterosteus aculeatus*; Jones y col., 2012) y medaka (*Oryzias latipes*; Kasahara y col., 2007; Ahsan y col., 2008). Estas especies se utilizan como modelos en estudios de genética comparada y evolutiva ya que, la falta de genomas secuenciados en especies de interés acuícola las hacen herramientas imprescindibles para este tipo de análisis (Sarropoulou y col., 2008).

De esta forma, mediante la búsqueda de homología entre secuencias de las especies de interés y las especies modelo, se puede conocer el grado de conservación que presentan y comparar las regiones de una especie poco estudiada con otra modelo. Esto permite obtener información adicional de los posibles genes existentes en estas regiones y si se mantiene el orden de las secuencias génicas en cada una de las especies (sintenia).

Para estos estudios comparativos con genomas de especies modelo, uno de los primeros pasos consiste en la selección de los marcadores que van a ser utilizados en las comparaciones. En este sentido, las regiones flanqueantes de los microsatélites asociados a genes (SSR-EST) suelen encontrarse más conservadas entre especies que otras regiones del genoma, por lo que son muy útiles en estudios de genómica comparada. Así lo demuestran, por ejemplo, los estudios basados en la comparación de estas regiones en tilapia (*Oreochromis spp*; Lee y col., 2005) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*; Rexroad y col., 2005) con el genoma de tetraodon, o los realizados por Sarropoulou y col., 2008 en dorada (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*), o en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) por Bouza y col., 2012, sobre cuatro especies modelo de peces. En todos ellos, se caracterizó un importante número de regiones conservadas. Concretamente, entre rodaballo y las especies modelo, los porcentajes de regiones homólogas totales obtenidos al comparar las regiones flanqueantes de los microsatélites fueron aproximadamente del 54% con espinoso, 40% con tetraodon, fugu y medaka y 20% con el pez cebra. Estos resultados son, a su vez, coincidentes con la filogenia de estas especies, ya que el rodaballo está más relacionado con las cuatro primeras, pertenecientes a los *Acantopterigios*, que con el pez cebra, dentro de los *Ostariofisios* (Miya y col., 2003; Bouza y col., 2012).

Adicionalmente, el poder asociar diferentes secuencias de marcadores de un mismo grupo de ligamiento de una especie de interés a un cromosoma concreto de las especies modelo, permite relacionar ambos, pudiendo realizar estudios sinténicos y de evolución cariotípica. Así, por ejemplo Franch y col., 2006 y en Chistiakov y col., 2008 han relacionado los grupos de ligamiento de la dorada y de la lubina respectivamente con los cromosomas de la especie modelo tales como espinoso, tetraodon, medaka, fugu y danio. Concretamente en peces planos estos mismos estudios se han realizado en rodaballo (Bouza y col., 2012) utilizando como referencia las mismas especies modelo y en platija (Castaño-Sánchez y col., 2010) y halibut (Reid y col., 2007) con la especie modelo tetraodon.

Otra ventaja, de la conservación de las secuencias entre especies próximas, es la posibilidad de realizar amplificación cruzada empleando los mismos cebadores en la obtención de marcadores polimórficos. Por ejemplo, en Salmónidos la conservación de

dichas regiones se ha confirmado con los estudios realizados en géneros como *Salvelinus*, *Salmo* y *Hucho* (Angers y col., 1997) y en Pleuronectiformes, se han realizado amplificaciones en platija y halibut a partir de cebadores de rodaballo, demostrando cierta conservación de estas regiones (Iyengar y col., 2000). Estos marcadores compartidos y presentes en mapas genéticos de diferentes especies nos permiten relacionar los grupos de ligamiento de esas especies. En este sentido, en peces planos, Reid y col., (2007) estudiaron las relaciones entre halibut y platija, mediante los marcadores comunes de ambas especies.

Por último, cuando no se tienen marcadores comunes en mapas de ligamiento de varias especies, se pueden utilizar las asociaciones entre grupos de ligamiento de las especies de interés con los cromosomas concretos de las especies modelo. Así, y para peces planos, Cerdá y col., (2010) establecieron correspondencia entre los grupos de ligamiento de rodaballo y halibut mediante los cromosomas del tetraodon como nexo de unión, considerando por ejemplo, que el grupo de ligamiento LG6 de rodaballo se corresponde con el grupo de ligamiento LG3 del halibut, porque ambos, comparten marcadores con el cromosoma 13 de tetraodon.

Conforme el número de mapas de ligamiento y de genomas secuenciados aumente, se podrá profundizar en los estudios de sintenia de los principales genes ortólogos de las especies de peces así como el nivel de conservación, llegando a conocer las reorganizaciones cromosómicas que se han dado a lo largo de la evolución y entendiendo así su gran complejidad (Schoen, 2000; Danzmann y Gharbi, 2001).

## **II. OBJETIVOS**

---

En este trabajo se pretende contribuir al conocimiento genético de una especie de pez plano de interés acuícola como es el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Para ello, el principal objetivo propuesto en este trabajo es la **obtención del primer mapa de ligamiento** en esta especie. Para llevar a cabo este objetivo son necesarias las siguientes premisas:

1. Desarrollar marcadores moleculares microsatélites a partir de diferentes orígenes tales como librerías genómicas y base de datos de ESTs en lenguado.
2. Obtener familias ginogenéticas, tanto haploides como diploides, mediante técnicas de manipulación cromosómica para su empleo como familias de referencia.
3. Analizar las relaciones de ligamiento entre los marcadores microsatélites en las familias de referencia para llevar a cabo la construcción del primer mapa de ligamiento en el lenguado senegalés.
4. A partir de la comparación de las secuencias de los marcadores microsatélites desarrollados y utilizando la información genómica existente para otras especies de peces, estudiar la evolución del genoma de lenguado, mediante estudios de conservación y sintenia, en relación a otras especies de peces planos y especies modelo de peces.

**III. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### III.1. Material biológico

El material biológico empleado a lo largo de este trabajo procede de un stock de 46 individuos adultos de lenguado mantenido en el IFAPA Centro Agua del Pino de la Junta de Andalucía en Cartaya (Huelva) y obtenidos a partir de poblaciones naturales de las costas de Huelva. Estos ejemplares se usaron para generar las diferentes familias ginogenéticas. Su procedencia, su estadio, el número de ejemplares y la técnica para la que fueron utilizados se resume en la **Tabla 5**:

ORIGEN	ESTADÍO	Nº INDIVIDUOS	APLICACION
Stock de reproductores salvaje	Adultos	8	Construcción de genotecas
		8	Optimización microsátélites
		38	Variabilidad
		4	Parentales familias haploides
		2	Parentales familia diploide
1ª Familia gino haploide	Embriones	112	1º Mapa haploide
2ª Familia gino-haploide	Embriones	98	2º Mapa haploide
Familia gino-diploide	Larvas	70	Distancia al centrómero

*Tabla 5: Clasificación de los individuos utilizados en la realización de esta tesis.*

### III.2. Aislamiento y optimización de microsátélites

Los marcadores de microsátélites, utilizados en esta tesis, tienen cuatro orígenes diferentes: de genotecas de ADN genómico enriquecidas con microsátélites, de una base de datos de ESTs, de bibliografía previamente descrita en el lenguado y por último, de otras especies de peces planos.

#### III.2.1. Caracterización de microsátélites a partir de genotecas

El aislamiento y caracterización de los microsátélites se llevó a cabo mediante la construcción de genotecas enriquecidas con distintos motivos de repetición: b(ACA)<sub>15</sub> y b(CT)<sub>30</sub>, de forma individual y una combinación formada por: b(AGA)<sub>10</sub>, b(GCC)<sub>10</sub> y b(GT)<sub>30</sub>. Para ello, se utilizaron muestras de sangre de 8 ejemplares de lenguado (ver **Tabla 6**). Tras la extracción sanguínea realizada en las instalaciones del IFAPA, las muestras se conservaron con anticoagulante (EDTA) y se trasladaron al laboratorio de Genética de la Universidad de Granada, donde se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

<b>L1-E27C-11- M</b>	L6-E390-12-M	L3-EE34-13-H	B7-E6E9-07- M
L1-E94C-02- H	L6-C725-10-H *	L3-ED25-01- H	B7-EC1E-12- H
L1-EABE-05- H**	L6-C620-09-H	L3-DFC7-03- M *	B7-0B8E-15- M
L1-ECEC-08-H *	L6-D7CO-01-H *	<b>L3-CF83-36- M (1)</b>	B7-8CDE-03-H
L2-C945-12- M*	L6-A1C7-04-H	L3-E952-09- H	<b>B7-EFED-M (2)</b>
L2-A365-20- H	L6-E390-05- M**	L3-EBE4-07- H	B7- 1247-16- H
L2-C192-13- M *	L6-C4D1-08- M	<b>L3-E945-11- H</b>	B7-8B1E- 06-H
<b>L2-DD53-19- H (1)</b>	L6-9ACC-40- H	L4-DFD6-23- H**	B7-16EB- 40-H
L2-EBFF-05- M**	B7-EA7F-01- H	L4-1309-28- M	B7-EFB8-21- M**
L3-EB97-09- H	B7-EB83-05- H**	<b>L4-65347- H (2)</b>	B7-F907- 17- H
L3-E5C1-10- H**	B7-F243-08- M	L4-11F2-31- H *	B7-14E3- 41-H
L3-EE75-12- H**	B7-E79C-02- M *	-----	-----

**Tabla 6:** Códigos de los 46 individuos adultos utilizados en los distintos análisis de este trabajo: con asterisco, los individuos utilizados en la extracción de sangre para la construcción de genotecas, con doble asterisco, los individuos utilizados en la optimización de los microsatélites, para el estudio de la variabilidad se emplearon todos ellos excepto los utilizados en las genotecas. En rojo, los reproductores seleccionados para formar las familias ginogenéticas haploides (H: hembra; M: macho (1): 1ª familia (2): 2ª familia) y en negrita, los reproductores seleccionados para formar la familia ginogenética diploide. Todos estos ejemplares eran mantenidos en el Centro Agua del Pino (IFAPA) que la Consejería de Agricultura y Pesca posee en Cartaya (Huelva).

El método de extracción de ADN a partir de sangre se realizó siguiendo el protocolo que recomienda la casa comercial Macherey-Nagel para el kit Nucleo Spin® Blood (**Anexo I**). La cantidad y calidad del ADN genómico obtenido se determinó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 1 mM) con marcador de peso molecular conocido (1 Kb Plus DNA ladder).

Extraído el ADN de los individuos, se procedió al desarrollo de 3 genotecas enriquecidas siguiendo el protocolo de Reddy y col., (2001) con algunas modificaciones (**Anexo II**). Los clones con inserto fueron secuenciados, con el fin de caracterizar tanto el motivo repetido como las secuencias flanqueantes de los microsatélites y así poder diseñar los cebadores para su amplificación. Las reacciones de secuenciación se realizaron según el método de Sanger y col., (1977), utilizando el kit comercial ABI Prism BigDie Terminator v.3.1 (Applied Biosystems) basado en el uso de terminadores fluorescentes. Las dos cadenas de los plásmidos se secuenciaron utilizando el secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) (**Anexo IIIa y IIIb**).

Para cada microsatélite se diseñaron sus correspondientes cebadores (directo y reverso) usando el programa Primer 3 disponible en <http://frodo.wi.mit.edu/primer3> (Rozen y Skaletsky, 2000). Los parámetros para el diseño de los cebadores se orientaron para la obtención de productos de entre 100 a 300pb (pares de bases) de rango, con un tamaño de cebador entre 20-25pb y temperaturas de amplificación entre 55 y 62 °C.

### III.2.2. Caracterización de microsátélites a partir de la base de datos de ESTs

Durante el desarrollo del proyecto Pleurogene, subvencionado por Genoma España-Canadá, se creó una base de datos de ESTs del lenguado senegalés (<http://www.pleurogene.ca>). Esta base de datos está formada por 5.208 secuencias a partir de las cuales, se rastrearon y seleccionaron aquellas que tenían repeticiones de microsátélites. Los criterios de selección fueron, tanto la calidad de las regiones flanqueantes como el grado de polimorfismo de las repeticiones. Así, se escogieron las secuencias que tenían microsátélites a partir de 4 repeticiones, para los dinucleótidos y de 3 repeticiones, para los trinucleótidos y tetranucleótidos. Los cebadores para la amplificación de estos microsátélites seleccionados se diseñaron de igual forma que en el apartado anterior (**III.2.1.**).

### III.2.3. Microsátélites descritos en el lenguado por otros autores

Se han utilizado 20 microsátélites previamente desarrollados en el lenguado con el fin de aumentar la resolución del mapa. Estos microsátélites proceden de trabajos realizados por Porta y col., (2004) y Funes y col., (2004). Sus características se muestran en el **Anexo VI**.

### III.2.4. Microsátélites de otros peces planos

Por último, se han analizado algunos microsátélites diseñados para otras especies de peces planos, como el rodaballo (Coughlan y col., 1996 y Navajas-Perez 2012), la platija (Coimbra y col., 2001, 2003, Castaño-Sánchez y col., 2010) y el halibut (Reid y col., 2007). La selección de estos microsátélites, para ser probados en el lenguado, se basó en tres criterios: la variabilidad que presentaban en sus respectivas especies (eligiendo los de mayor número de alelos), la localización en sus respectivos mapas (eligiendo grupos de marcadores que se encontraban ligados) y, por último, la conservación que presentaban (escogiendo los ya habían sido probados en más de una especie de pez plano y por tanto presentaban amplificación cruzada, y aquellos cuyas secuencias flanqueantes se habían encontrado conservados en varias bases de datos de peces planos). Las características de los microsátélites seleccionados se describen en el **Anexo VII**.

### III.2.5. Puesta a punto de los microsátélites

Todos los microsátélites (excepto los ya obtenidos en lenguado por otros autores) se optimizaron sus reacciones de amplificación mediante PCR en 8 individuos adultos (**Tabla 6**). Las condiciones de PCR de cada microsátélite se pusieron a punto en un termociclador de gradiente térmico (MyCycler Biorad), permitiendo testar diferentes temperaturas con diferentes concentraciones de cloruro de magnesio (ver **Anexo IIIc**).

Las PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% en TBE 0.5X (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 1 mM) con marcador de peso molecular conocido (1 Kb Plus DNA ladder). En aquellos microsátélites donde los resultados de amplificación no fueron claros, se reajustaron los parámetros hasta conseguir un amplificado observable en el gel de agarosa como una banda discreta. Una vez puesto a punto, en algunos casos, y con el fin de realizar

PCR multiplex, se seleccionaron sets (5-6 microsatélites) teniendo en cuenta su temperatura de amplificación y su rango alélico y se marcaron los cebadores reversos con diferentes fluorocromos (HEX<sup>TM</sup>, 6-FAM<sup>TM</sup> VIC<sup>TM</sup> o NED<sup>TM</sup>) para que pudieran ser detectados conjuntamente en una sola reacción de amplificación y en una sola carrera de secuenciación.

Todos los productos de amplificación obtenidos a partir de este punto, se corrieron a través de electroforesis capilar en un secuenciador ABI 3100 Avant (Applied Biosystems). Estos capilares son de cristal de silicio y son rellenados de un polímero especial (POP4) que permite la migración de la muestra hasta un láser de argón que excita al fluorocromo del cebador. Los tamaños de los fragmentos amplificados se muestran como un perfil de picos que es comparado con un marcador de peso molecular, Gene Scan<sup>TM</sup> 500 LIZ<sup>TM</sup> Size Standard (Applied Biosystems) y calculados en datos numéricos (pares de bases) por el programa GENMAPPER (Applied Biosystems) en función del tiempo de migración y al tamaño conocido del marcador. De esta forma, se determinaron los tamaños de los fragmentos (correspondientes a los alelos) que oscilaron entre 60 y 650 pb.

### **III.3. Análisis de la variabilidad de los microsatélites**

Para determinar, tanto el número de alelos como el rango del tamaño alélico de cada microsatélite, se llevaron a cabo reacciones sencillas de PCR y PCRmultiplex para un número variable de entre 18 y 38 individuos (**Tabla 6**).

A partir de los genotipos obtenidos en estos individuos adultos, para cada microsatélite se determinaron, mediante el programa CERVUS 3.0 (Kalinowski y col., 2006), los siguientes parámetros: heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), test de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), frecuencia de alelos nulos (FAN) y el indicador de polimorfismo (PIC).

### **III.4. Obtención de las familias de referencia**

#### **III.4.1. Obtención de las progenies ginogenéticas haploides y diploides**

Para la realización de este primer mapa genético en el lenguado, se han utilizado tres familias de referencia, dos de ginogenéticos haploides, para el análisis de la segregación alélica de los marcadores y establecer así los grupos de ligamiento, y una familia de ginogenéticos diploides, que permite posicionar los marcadores con respecto al centrómero. Todas estas familias fueron generadas mediante diferentes experimentos de fecundación artificial y manipulaciones cromosómicas realizados en el Centro IFAPA Agua del Pino, en donde también se llevó a cabo la incubación de los huevos y, en algunos casos, la cría larvaria.

El procedimiento seguido para la obtención de estas familias es similar al descrito en el rodaballo por Cal y col. (2002). Se seleccionaron a aquellos individuos, machos y hembras, que presentaban inflamación en la zona abdominal, indicando una gónada madura y la disponibilidad para el apareamiento. Al macho se le masajea la zona genital suavemente y, con una jeringa cargada de agua de mar estéril, se le extrae el esperma. Para comprobar la

calidad y movilidad del esperma, bajo lupa, se observaron los espermatozoides, escogiéndose aquella muestra que presentaba un mayor número de ellos y un alto grado de movilidad. El esperma seleccionado se diluye en solución Ringer (1:100) para inmovilizar a los espermatozoides y se mantiene en hielo. A continuación se le somete a radiación ultravioleta ( $32 \text{ milijulios/cm}^2$ ) durante 6 minutos en una placa Petri con hielo y así, eliminar su carga genética. Al esperma irradiado se le añade agua de mar estéril para activar la movilidad de los espermatozoides y se mezcla con los huevos de la hembra donadora (obtenidos también por masaje abdominal y conservados en recipiente estéril hasta la fecundación artificial). Tras 16-24 horas, las larvas resultantes corresponden con individuos ginogenéticos haploides, con un solo juego de cromosomas, procedente de la madre.

Para la obtención de las larvas ginogenéticas diploides, a los huevos fecundados con el esperma irradiado del paso anterior, se les somete a un choque térmico frío ( $0-1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durante 25 minutos, reteniendo la salida del 2º corpúsculo polar e impidiendo la segunda división meiótica. De esta forma, las larvas que se obtienen son ginogenéticas diploides cuyos dos juegos de cromosomas son de origen materno.

#### III.4.2. Confirmación de la ginogénesis

Para comprobar que las anteriores técnicas empleadas para la obtención de ginogenéticos se habían realizado con éxito, se llevó a cabo un análisis citogenético para la confirmación de la dotación cromosómica en las larvas. En el caso de ginogenéticos haploides, presentan un solo juego de cromosomas ( $2n=21$ ) y dos juegos cromosómicos las larvas ginogenéticas diploides ( $2n=42$ ). El protocolo seguido para el análisis del cariotipo fue, el llevado a cabo por Garrido-Ramos (1994) con modificaciones y se describe en el **Anexo V**.

Además, a través de la amplificación de dos microsátélites, en los parentales utilizados y en veinte larvas de cada familia, se verificaron las condiciones ginogenéticas haploides y diploides de las respectivas familias. El método para extraer el material genético de estas muestras se detalla en el siguiente apartado y las condiciones de amplificación de estos microsátélites mediante PCR se detallan en el **Anexo IIIc**.

#### III.4.3. Extracción de ADN genómico

En adultos, la extracción del ADN se realizó a partir de tejido muscular. En el caso de larvas ginogenéticas diploides, a partir del individuo completo, dado su escaso tamaño. En ambos casos, se realizó siguiendo el método descrito por Sambrook y Russell (1989) con algunas modificaciones (**Anexo IVa**).

Este protocolo no pudo ser utilizado para la extracción de ADN de los individuos ginogenéticos haploides, de los que sólo se tenían embriones sin eclosionar (ya que las larvas son inviábiles). En este caso, los embriones se sometieron directamente a la amplificación de su ADN genómico mediante el kit de Genomi Phi<sup>TM</sup> (Amershan Bioscience). Este kit utiliza la enzima polimerasa del bacteriófago Phi29 y su amplificación se basa en el emparejamiento aleatorio de cebadores a lo largo del ADN, iniciando la replicación en numerosos sitios a la vez. El protocolo seguido fue el recomendado por el fabricante (Amershan Bioscience) con algunas modificaciones (**Anexo IVb**).

La calidad y cantidad de ADN obtenido, tanto de adultos como de larvas y embriones, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (ver apartado **III.2.1**). A partir de cada

muestra se prepararon alícuotas de 25 ng/μL en un volumen total de 100 μL para ser utilizadas en las reacciones de amplificación por PCR.

### III.5. Construcción del mapa de ligamiento

#### III.5.1. Análisis de los microsatélites en las familias ginogenéticas haploides

Los microsatélites disponibles se amplificaron en la hembra L2-DD53-19-H, utilizada para la creación de una de las familias de ginogenéticos haploides (familia FH1). Aquellos marcadores que resultaron ser heterocigotos en esta hembra, se amplificaron en 112 larvas haploides de esta familia. Los microsatélites que resultaron homocigotos en esta primera hembra, fueron amplificados en la hembra L4-65347- H, utilizada para crear la segunda familia de ginogenéticos haploides (familia FH2). Los microsatélites heterocigotos en esta hembra se amplificaron en 120 larvas haploides de esta segunda familia.

#### III.5.2. Análisis de ligamiento

La construcción de un mapa de ligamiento es, en esencia, la disposición lineal de una serie de marcadores, basado en el análisis de sus frecuencias de recombinación (Stam, 1993). Para la construcción del mapa genético de lengüado se utilizó el programa JOINMAP 3.0 y cuyo manual está disponible en <http://www.kyazma.nl/index.php/mc.JoinMap/sc.Manual> (Van Ooijen y Voorrips, 2001). Este programa permite, la construcción de un mapa de ligamiento a partir de varias familias, integrando los mapas obtenidos en cada una de ellas de forma individual para dar lugar a un mapa consenso. Así, para este estudio, se contó con los datos de las amplificaciones de los microsatélites en dos familias ginogenéticas haploides diferentes (FH1 y FH2) obteniéndose, en primer lugar, sus respectivos grupos de ligamiento y, a continuación, con la integración de microsatélites comunes, el mapa consenso de ambas familias.

El primer paso realizado por JOINMAP es la estimación de las frecuencias alélicas y el análisis de segregación independiente de cada marcador microsatélite, comprobando que cada uno de ellos segregue en la descendencia según las proporciones mendelianas (1:1 en las familias ginogenéticas haploides). Para ello, se compararon las frecuencias alélicas obtenidas con las frecuencias alélicas esperadas y se detectaron las posibles desviaciones mediante la aplicación de la prueba  $\chi^2$  con un nivel de significación de  $p < 0.05$ . A continuación, en aquellos marcadores que presentaron ligamiento, se calculó la distancia relativa por pares (análisis *twopoint*) obteniéndose los distintos grupos de ligamiento. Para ello, se aplicó el método de *máxima verosimilitud*, cuyo objetivo es buscar, a partir de los datos observados, el valor de un parámetro  $p$ , que maximice la probabilidad de observación de dichos datos (Fortes, 2008), es decir aquel valor que sea más compatible con los datos observados.

Siendo la función de verosimilitud la siguiente:

$$P(r) = r^R (1-r)^{N-R}$$

si trasladamos esta ecuación a la estimación de las frecuencias de recombinación entre marcadores resultaría:

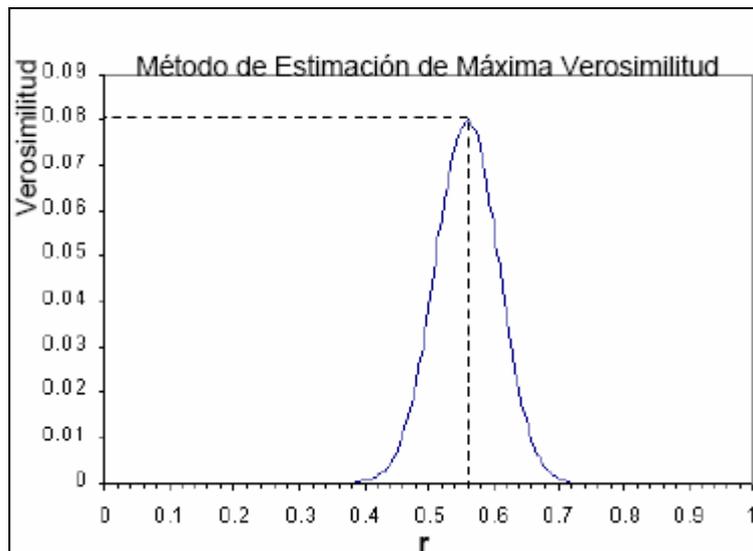
$P(r)$ : frecuencia de recombinación entre marcadores

$N$ : número total de genotipos obtenidos

$R$ : número de genotipos recombinantes

$N-R$ : número de genotipos no recombinantes

Así, una vez fijados los valores de  $N$  y  $R$ , la función depende únicamente de  $r$ . A continuación, el método, procede asignándole una serie de valores a  $r$  (0.1, 0.2, 0.3...) y calculando  $P(r)$  para cada uno de ellos. Se seleccionará el valor de  $r$  que proporcione una mayor verosimilitud, tomándose como la mejor estima de  $P(r)$  (Fortes, 2008) (**Figura 6**).



**Figura 6:** Representación del valor de  $r$  que maximiza la verosimilitud. Para dos marcadores no ligados la estima de  $r$  que maximiza la verosimilitud rondará el valor 0.5 (Modificado de Fostes, 2008).

La aplicación del método de máxima verosimilitud en el cálculo de ligamiento entre los marcadores disponibles asocia la hipótesis de la existencia de recombinación ( $r$ ) a la hipótesis nula de no asociación utilizando el método Lod Score o LOD (logaritmo de la ratio de verosimilitudes). Así, las dos hipótesis a comparar son ligamiento ( $r < 0.5$ ) frente a segregación independiente ( $r = 0.5$ ). La diferencia entre las verosimilitudes para cada una de las hipótesis se conoce como puntuación LOD:

$$Z(r) = \log_{10} \frac{\text{recombinación}(r)}{\text{independencia}(0.5)}$$

A menor valor de  $r$ , respecto a 0.5, mayor es la evidencia de ligamiento. Así, cuando no hay ligamiento,  $r = 0.5$ , la puntuación LOD es igual a 0 ( $\log_{10}(1) = 0$ ). La fracción de recombinación varía entre 0 (para loci ligados) hasta 0.5 (para loci no ligados o en otro grupo de ligamiento). El valor a partir del cual se considera que hay ligamiento significativo es  $\text{LOD} \geq 3$ . Este criterio fue asignado por Morton (1995) en los estudios de mapas genéticos en

humanos. La interpretación de este valor sería que la hipótesis alternativa (ligamiento) es 1000 veces más probable que la hipótesis nula (ausencia de ligamiento) (Liu, 1998).

En nuestro caso, durante la agrupación de los microsatélites, se tuvieron en cuenta sólo aquellas frecuencias de recombinación con valor  $LOD \geq 3$ . Una vez obtenidos los distintos grupos de ligamiento, se procedió a la ordenación de los marcadores, teniendo en cuenta las frecuencias de recombinación de todos ellos y aceptándose de nuevo valores de  $LOD \geq 3$ . Para el ajuste del orden de los microsatélites en los grupos, en algunos casos, se aplicó valor de  $LOD=2$ .

Además, para una mejor estimación de la distancia entre los marcadores, se aplicó la función de mapa de Kosambi (1944), que disminuye el efecto de la interferencia conforme la distancia aumenta.

La representación gráfica de los diferentes grupos de ligamiento con los microsatélites ordenados en distancias de mapa (cM) se realizó con el programa MAPCHART 2.0 (Voorrips, 2002).

### III.5.3. Análisis de los microsatélites en la familia ginogenética diploide

Paralelamente, 144 microsatélites que habían podido ser mapeados (105 heterocigotos en FH1 y 39 heterocigotos en FH2) se amplificaron en la hembra L3-E945-11-H, utilizada para la construcción de la familia ginogenética diploide. Aquellos marcadores que resultaron ser heterocigotos en esta hembra, se amplificaron en 70 larvas ginogenéticas diploides. Este análisis permite la localización aproximada del centrómero en cada grupo de ligamiento, mediante las distancias de los marcadores a dicho centrómero (a través de las frecuencias de recombinación). Las condiciones de amplificación de recogen en el **Anexo IIIc**.

### III.5.4. Estimación de la distancia microsatélite-centrómero

Una vez analizados los microsatélites en la familia ginogenética diploide, la distancia al centrómero fue calculada a partir de la frecuencia de heterocigotos de la descendencia ( $y$ ):

$$y = \frac{N^{\circ} \text{ larvas heterocigotas}}{N^{\circ} \text{ total}}$$

La distancia al centrómero se calcula aplicando la fórmula:  $y/2(x/100)$  (ya que entra en juego la mitad de las cromátidas) y se expresa en centimorgans (cM) Para este análisis, hemos considerado la interferencia completa (Thorgaard y col., 1983). Para cada microsatélite se calculó la distancia al centrómero y su localización se consideró próxima a aquel microsatélite con menor frecuencia de heterocigotos.

## III.6. Análisis de la conservación de los microsatélites

### III.6.1. Búsqueda de anotaciones

Actualmente, existen tres bases de datos formadas por numerosas secuencias tanto de nucleótidos como de proteínas, GenBank (EEUU), EMBL (Reino Unido) y DDBJ (Japón). Estas bases de datos son actualizadas regularmente y están estrechamente relacionadas. Se puede acceder a ellas a partir del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para este análisis se utilizaron las secuencias (regiones flanqueantes y motivo repetido) de todos microsatélites (monomórficos y polimórficos) caracterizados de nuevo en esta Tesis, tanto los procedentes de las genotecas enriquecidas como los seleccionados en la base de ESTs de lenguaje.

Las secuencias se enviaron a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con el fin de determinar su anotación. Preferentemente, la búsqueda se hizo a nivel proteico (BLASTx) y en su defecto a nivel nucleotídico (BLASTn). Los criterios de selección para la homología fueron aquellas con e-values <  $10^{-5}$  y alineamientos mayores de 80 pb.

#### III.6.2. Búsqueda de terminos GO

Dado el gran número de genes que se han ido descubriendo y la nomenclatura que reciben, se fundó el Consorcio de Ontología Genética para establecer un vocabulario común y poder vincular genes de bases de datos de diferentes organismos y describir sus **funciones, componentes y procesos biológicos** en los que intervienen, independientemente de sus nombres. De ahí, surgió el término GO, con tres categorías y creado a partir de las bases de datos del genoma de los principales organismos modelo.

Las secuencias microsatélites que resultaron anotadas en el apartado anterior, se sometieron a la búsqueda de términos GO a través del software AmiGO v.1.8 (<http://www.geneontology.org/>) (Camon y col., 2004).

#### III.6.3. Localización en regiones traducidas y en regiones UTRs

Las zonas UTRs de los genes, son aquellas que, aunque son transcritas, no son traducidas a proteína, flanqueando a la región codificada en ambos extremos (5'-UTR y 3'-UTR). Poseen gran importancia ya que intervienen en la regulación de la expresión del gen. Así, los microsatélites diseñados pueden encontrarse en las regiones UTRs o en las regiones traducidas formando parte de la proteína.

Para la determinación de la posición del microsatélite se seleccionó la secuencia completa de nucleótidos con el programa Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) y se traducen a sus aminoácidos respectivos, con sus posibles pautas de lecturas. Posteriormente, y utilizando esta vez el programa BLASTx se selecciona aquella secuencia que presenta mayor homología con las publicadas. A partir de ésta, se busca la región traducida teniendo en cuenta el codón de inicio y el codón de parada y se analiza si el microsatélite se encuentra en zona traducida o en zona UTR tanto por el extremo 5'-UTR como por el extremo 3'-UTR.

Este análisis se realizó en las secuencias microsatélites anotadas anteriormente.

#### III.6.4. Estudio de la homología y conservación en otros peces planos

Para determinar la presencia y conservación de los microsatélites del lenguado en los genomas de otras especies de peces planos, se compararon sus secuencias mediante búsquedas BLASTn (Altschul y col., 1990) con aquellas secuencias disponibles y depositadas en las bases de datos ESTs del rodaballo (6.170 secuencias) de Pardo y col., (2008) y Vera y col., (2011), de la platija (13.869 secuencias) y del halibut (20.886 secuencias), estas dos últimas procedentes de NCBI-EST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>). Para este análisis se utilizaron las secuencias microsatélites (monomórficos y polimórficos), tanto las procedentes de las genotecas enriquecidas como las seleccionados en la base de ESTs de lenguado. Los criterios de selección para la homología fueron aquellas con e-values <math>10^{-5}</math> y alineamientos mayores de 80 pb. Una vez identificadas las secuencias homólogas, se utilizó el programa Clustalw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para la realización de los alineamientos completos de las secuencias.

### III.7. Estudios de sintenia

#### III.7.1. Sintenia con especies modelo de peces

Un primer análisis de la sintenia, se realizó utilizando los genomas de las especies modelo de peces. El estudio comparativo entre los grupos de ligamiento obtenidos en el lenguado y los cromosomas de estas especies, permite asociarlos y conocer, entre otras cosas, las reorganizaciones cromosómicas sucedidas a lo largo de la evolución en estos complementos cromosómicos.

La plataforma Ensembl ([www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)) pone a disposición, el genoma completo de las especies modelo, siendo las siguientes, las empleadas en este estudio: *Gasterosteus aculeatus* (espinoso), *Tetraodon nigroviridis* (pez globo), *Oryzias latipes* (medaka), *Takifugu rubripes* (fugu) y *Danio rerio* (pez cebra).

Para ello, se han utilizado las secuencias de microsatélites (tanto EST como genómicas) que se pudieron incorporar en el mapa de lenguado. A través de búsquedas BLAST, se han encontrado homologías entre estas secuencias con las existentes en los genomas de las especies modelos, seleccionándose aquellas con valores de e-value <math><10^{-5}</math> y con tamaños de alineamientos mayores a 80 pb. Mediante estas homologías se pueden asociar los diferentes grupos de ligamiento el lenguado a los cromosomas de las especies modelos, así como su localización en pb dentro de ellos.

#### III.7.2. Sintenia con otras especies de peces planos

Por otro lado, el análisis de sintenia se ha realizado con otras especies de peces planos, como el rodaballo, la platija y el halibut, en los cuales existen mapas de ligamiento realizados por Bouza y col., 2012, Castaño-Sánchez y col., 2010 y Reid y col., 2007 respectivamente. En este estudio, se pretende conocer las relaciones entre los diferentes grupos de ligamiento de estas especies. Para ello, y debido al escaso número de marcadores comunes entre los mapas genéticos de estas especies y del lenguado, se utilizó la información obtenida en el apartado anterior. Así, cuando se pudo identificar una homología entre un

grupo de ligamiento del lenguado y un cromosoma de una de las especies modelos, se buscó en los trabajos anteriormente citados de peces planos, la relación entre ese cromosoma modelo y los grupos de ligamiento de estas especies. De esta forma, se han asociado, utilizando los cromosomas de las especies modelo como nexos, diferentes grupos de ligamiento de peces planos. Se seleccionaron los microsatélites con homologías presentes en un único cromosoma, en más de una especie modelo y coincidentes con el cromosoma del resto de peces planos.

Por último, la presencia de marcadores comunes entre diferentes mapas, permiten una asociación directa entre los grupos de ligamiento en los que se localizan. Para este fin, se utilizaron los microsatélites descritos en el apartado **III.2.4.**, nueve procedentes del rodaballo, seis de la platija y uno del halibut.

## **IV. RESULTADOS**

---

## IV.1. Desarrollo de marcadores moleculares

### IV.1.1. Aislamiento y optimización de microsatélites

#### IV.1.1.1. Caracterización de los microsatélites procedentes de genotecas

A partir de tres genotecas enriquecidas en microsatélites, desarrolladas desde de ADN genómico de lengüado, se secuenciaron 600 clones y se analizaron sus secuencias para la búsqueda de repeticiones de microsatélites. Los criterios para la selección de éstos fueron que el motivo (di-, tri-, tetra- o pentanucleótido) estuviera repetido más de tres veces y sus regiones flanqueantes tuvieran un tamaño suficiente y de calidad para el diseño de cebadores a ambos lados de la repetición. Así, se descartaron las secuencias de mala calidad (con ambigüedades de lectura), las que no contenían microsatélites, las que contenían repeticiones menores a las establecidas y las que presentaban microsatélites pero en alguno de los extremos de la secuencia (sin posibilidad de diseñar la pareja de los cebadores flanqueantes).

Un total de 169 secuencias, de los 600 clones, (28.2%) contenían repeticiones de microsatélites con los criterios establecidos y se diseñaron los correspondientes cebadores para su posterior amplificación.

Durante el proceso de optimización de las amplificaciones, de estos 169 loci de microsatélites, se descartaron 51 por la escasa calidad en sus amplificaciones, quedando disponibles un total de 118 microsatélites, cuyas características se muestran, en el Anexo VIII.

Siguiendo la clasificación de microsatélites de Weber (1990), obtuvimos 40 de 118 (33.9%) microsatélites perfectos, 50 (42.4%) imperfectos y 28 (23.7%) compuestos. En todos ellos, la repetición del motivo microsatélite variaba desde di- hasta penta-nucleótidos. En la **Tabla 7**, se clasifican los microsatélites en función de estas dos características.

Motivo	Total (=%)	Perfecto (=%)	Imperfecto (=%)	Compuestos (=%)
Di-	74 (62.7)	26 (35.1)	30 (40.5)	18 (24.3)
Tri-	33 (28.0)	13 (39.4)	16 (48.5)	4 (12.1)
Tetra-	4 (3.4)	-	4 (100)	-
Penta-	1 (0.8)	1 (100)	-	-
Combinado	6 (6.8)	-	-	6
Total	118 (69.8)	40	50	28

**Tabla 7:** Número de microsatélites desarrollados a partir de genotecas enriquecidas según las características del motivo repetido. A los datos de cada apartado se le acompaña sus porcentajes correspondientes.

Con respecto al tamaño de los cebadores diseñados para la amplificación de estos microsatélites, éstos variaron desde 16pb (Mss126) a 27pb (Mss59). Tal como se explica en el apartado **III.2.5.**, las amplificaciones se pusieron a punto, obteniendo temperaturas de amplificación variables entre 45 °C (Mss165) y 65 °C (Mss13) y las de cloruro de Mg entre 0.5 y 1.5 mM (**Anexo VIII**).

#### IV.1.1.2. Caracterización de los microsatélites presentes en ESTs de lenguado

A partir de la plataforma bioinformática *Soleamold*, basada en secuencias ESTs y microarrays (Cerdá y col., 2008) e impulsada por el proyecto de investigación Pleurogene para la mejora genética del lenguado senegalés, se realizó una búsqueda de microsatélites cuyos criterios de selección se basaron en la presencia de más de cuatro repeticiones para los motivos dinucleótidos y más de tres para los tri- y tetra-nucleótidos, además, debían presentar regiones flanqueantes de calidad. Así, se diseñaron cebadores para 84 microsatélites de secuencias ESTs de los cuales, tras las condiciones de optimización, en 76 de ellos (90.5%), se obtuvo producto de amplificación. Las características de estos microsatélites se muestran en el **Anexo IX**.

Siguiendo la misma clasificación de Weber (1990), obtuvimos 44 de 76 (57.9%) microsatélites perfectos, 19 (25%) imperfectos y 13 (17.1%) compuestos. Los microsatélites presentaban motivos di-, tri-, tetra- y hexanucleótidos (no se encontró motivo pentanucleótido). En la **Tabla 8** se clasifican los microsatélites en función de estas dos características.

Motivo	Total (=%)	Perfecto (=%)	Imperfecto (=%)	Compuestos (=%)
Di-	44 (57.9)	25 (56.8)	13 (29.5)	6 (13.6)
Tri-	23 (19.5)	14 (60.9)	5 (21.7)	4 (17.4)
Tetra-	6 (7.9)	4 (66.6)	1 (16.7)	1 (16.7)
Hexa-	1 (1.3)	1 (100)	-	-
Combinado	2 (2.6)	-	-	2 (100)
Total	76 (90.5)	44 (63.2)	19 (36.8)	13 (17.1)

**Tabla 8:** Número de microsatélites procedentes de la base de datos ESTs, según las características del motivo repetido. A los datos de cada apartado se le acompaña sus porcentajes correspondientes.

El tamaño de los cebadores diseñados para la amplificación de estos microsatélites, variaron de 15pb (CSse2M07) a 27pb (CSse1/17, Est-6 y Est-36), las temperaturas de amplificación oscilaron entre 45 °C (Est-51) y 63 °C (CSse22E12) y las de cloruro de Mg entre 0.5 y 1.5 mM (**Anexo IX**).

#### IV.1.1.3. Microsatélites desarrollados en otros peces planos

A partir de los microsatélites desarrollados para otros peces planos, se seleccionaron un total de 31 secuencias en base a su variabilidad (alto grado de polimorfismo), localización (ligados y no ligados en las especies descritas) y conservación (posibilidad de amplificación cruzada y secuencias flanqueantes con homología en diferentes base de datos) ver apartado **III.2.4**. De estos microsatélites, se pudieron optimizar 16 de ellos (51.6%), concretamente 9 procedentes del rodaballo, 6 de la platija y 1 del halibut. Las condiciones de amplificación de estos microsatélites en el lenguado se muestran en el **Anexo X**, oscilando las temperaturas entre 46 °C (Poli107TUF de la platija) y 61 °C (Smax02 del rodaballo) y las concentraciones de cloruro de Mg, entre 1 y 1.5 mM.

#### IV.1.2. Análisis de la variabilidad de los microsatélites

El estudio de la diversidad genética de los 210 microsatélites obtenidos (118 de nuestras genotecas, 76 de ESTs y 16 de otros peces planos), se realizó en un número de ejemplares adultos que varió entre 18 y 38 individuos (ver **Tabla 6**). De este estudio se excluyeron los 20 microsatélites descritos en el lenguado por otros autores, cuya variabilidad ya fue estudiada por ellos.

Tras este análisis, 151 microsatélites (71.9%) presentaron variabilidad, con la presencia de más de un alelo (loci polimórficos) mientras que los 59 restantes (28.1%) carecían de ella (loci monomórficos). En la **Tabla 9**, se clasifican los microsatélites en función de su variabilidad y de la procedencia de los mismos.

Procedencia	Polimórficos (=%)	Monomórficos (=%)
Genotecas	92 (78.0)	26 (22.0)
ESTs	52 (68.4)	24 (31.6)
Peces planos	7 (43.7)	9 (56.3)
Total	151 (71.9)	59 (28.1)

**Tabla 9:** *Microsatélites obtenidos según su procedencia (genotecas realizadas, base de datos ESTs y de otros peces planos) y su variabilidad (polimórficos y monomórficos). A los datos de cada apartado se le acompañan sus porcentajes correspondientes.*

Los resultados completos, obtenidos del estudio de la variabilidad de estos microsatélites, se recogen en el **Anexo XI**. Podemos destacar que, el tamaño de los alelos microsatélites oscila entre 65 pb (Poli129TUF) y 678 pb (EST-42), el número medio de alelos por microsatélite es de  $6.78 \pm 3.91$  y oscila entre 2 (como por ejemplo Mss13 y Mss53) y 19 alelos (Mss7).

Por otro lado, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), tiene un valor medio de  $0.6014 \pm 0.2272$  y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) es de un valor medio de  $0.6358 \pm 0.2118$ .

Entre los microsatélites con valores mínimos de heterocigosidad podemos destacar a Mss65 ( $H_o = 0.0526$  y  $H_e = 0.0519$ ), y con valores máximos a Mss154 ( $H_o = 1.0000$  y  $H_e = 0.8763$ ), EST-33 ( $H_o = 1.0000$  y  $H_e = 0.7443$ ) y Mss63 ( $H_o = 0.9545$  y  $H_e = 0.9366$ ).

La aplicación del test de equilibrio Hardy-Weinberg ( $p < 0.05$ ) y el cálculo de la frecuencia de alelos nulos (FAN) reveló qué microsatélites presentaban un déficit de heterocigosidad, causada por la posible presencia de alelos nulos. Ésta fue considerada significativa a partir de un valor de  $+0.1000$  ( $FAN > +0.1000$ ). Entre los datos más significativos se pueden destacar, por ejemplo, los microsatélites Mss3 (Pvalue=0.0033 y  $FAN = +0.3483$ ), Mss43 (Pvalue=0.0015 y  $FAN = +0.2439$ ), Mss56 (Pvalue=0.0806 y  $FAN = +0.2657$ ), Mss74 (Pvalue=0.0164 y  $FAN = +0.3298$ ), Mss106 (Pvalue=0.0049 y  $FAN = +0.5333$ ) y Mss126 (Pvalue=0.0545  $FAN = +0.2552$ ).

El indicador de polimorfismo (PIC), es un parámetro que mide la variabilidad de un microsatélite y está estrechamente relacionado con el número de alelos que posee, es decir un número elevado de alelos es acompañado con valor alto de PIC. Así, el valor mínimo obtenido, se corresponde con 0.0499 (Mss65, dos alelos) y el valor máximo es de 0.9068 (Mss63, 16 alelos) siendo la media de  $0.5879 \pm 0.2184$ .

## IV.2. Obtención de las familias de referencia

### IV.2.1 Creación de las familias ginogenéticas haploides y diploides

La primera familia ginogenética haploide (FH1) se obtuvo de la fecundación artificial del espermatozoides inactivo del macho L3-CF83-36 con los huevos de la hembra L2-DD53-19-H, seleccionándose 140 larvas.

La segunda familia ginogenética haploide (FH2) se obtuvo a partir de la fecundación artificial del espermatozoides inactivo del macho B7-EFED-M con los huevos de la hembra L4-65347-H, seleccionándose 150 larvas.

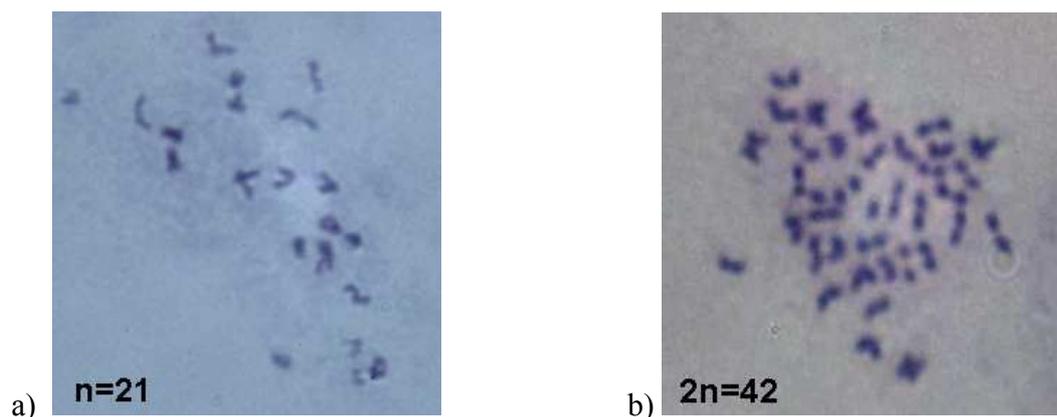
Por último, la familia ginogenética diploide se obtuvo con la fecundación artificial del espermatozoides inactivo del macho L1-E27C-11-M con los huevos de la hembra L3-E945-11-H, seleccionándose 180 larvas.

### IV.2.2. Verificación de la ginogénesis

Para la confirmación de la naturaleza ginogenética de las progenies, se estudió el cariotipo y el genotipo (mediante el análisis de microsatélites) de algunas larvas procedentes de las tres familias creadas en este trabajo, cuyos resultados se detallan a continuación:

#### IV.2.2.1. Estudio del cariotipo

Se realizó un estudio citogenético en diez larvas de cada familia. Para ello, se aplicó el protocolo correspondiente (ver apartado III.4.2.) y las preparaciones obtenidas se observaron al microscopio. Así, se contabilizaron, en las larvas ginogenéticas haploides (de ambas familias), 21 cromosomas y en las larvas ginogenéticas diploides 42 cromosomas, estos resultados se muestran en la **Figura 9**:



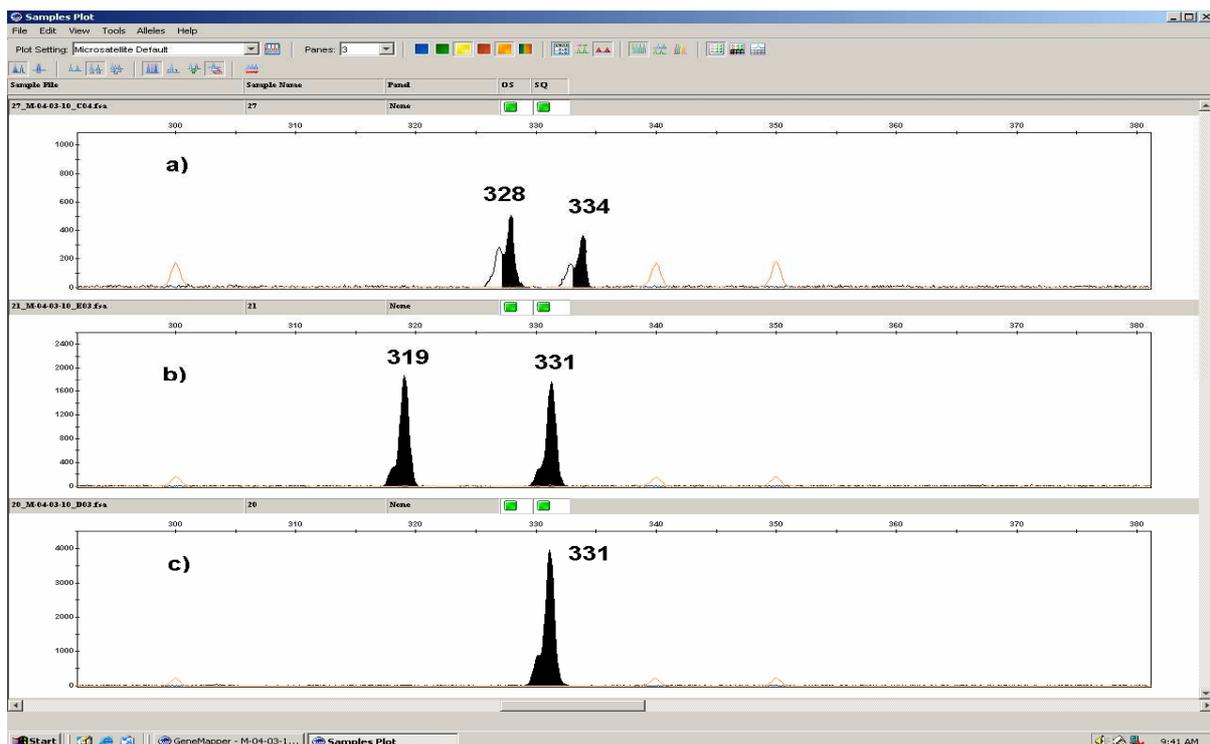
**Figura 9:** a) Fotografía del cariotipo obtenido de una larva ginogenética haploide en la que se observan un solo juego de cromosomas en metafase; b) Fotografía del cariotipo obtenido de una larva ginogenética diploide en la que se observan dos juegos de cromosomas en metafase.

### IV.2.2.2. Amplificación de microsatélites en larvas ginogenéticas

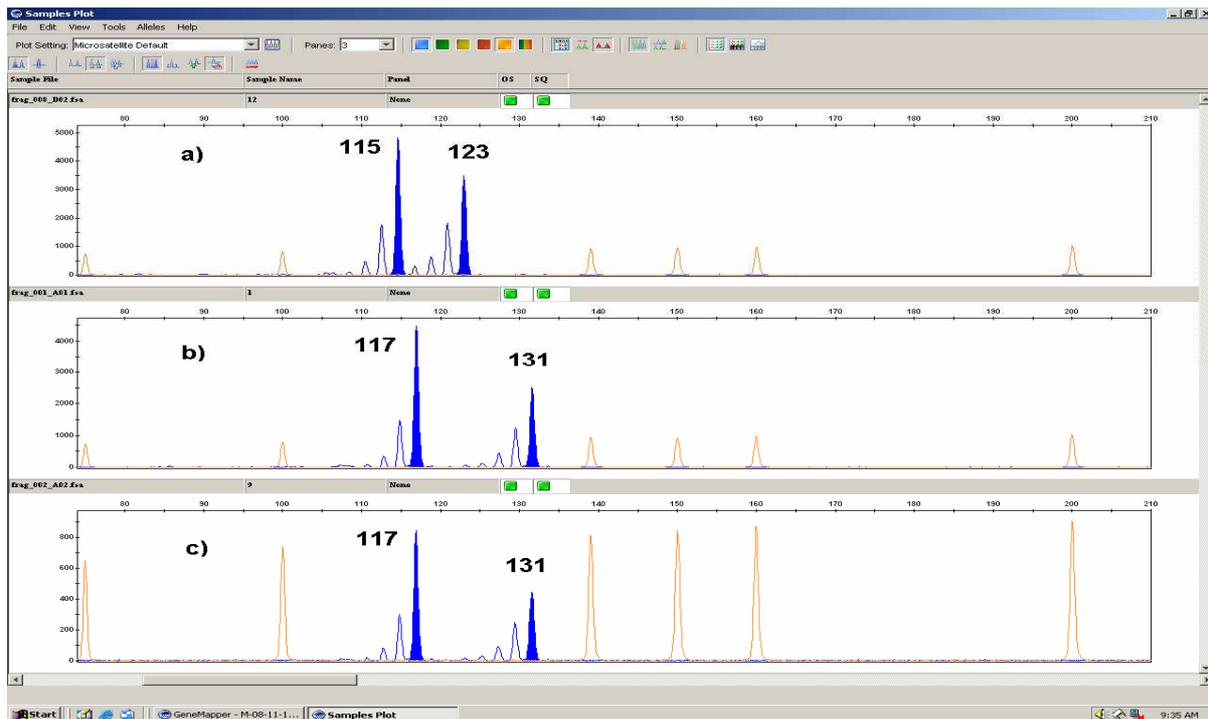
Para la comprobación de la condición ginogenética de las progenies y para la posterior caracterización de los diferentes microsatélites en las familias de referencia, se procedió a extraer el ADN de los parentales de las tres familias así como de veinte larvas de cada una de ellas, siguiendo el protocolo descrito en el apartado **III.4.3**.

A continuación, se seleccionaron dos microsatélites cuyas amplificaciones, en los parentales, habían mostrado alelos diferentes y se comprobó la condición ginogenética de las veinte respectivas larvas de cada familia, confirmando la presencia exclusivamente de alelos maternos.

Las **Figuras 10** y **11** muestran el gráfico de salida del secuenciador con las amplificaciones de dos de los microsatélites utilizados para la verificación de la condición ginogenética de las familias. El primer ejemplo corresponde a las amplificaciones del microsatélite GATA3 en los parentales y una de las larvas de la primera familia ginogenética haploide (FH1), en la que se puede observar que ésta presenta un solo alelo materno, verificándose así su condición haploide. En la siguiente figura, se muestran las amplificaciones del microsatélite Mss66 en los parentales y una larva de la familia ginogenética diploide, verificándose esta condición al presentar dos alelos de origen exclusivo materno.



**Figura 10:** Ejemplo de alelos obtenidos del microsatélites GATA3 en la 1ª familia de referencia ginogenética haploide marcados en negro, a) tamaño de los alelos del padre: 328/334, b) tamaño de los alelos de la madre: 319/331, c) tamaño de alelo de una de las larvas haploides: 331 (Los fragmentos en naranja corresponden al marcador molecular LIZ-500).



**Figura 11:** Ejemplo de alelos obtenidos del microsatélites *Mss66* en la familia de referencia ginogenética diploide marcados en azul, a) tamaño de los alelos del padre: 115/123, b) tamaño de los alelos de la madre: 117/131, c) tamaño de alelo de una de la larvas haploides: 117/131 (Los fragmentos en naranja corresponden al marcador molecular *LIZ-500*).

Una vez comprobada la condición ginogenética de las primeras veinte larvas, se procedió a la extracción del ADN del resto de larvas. Así, de la 1ª familia haploide se extrajo el ADN de un total de 140 larvas, descartándose 28 de ellas por carencia de ADN. En las restantes 112 larvas se amplificaron los dos microsatélites y se volvieron a descartar alguna de ellas (18) por presentar condición diploide.

De la 2ª familia haploide se extrajo el ADN de un total de 150 larvas y se descartaron 27 por carencia de ADN. De las restantes 123 larvas, se volvieron a descartar 25 de ellas por presentar condición diploide.

Por último, de la familia ginogenética diploide se extrajo ADN de buena calidad de 75 larvas. Sin embargo, durante el amplificado de los microsatélites, se descartaron 5 por presentar algún alelo paterno (sin condición ginogenética diploide).

En resumen, para la 1ª familia haploide (FH1) se usaron 94 larvas haploides, para la 2ª familia haploide 98 larvas y para la familia ginogenética diploide se dispuso de 70 larvas.

### IV.3. Desarrollo del mapa de ligamiento

Los análisis de ligamiento de los marcadores microsatélites disponibles se realizaron mediante el programa JOINMAP 3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001) que, con las frecuencias de recombinación y la aplicación de varios test estadísticos, calcula las distancias y el orden de los microsatélites en los diferentes grupos de ligamiento (LGs).

#### IV.3.1. Análisis de ligamiento de la 1ª familia haploide

Un total de 171 microsatélites polimórficos (92 de las genotecas enriquecidas, 52 de la base de ESTs, 7 de otros peces planos y 20 descritos por otros autores en el lenguado), fueron amplificados en la hembra (L2-DD53-19) resultando ser heterocigota en **105 microsatélites** que, posteriormente, se amplificaron en las 94 larvas pertenecientes a esta familia (FH1).

Tras el análisis de ligamiento de los microsatélites, para esta 1ª familia haploide (HF1) se obtuvieron **24 LGs**, en los se distribuyeron un total de 96 microsatélites. Durante el análisis de ligamiento se aplicaron valores de LOD3, 4 y 5 y, en todos los casos, un valor de recombinación  $r=0.40$ . Para el valor LOD3, 17 microsatélites presentaron ligamiento, para un LOD4, la relación de ligamiento se amplió a 15 nuevos microsatélites y, por último, con un valor de LOD5 se detectó ligamiento en 64 microsatélites (**Figura 12**). En nueve microsatélites no se detectó ligamiento con el resto y no se pudieron incluir en ninguno de los LGs constituidos. Éstos, se acompañan con las iniciales UL (*unlinkage*).

Una vez obtenidos los LGs, se procedió a ordenar los microsatélites dentro de cada uno. Para algunos microsatélites, se aplicó un valor LOD2 con criterios estadísticos más permisivos, consiguiéndose así la ordenación en cada LG. Estos microsatélites aparecen subrayados en el mapa de ligamiento (**Figura 12**). Aún así, hubo un microsatélite, cuya posición exacta no pudo determinarse con LOD2 y se consideró accesorio. Este tipo de microsatélites se incluyen entre paréntesis, al lado de otro microsatélite al que se ha ligado con un mayor LOD, seguido de la distancia a él en cM.

Esto ocurre concretamente en el LG5 de esta FH1 para el microsatélite Mss96 (1), que aparece junto a Smax-E273 a una distancia de 96.36 cM.

### IV.3.2. Analisis de ligamiento de la 2ª familia haploide

Los 66 microsatélites que resultaron homocigotos en la hembra de la FH1 se amplificaron en la hembra (L4-65347) resultando heterocigota en **39 microsatélites**, los cuales se amplificaron en las larvas pertenecientes a esta familia FH2. Además, obtenidos los LGs de la HF1, se escogieron una media de dos microsatélites por LG y se amplificaron en la hembra de la HF2, en **37 microsatélites**, ésta hembra resultó heterocigota. Estos microsatélites además de incluirse en el mapa de ligamiento de esta familia HF2, posteriormente se utilizaron como nexos de unión entre los grupos de ligamiento de las dos familias.

Tras el análisis de ligamiento de los microsatélites para esta 2ª familia haploide, se obtuvieron **22 LGs** en los que se distribuyeron un total de 64 microsatélites, en el análisis de ligamiento se aplicó en todos los casos el valor de LOD3. Doce microsatélites no presentaron relaciones de ligamiento (UL) con el resto. Al igual que ocurre en la 1ª familia, una vez obtenidos los LGs en esta 2ª familia, en algunos microsatélites se aplicó un valor LOD2 un mejor ajuste del orden dentro de cada grupo, apareciendo también subrayados en el mapa de ligamiento (**Figura 12**). Para esta familia ningún microsatélite fue considerado accesorio.

### IV.3.3. Construcción del mapa consenso

Con los 37 microsatélites amplificados en ambas familias, se procedió a realizar un nuevo análisis de ligamiento, permitiendo unir, en algunos casos, grupos de ligamiento de cada familia en uno común.

El **mapa de ligamiento** consenso del lenguado está formado por **27 LGs** a lo largo de los cuales se distribuyen un total de **129 microsatélites**. Esta distribución no es uniforme,

habiendo LGs de 2 marcadores (LG18 al LG27) hasta 14 marcadores (LG1 y LG3), la media es de 4.7 microsatélites por grupo. Con respecto a la procedencia, 67 de ellos (51.93%) son de las genotecas enriquecidas, 41 (31.78%) son microsatélites de la base de datos ESTs, 16 (12.40%) se describieron para el lenguado por otros autores, concretamente 7 por Funes y col., 2004 y 9 por Porta y col., 2004 y por último, 3 (2.32%) pertenecen a otros peces planos, concretamente 1 del rodaballo (Smax-E273) y 2 de la platija (Poli200TUF y Poli129TUF).

Las nuevas relaciones de ligamiento entre los grupos de ambas familias se establecieron con un valor de  $LOD \geq 3$  y, como ocurrió anteriormente durante la ordenación de algunos microsatélites en su grupo de ligamiento respectivo, se aplicó un LOD2 para un mejor ajuste. Éstos marcadores aparecen subrayados y se encuentran en los extremos del grupo (Est-32 del LG1, Mss024 del LG13 y CSse27G19 del LG14). Además, hay dos microsatélites accesorios, uno mencionado anteriormente procedente del mapa FH1 (Mss96 en LG5) y el microsatélite 5N15 en LG4 que aparece junto al Mss44 a 24.2 cM de distancia (**Figura 12**).

De los 27 LGs, 8 proceden de la unión de dos grupos de ambas familias tras el análisis de ligamiento con microsatélites compartidos y son denominados *consenso* (LG2 al LG8 y el LG12), 6 están formados por dos LGs procedentes de cada familia en los que, a pesar de compartir microsatélites, el ligamiento ha sido insuficiente, pero aún así, se pueden considerar como un único grupo, son: LG1-9-10-11-13 y LG15, 6 contienen algún microsatélite UL procedente de las familias (LG9, 14, 15, 16, 17 y LG18) y, por último, 9 grupos de ligamiento, que están formados por dobletes de marcadores (del LG19 al LG27) que podrían pertenecer a los grupos anteriores, estar ligados entre ellos constituyendo una nueva agrupación o formar parte de otros nuevos grupos no presentes. En ninguno de los casos, para un total de 15 microsatélites no se detectó ligamiento (UL).

Los grupos de ligamiento varían desde 3.2 (LG19) a 109.9 (LG1) cM, siendo el tamaño medio de los grupos de 36.93 cM. La longitud del mapa se obtuvo de manera estimada a partir de las distancias de cada grupo de ligamiento. Los marcadores accesorios no se tuvieron en cuenta en este cálculo, obteniéndose una longitud total de 1004cM. El haber obtenido un número de grupos de ligamiento mayor al número haploide de la especie es debido, a la presencia de regiones genómicas sobre las que no se han podido cartografiar microsatélites, por lo que tampoco, ligamiento con el resto de grupos. A este tipo de regiones se les conoce como *gaps* y en este mapa, se encuentran presentes a lo largo de todos los grupos y, en su mayoría, con tamaños alrededor de 20-30 cM.

La **Tabla 15** resume las principales características basadas en los microsatélites de cada uno de los mapas obtenidos.

	<b>Mapa consenso</b>	<b>Mapa 1ª Familia</b>	<b>Mapa 2ª Familia</b>
Marcadores	144	105	76
Genotecas	83	68	43
EST	41	24	20
Peces planos	5	4	1
LGs	27	24	22
No ligados (UL)	15	9	12
Tamaño(cM)	1004	782.1	754.6

**Tabla 15:** Comparativa de los mapas de ligamiento obtenidos en las familias haploides y el mapa consenso.

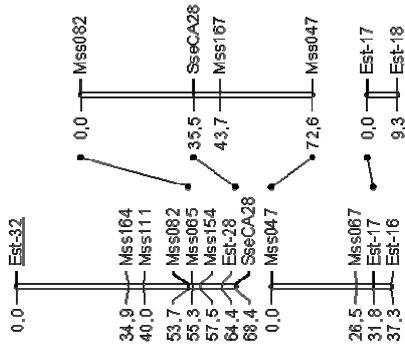
La composición de los grupos de ligamiento que forman el mapa consenso y los mapas de las dos familias haploides, se detalla a continuación en la **Tabla 16**.

CONSENSO			Mapa HF1			Mapa HF2		
LG	Nº micros.	Tamaño (cM)	LG	Nº micros.	Tamaño (cM)	LG	Nº micros.	Tamaño (cM)
LG1	14	109.9	LG1	8	68.4	LG3	4	72.6
			LG9	4	37.3	LG15	2	9.3
LG2	8	86	LG2	7	86.4	LG9	3	23.6
LG3	14	69	LG3	7	50.9	LG1	6	82.4
			LG8	5	16.7			
LG4	7	49.2	LG4	5	64.1	LG4	4	72.7
						LG18	2	24.2
LG5	5	55.3	LG5	5	55.2	LG13	2	21.5
LG6	6	50.6	LG6	5	36.5	LG10	3	46.1
LG7	5	56	LG7	7	52.5	LG12	2	22.9
LG8	8	78.7	LG10	4	10.3	LG2	6	77.6
LG9	6	46.8	LG11	4	46.8	LG7	3	23.6
LG10	5	37.1	LG12	4	36.1	LG14	2	31
LG11	6	48.4	LG13	4	9.3	LG8	3	39.1
LG12	4	26.7	LG14	4	21.2	LG11	3	27.4
LG13	6	85.4	LG15	3	20.9	LG2	4	64.5
LG14	3	42.3	LG16	3	42.3			
LG15	6		LG17	3	32	LG6	3	35.4
						LG16	2	16.9
LG16	3	26.1	LG18	3	26.1			
LG17	3	20.7	LG19	3	20.7			
LG18	2	13.6				LG17	2	13.6
LG19	2	3.2	LG20	2	3.2			
LG20	2	5.3	LG21	2	5.3			
LG21	2	9.7	LG22	2	9.7			
LG22	2	22.7	LG23	2	22.7			
LG23	2	7.5	LG24	2	7.5			
LG24	2	8.2				LG19	2	8.2
LG25	2	25.5				LG20	2	25.5
LG26	2	10.3				LG21	2	10.3
LG27	2	6.2				LG22	2	6.2

*Tabla 16: Grupos de ligamiento que constituyen el mapa consenso de *S. senegalensis* y su procedencia con respecto a los de las familias haploides, indicándose en cada uno, el número de microsatélites que lo constituyen y el tamaño que poseen.*

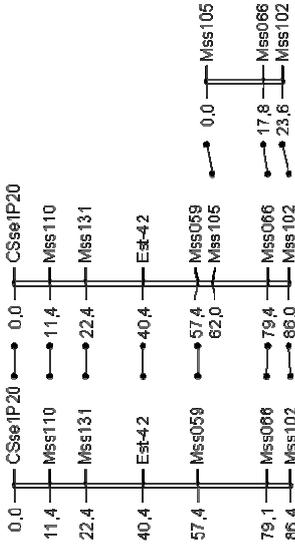
**LG1**

**1y9\_F1**      **3y15\_F2**



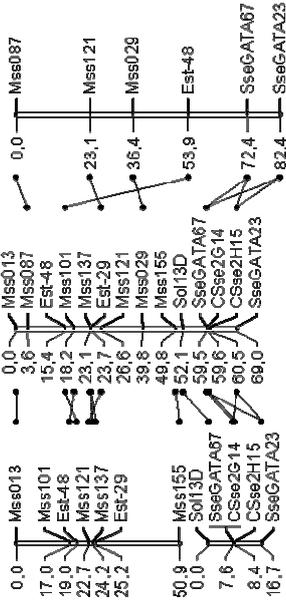
**LG2**

**2\_F1**      **Consenso\_2**      **9\_F2**



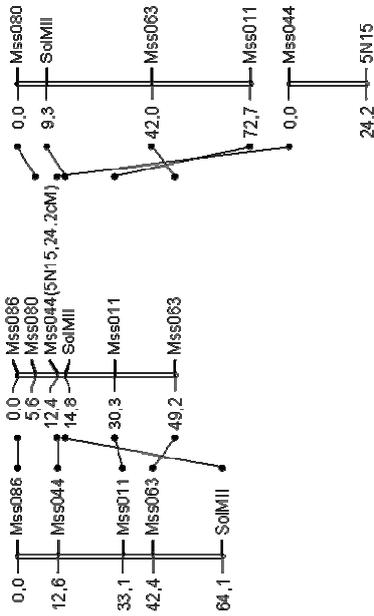
**LG3**

**3y8\_F1**      **Consenso\_3**      **1\_F2**



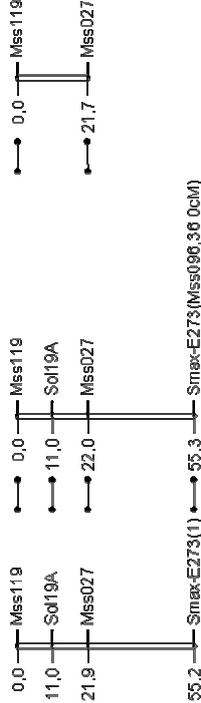
**LG4**

**4\_F1**      **Consenso\_4**      **4y18\_F2**



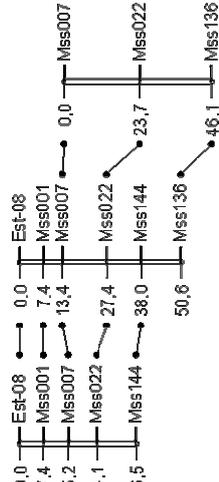
**LG5**

**5\_F1**      **Consenso\_5**      **13\_F2**



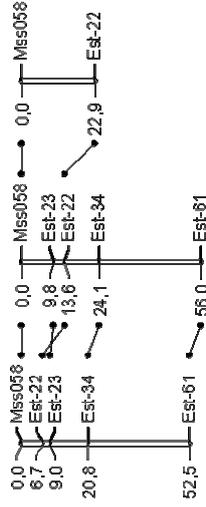
**LG6**

**6\_F1**      **Consenso\_6**      **10\_F2**



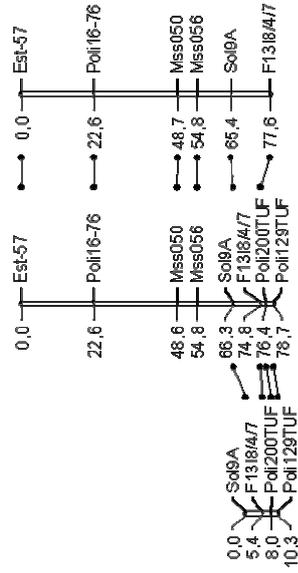
**LG7**

**7\_F1**      **Consenso\_7**      **12\_F2**

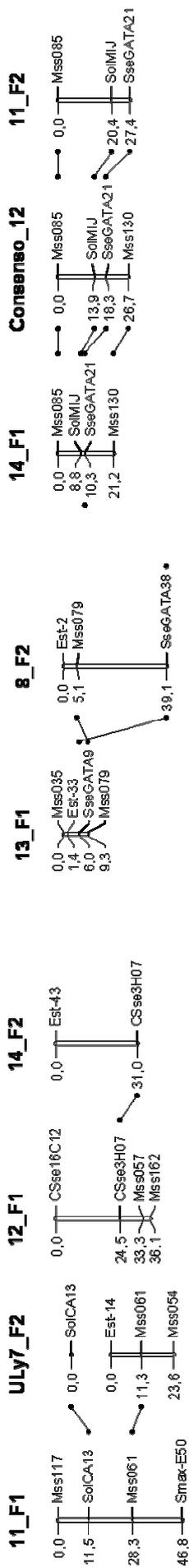


**LG8**

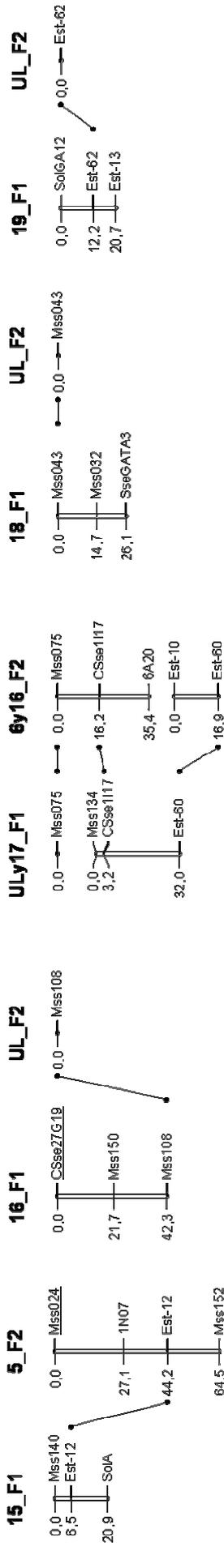
**10\_F1**      **Consenso\_8**      **2\_F2**



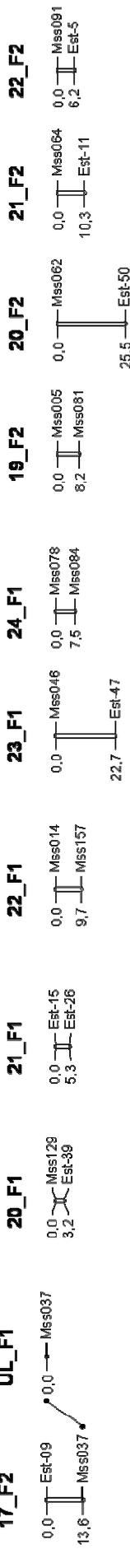
LG9 LG10 LG11 LG12



LG13 LG14 LG15 LG16 LG17



LG18 LG19 LG20 LG21 LG22 LG23 LG24 LG25 LG26 LG27



Mapa de ligamiento de solea senegalensis. Los microsatélites se disponen a la derecha y a la izquierda indica la distancia de cada intervalo (cm). Los microsatélites que se ordenaron con un valor lod2 aparecen subrayados y los accesos se incluyen entre paréntesis junto con el microsatélite al que se une.

#### IV.3.4. Localización del centrómero

##### IV.3.4.1. Caracterización de los microsatélites en la familia ginogenética diploide

Para la localización del centrómero en cada LG se amplificaron en la hembra de la familia ginogenética diploide (L3-E945-11- H), los 144 microsatélites candidatos a ser integrados en el mapa (marcadores polimórficos). Tras las amplificaciones en esta hembra, se dispusieron de un total de 94 microsatélites para los cuales era heterocigota. Estos marcadores, fueron los que se amplificaron en su descendencia (70 larvas ginogenéticas diploides) para el análisis de la segregación.

##### IV.3.4.2. Estimación de la distancia microsatélite-centrómero

A partir de las amplificaciones obtenidas de los 94 microsatélites en la familia ginogenética diploide, se calculó la distancia al centrómero teniendo en cuenta la proporción de heterocigotos en cada microsatélite ( $y = n^{\circ}$  larvas heterocigotas/total). Así, la distancia al centrómero se representa como  $y/2(x100)$  y se expresa en cM. En este análisis, hemos asumido interferencia completa (Thorgaard y col., 1983).

A continuación, se muestra en la **Tabla 17** los microsatélites analizados (73), indicando las distancias al centrómero y ordenados por grupos de ligamiento:

LG	Micro-satélite	distancia centrómero (cM)	LG	Micro-satélite	distancia centrómero (cM)
<b>LG1</b>	Est-32	30	<b>LG8</b>	Mss 050	41,4
	M-164	37,1		F1318/4/7	47,85
	Mss 82	46,4		Poli 200 TUF	41,4
	M-154	46,4		Poli 129 TUF	47,1
	Sse CA28	36,4	<b>LG9</b>	<b>Sol CA13</b>	<b>16,4</b>
	<b>Mss 047</b>	<b>2,1</b>		Mss 061	47,85
	Mss 067	25,7		Est-14	39,25
	Est-18	25		Mss 054	42,1
<b>LG2</b>	<b>CSse 1P20</b>	<b>22,1</b>	<b>LG10</b>	CSse 3H07	46,4
	Mss 110	41,4		<b>Est-43</b>	<b>15</b>
	Mss 131	42,1	<b>LG11</b>	Mss 035	44,25
	Est-42	35		Est-33	45
	Mss 059	32,85		<b>Sse GATA9</b>	<b>19,25</b>
	Mss 105	36,4	Sse GATA38	33,55	
	Mss 066	30,7	<b>LG12</b>	Sol MIJ	45
<b>LG3</b>	<b>Mss 87</b>	<b>12,1</b>		Sse GATA 21	42,85
	Est-29	32,85	<b>LG13</b>	Mss 140	22,1
	M-155	20,7		Est-12	19,25

	Sol 13D	40		<b>Sol A</b>	<b>2,1</b>
	Sse GATA67	39,25		Mss 024	16,4
	CSse 2G14	38,55		M-152	33,55
	CSse2H15	39,25	<b>LG14</b>	CSse 27G19	43,55
<b>LG4</b>	Mss 86	34,25		<b>M-150</b>	<b>21,4</b>
	Mss 044	28,55	<b>LG15</b>	Mss 075	47,1
	Sol MII	25		CSse 1I17	24,25
	<b>Mss 063</b>	<b>14,25</b>		CSse 6A20	22,85
<b>LG5</b>	<b>Mss 119</b>	<b>22,85</b>		Est-10	35
	Sol 19 A	30		<b>Est-60</b>	<b>16,4</b>
	Mss 027	36,4		Mss 134	22,85
<b>LG6</b>	Est-8	46,4	<b>LG19</b>	Mss 129	42,1
	Mss 01	43,55		Est-39	37,1
	Mss 07	44,25	<b>LG20</b>	<b>Est-15</b>	<b>0</b>
	<b>Mss 144</b>	<b>22,1</b>	<b>LG21</b>	<b>Mss 014</b>	<b>26,4</b>
	Mss 136	23,55		M-157	41,4
<b>LG7</b>	Mss 058	30,7	<b>LG22</b>	Mss 046	46,4
	<b>Est-23</b>	<b>15,7</b>		<b>Est-47</b>	<b>5,7</b>
	Est-22	22,85			

**Tabla 17:** Resultados de la localización del centrómero en los grupos de ligamiento analizados, mediante los microsatélites contenidos en cada uno. En negrita el microsatélite que se ha considerado más próximo al centrómero.

Como se puede observar, no en todos los grupos de ligamiento fue posible la estimación de la distancia al centrómero ya que, algunos microsatélites (50), no pudieron incluirse en el análisis de segregación al resultar homocigotos en la hembra de esta familia ginogenética diploide. Concretamente 8, son los grupos de ligamiento que quedaron excluidos en este estudio (del LG16 al LG18 y del LG23 al LG27).

#### IV.4. Estudios evolutivos. Análisis de conservación y sintenia

Una vez caracterizados los microsatélites en el lenguado, en base a los que se ha desarrollado un mapa de ligamiento, nuestros siguientes objetivos fueron: (1) anotar y clasificar las secuencias ligadas a estos microsatélites y su presencia en otras especies de peces, (2) determinar el grado de conservación de estos microsatélites, y en su caso, inferir procesos relacionados con la evolución de los mismos en peces planos, y (3) utilizar estos marcadores para el análisis de sintenia entre cromosomas de especies modelo de peces y grupos de ligamiento de peces planos. Para los dos primeros objetivos, hemos comparado las secuencias de todos los microsatélites (monomórficos y polimórficos) caracterizados por primera vez en esta Tesis, tanto los procedentes de las genotecas enriquecidas como los seleccionados de la base de ESTs del lenguado. Para el tercer objetivo, se utilizaron sólo los microsatélites integrados previamente en el mapa del lenguado y se compararon con genomas completos de las especies modelo de peces: espinoso, tetraodon, medaka, fugu y danio. Adicionalmente, estas últimas comparaciones han permitido un estudio de sintenia indirecto entre las especies modelo y los peces planos.

#### IV.4.1. Anotación, asignación de términos GO y zonas UTRs

##### IV.4.1.1. Anotación

Con objeto de anotar las secuencias que portan los 194 microsatélites éstas, fueron comparadas con las secuencias génicas depositadas en la base de datos del GenBank mediante el programa BLASTx. Los resultados obtenidos, se muestran en el **Anexo XII**.

Se encontró homología para 29 secuencias microsatélites (15.0%) de las cuales, como era previsible, 2 (6.9%) procedían de las genotecas realizadas y 27 (93%) procedían de la base de datos de ESTs del lenguado. Tanto las especies, como el gen resultante en la búsqueda, fueron muy variados, encontrándonos homologías con secuencias de especies de peces como tetraodon, danio, fugu, salmón y tilapia, además de otros peces planos como el rodaballo, el halibut e incluso el propio lenguado senegalés.

##### IV.4.1.2. Términos GO

Los términos GO se asignaron a las secuencias anotadas utilizando el software AmiGO v.1.8 (<http://www.geneontology.org/>) (Camon y col., 2004). De todas ellas, podemos destacar:

i) Procesos biológicos en 19 microsatélites (70.4%): fosforilación (21.0%); biosíntesis y degradación de lípidos (15.8%) y transporte (15.8%).

ii) Funciones moleculares en 24 microsatélites (88.9%): estructura de membrana (29.2%) y transporte de membrana (20.9%);

iii) Componentes celulares en 15 microsatélites (55.6%): membrana y retículo endoplasmático (53.3%); ribosomas (20%); citoplasma (20%); núcleo (10%).

Los resultados completos, obtenidos en esta búsqueda, se demuestran en el **Anexo XIII**.

##### IV.4.1.3. Zonas UTR

Se localizaron las repeticiones microsatélites de las 29 secuencias con anotación en las regiones traducidas y no traducidas (UTRs) de las secuencias génicas, los resultados obtenidos se detallan de nuevo, en el **Anexo XIII**.

La **Tabla 14** muestra los porcentajes de microsatélites obtenidos para cada zona, así como su relación con el tipo de motivo repetido.

Motivo	Región traducida (=%)	Región 3'-UTR (=%)	Región 5'-UTR (=%)
<i>Di-</i>	-	2	16 (69.6)
<i>Tri-</i>	1	2	6 (26.1)
<i>Tetra-</i>	-	-	1 (4.3)
<i>Hexa-</i>	1	-	-
Total	2 (6.9)	4 (13.8)	23 (79.3)

**Tabla 14:** Número de microsatélites obtenidos y clasificados según el motivo repetido y la región de localización.

Todos los microsatélites con motivo dinucleótido se localizaron en las zonas UTRs (18 de los 23 analizados). En cambio los trinucleótidos se pudieron localizar tanto en regiones traducidas como en UTRs. Dentro de la zona traducida se localizaron dos microsatélites: el EST-5, con repetición hexanucleótida y con anotación de “complement C1q-like protein 2-like *Danio rerio*” y el Mss32 un trinucleótido con anotación “semaphorin 6db *Danio rerio*”.

#### IV.4.2. Conservación de las secuencias de microsatélites de lengüado en otras especies de peces planos

##### IV.4.2.1 Búsqueda de homología

Un total de 194 secuencias de microsatélites (118 de nuestras genotecas y 74 de la base ESTs) se compararon con las disponibles en las bases de datos ESTs del rodaballo (6.170 secuencias), la platija (13.869 secuencias) y el halibut (20.886 secuencias) desarrolladas en diferentes proyectos (ver apartado III.6.4.).

Tras esta búsqueda, 55 de ellas (28.4%) presentaron homología, mientras que el resto, 139 (71.64%), no dieron lugar a coincidencias de acuerdo con los parámetros considerados por nosotros. De las secuencias con homología, 10 (18.2%) provenían de las genotecas y 45 (81.8%) correspondían a secuencias procedentes de la base de datos de ESTs del lengüado.

Se realizó una primera clasificación de las secuencias en función del número de especies en donde se encontrara la homología: compartida por las tres especies (rodaballo, platija y halibut), por dos (cualquiera de ellas), o presente sólo en una de las especies (**Tabla 10**).

Tipo	Total	3 especies (=%)	2 especies (=%)	1 especies (=%)
Genotecas	10	3 (30.0)	2 (20.0)	5 (50.0)
ESTs	45	14 (31.1)	15 (33.3)	16 (35.55)
Total	55	17 (30.9)	17 (30.9)	21(38.2)

**Tabla 10:** Resultados de las secuencias microsatélites según se encontraran en tres, dos o en una de las especies de peces planos. Los datos de cada apartado se acompañan con sus porcentajes correspondientes.

El número de secuencias homólogas encontradas en cada especie se representa en la **Tabla 11**. Los valores totales no se corresponden con la suma de los parciales, al haber secuencias de microsatélites compartidas por más de una especie, tal y como se recoge en la **Tabla 10**.

Tipo	Total	Rodaballo (=%)	Platija (=%)	Halibut (=%)
Genotecas	10	6 (60.0)	7 (70.0)	5 (50.0)
ESTs	45	28 (62.2)	28 (62.2)	32 (71.1)
Total	55	34 (61.2)	35 (63.6)	37 (67.3)

**Tabla 11:** Resultados de la búsqueda de homología de las secuencias microsatélites de lenguado en otras especies de peces planos, clasificados según su procedencia y la especie analizada. Los datos de cada apartado se acompañan con sus porcentajes correspondientes.

#### IV.4.2.2. Conservación y evolución del motivo microsatélite

Una vez obtenidas las coincidencias de los microsatélites estudiados con las bases de datos de ESTs de otras especies de peces planos, analizamos la conservación del motivo microsatélite de las 55 secuencias que presentaron homología. Así, 22 de ellas (40% -todas procedentes de la base de datos ESTs) conservaban las repeticiones microsatélites en las otras especies (**Tabla 12**). Estos 22 microsatélites se clasificaron en función de si mantenían el número de repeticiones o no, y de si la repetición era perfecta o imperfecta (**Tabla 13**).

	Rodaballo	Platija	Halibut
Repetición microsatélite conservada (22)	10	11	12
Repetición microsatélite no conservada (33)	30	26	24
Total (55)	40	37	36

**Tabla 12:** Número de secuencias que conservan la repetición microsatélite o no, en rodaballo, platija y halibut.

VARIABILIDAD		Rodaballo		Platija		Halibut	
Lenguado		Mismo tamaño	Distinto tamaño	Mismo tamaño	Distinto tamaño	Mismo tamaño	Distinto tamaño
Monomórficos			2		2		4
Polimórficos			8	1	8		8
EVOLUCIÓN		Rodaballo		Platija		Halibut	
Lenguado	Otra especie	Monomór.	Polimór.	Monomór.	Polimór.	Monomór.	Polimór.
Perfecto	Perfecto		1	1	2	1	1
Perfecto	Imperfecto		5		3		2
Imperfecto	Perfecto	0	0	0	0	0	0
Imperfecto	Imperfecto	2	2	1	4	3	5

**Tabla 13:** Análisis de las repeticiones microsatélite (22 secuencias) conservadas en rodaballo, platija y/o halibut y clasificadas según la variabilidad y la evolución que presentan en estas especies (Monomór: monomórficos; Polimór: polimórficos).

Con respecto a la variabilidad de los microsatélites, se observa una tendencia de los polimórficos en lenguado a presentar un tamaño distinto, en cuanto al número de repeticiones, en el resto de especies (21 microsatélites, 95.5%).

Con respecto a la evolución del motivo del microsatélite, la mayoría de microsatélites polimórficos y perfectos en el lenguado se encontraron como imperfectos en las demás especies (6 microsatélites, 28.6%), mientras que los microsatélites polimórficos e

imperfectos en el lenguado se mantenían imperfectos en el resto de especies (7 microsátelites, 33.3%).

Las Figuras 6, 7 y 8 muestran algunos ejemplos de alineamientos de los microsátelites conservados en otras especies de peces planos:

```

HALIBUTDT806471      GCACGAGCCGAGGACATAAAATATAGAAAACCTGCTGAGTGCCT-AGTG----- 212
RODABALLOFE946336   GCGTGAGCCGAGGACATAAAATATAGAAAACCTGCTG--TGCGC-TGTG----- 212
PLATIJA_X284638      GCACGAGGTGAGGACATAGATATAGGAAGCTGCTGTGTGCGC-TGTG----- 67
LENGUADOEST22       GTTTGCGCTGACAACATAAAATATAGAAAACCTACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTTGT 231
* * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HALIBUTDT806471      GAAC-----TCTGGGGTTTCAGATGAGTCGTC-----GTCTGAGGCTCAGT-GGAGG 258
RODABALLOFE946336   GAAC-----TCTGGGGTTTCAGATGCGTCGCT---GGAGGCTGAGGCTCAGT-GGAGG 262
PLATIJA_X284638      GAAC-----TCTGGGG-TTCAGATGAGTCGTCCTCTGGAGGCTGAGGCTCAGT-GGAGG 119
LENGUADOEST22       GCACGGTGGACTGGGAATACAG--GAGTCGGCT---GGAGGCTGAGGCTCAATTAAGG 286
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HALIBUTDT806471      AATGGAAGGAGGGGCTGTG-----TTTTTACTCGGTGAGGCCGAGCTTCTTCTTCAGG 311
RODABALLOFE946336   AATGGGGGGGGGGGGGG-----TTTTACTGTGAGGCCAAGCTTCTTCTTCAGA 312
PLATIJA_X284638      AATGGAAGGAGGGGCTGTG-----TTTTTACTCGGTGAGGCCGAGCTTCTTCTTCAGG 172
LENGUADOEST22       AATG-AAGGAGAGGCTGAGTTTTTTTTTTTTTACTCTGTGAGGCCGAGCTTCTTCTTCAGG 345
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HALIBUTDT806471      GACTCGGGCATCTCGGGGGAGGGGGACGGGGCAGGCGGAAGTAGACCTTGACTGAGTGC 371
RODABALLOFE946336   GACTCTGGCATCTCGGGGGAGGGGGACGGGGCAGGCGAAAGTACACCTTGACAGAGTGC 372
PLATIJA_X284638      ACNTCGGGCATCTCGGGGGAGGGGGCCGGGGCAGGCGGAAGTAGACCTTGACTGAGTGC 232
LENGUADOEST22       GACTCGGGCATCTCGGGGGAGGGGGACGGGGCAGGCGGAAGTACACCTTGACGGAGTGC 405
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

**Figura 6:** Alineamiento secuencia EST-22 con microsátelite *polimórfico y perfecto* en lenguado y conservado en otras especies con *diferente tamaño e imperfecto*. Región microsátelite marcado en rojo.

```

PLATIJA_U090937      TGGTCAGCACGAGGGTC-TGTCACGATCAGGAGCGGGGCTCCCTGAAAGCTGCCTGGAT 238
HALIBUTCN655658     TGGTCAGCACGAGGGTCGTGTACACAAGCAGGAGCGGGGCTCINTGAAAGCTGCCTGGAT 239
RODABALLOHS030650  TGGTCAGCGCAGGGTC-TGTCACAATCAGCAGCGGGGCTCCCTGAAAGCAGCCTGGAT 239
LENGUADO-EST4       TGGTCAGCACGAGGGTC-GGTCACAAGCAGGAGCGAGGCTCCCTGAAAGCAGCCTGGAT 238
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PLAT.AU090937       CTGATTGGTGAAGGTACCAGGGGTGAAACGACCGTGAAGGTGGTGGCGCCGGTGGCAGA 298
HALIBUTCN655658     CTGATTGGTGAAGGTACNTGGGGTGAACGACCGTGAAGGTGGTGGCACCCGGTGGCAGA 299
RODABALLOHS030650  CTGATTGGTGAATGTACCAGGGGTGAAACGCCATGAAGGTGGTGGCACCCGGTGGCAGA 299
LENGUADO-EST4       CTGATTGGTGAAGGTACCAGGGGTGAAACGACCATGAAGGTGTAGCACCCGGTGGCGGA 298
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AU090937            GGCGAACTTCAGCACAGCTCTCTGTCCAGTGTTCCTGGAGGAGATGACGCACACGTGAGC 358
HALIBUTCN655658     GGCGAACTTCAGCACAGCTCTCTGTCCGGTGTTCCTGGAGGAGATGACGCACACATGAGC 359
RODABALLOHS030650  GGCGAACTTCAGCACAGCTCTCTGTCCGGTGTTCCTGGAGGAGATGACGCACACATGAGC 359
LENGUADO-EST4       GGCGAACTTCAGCACAGCTCTCTGTCCAGTGTTCCTGGAGGAGATCACACACATGAGC 358
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AU090937            TGGG-TTCTCA 368
HALIBUTCN655658     TGGG-TTCTCA 369
RODABALLOHS030650  TGGG-TTCTCA 369
LENGUADO-EST4       TGGGGTTCTCA 369
***** * * * *
    
```

**Figura 7:** Alineamiento secuencia EST-4 con microsátelite *monomórfico e imperfecto* en lenguado y conservado en otras especies con *diferente tamaño e imperfecto*. Región microsátelite marcado en rojo.

```

HALIBUT_DN794634     ATCCATCCTCACCGAACGGAACCGTTT-CATTTT-AAATACACAAACAATCCAAA----
PLATIJA_FE043204     ATCCATCCTCACCGAACGGAACCGTTT-CATTTT-AAATACACAAACAATCCAAA----
RODABALLO_FE945246  ATCCATTCGACAGTTACAGGAAACATTTTCATTTTAAATACACAAACAATCCAGG---
LENGUADOEST10       ATCCATCCTCACAT---GAACACTTTTTCATTTTAAATACATGAACAATCCGACGA
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HALIBUT_DN794634     -----CCGTGTGATACAGAGTCAAACATTCATTGAGACAGGGGAGCGAGGGATGA-
PLATIJA_FE043204     -----CTGTGTGATACAGAGTCAAACATTCATTGAGACAGGGGAGCGAGGGATGGA
RODABALLO_FE945246  -----CTGCGTAATACAGAGTCAAACATTCATTGAGACAGGGGGG---GGGCCG---
LENGUADOEST10       CGACGACGACTGTGTGATACGAGTCAAACATTCATTGAGACAGGGGAGGGATGA-
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

```

HALIBUT_DN794634      -----TGGAGGAGGTGGTGGAGGAGGAGGA---GAGTGT--GGTGGTCGGG-----C
PLATIJA_FE043204     GAGAGGTGGAGGTGGTGGAGGAGGAGGAGGA---GAGTGTGGAGGTGGTCAGG-----C
RODABALLO_FE945246  -----GGAGGAAG--GTGGAGGAGGGTT---GA-----GGTGG-----C
LENGUADOEST10       -----GGAGGAGGAGGAGGAGGACGAGGACCAAGGAGTGCAGGAGGACGTGTTTGTGC
                      ***** * * ***** * * * * * * * * * *
HALIBUT_DN794634      GTCAGGACGG-----ATTC-----ACTTCTGTTCGGGAATCAGGTCGTGATGGA
PLATIJA_FE043204     GTCAGGACGG-----CTTC-----ACTTCTGGGCGGGAATCAGGTCATCGATGGA
RODABALLO_FE945246  ATCGGGGCGG-----CTTCTTTTACTTCTGGGCGGGATCAGGTCGTGATGGA
LENGUADOEST10       GTCAGGACGGTGGTCGTGGTCTTTGTTTTACTTCTGTGCAGGAATCAGGTCGTGACAGA
                      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
HALIBUT_DN794634      CTGACTTCTCCAGCTTCTTCTCCATCTCGACCAGCAGCTTGACGCGTCGACCACCAT
PLATIJA_FE043204     CTGGCCCTTCTCCAGCTTCTTCTCCATCTCGACCAGCAGCTTGACTCCGTCCACCACCAT
RODABALLO_FE945246  CTGGCCCTTCTCCAGCTTCTTCTCCATCTCGATCAGCAGCTTGATTCCGTCCACCACCAT
LENGUADOEST10       CTCTCCCTTCTCCAGCCTTCTTCTCCATCTCCACCAGCAGTTGATTCCGTCCACCACCAT
                      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figura 8:** Alineamiento secuencia EST-10 con microsatélite *polimórfico e imperfecto* en lenguado conservado en otras especies con *diferente tamaño e imperfecto*. Región microsatélite marcado en rojo.

#### IV.4.3. Estudios de sintenia

##### IV.4.3.1 Conservación de los microsatélites de lenguado en especies modelo

El desarrollo de marcadores microsatélites anclados al mapa de ligamiento en lenguado que hemos desarrollado en este trabajo, junto con la existencia de genomas completos de otras especies modelo, permite analizar la conservación de los mismos. Así, los 144 microsatélites disponibles para ser cartografiados (129 con relaciones de ligamiento y los 15 microsatélites UL) fueron contrastados mediante BLASTn con las secuencias de espinoso, tetraodon, medaka, fugu y danio que se encuentran despositadas en la base de datos de genomas Ensembl. Se seleccionaron aquellos alineamientos >80 pb con e-values <10<sup>-5</sup>.

Un total de 41 (29.9%) microsatélites analizados (13 procedentes de las genotecas y 28 de la base de ESTs) presentaron coincidencias con los genomas de especies modelo siguiendo los criterios anteriormente mencionados. Concretamente, 32 (78%) presentaban homología con espinoso, 29 (70.7%) con tetraodon, 32 (78.0%) con medaka, 38 (92.7%) con fugu y 21 (51.2%) con danio. Para la mayor parte de los microsatélites, 37 (90.2%), se encontraron *hits* en un único cromosoma. Si bien, 20 (48.8%) de ellos presentaron coincidencias en más de uno (**Tabla 18**).

LENGUADO	ESPINOSO	TETRAODON	MEDAKA	FUGU	DANIO
<b>SSRs (Est/genotecas)</b>	32 (24/8)	29 (20/9)	32 (22/8)	38 (26/12)	21 (16/5)
<b>Único cromosoma</b>	18	20	22	19	13
<b>Múltiple cromosoma</b>	14	9	10	19	8

**Tabla 18:** Resultados del Blastn realizado en las 144 secuencias de microsatélites de lenguado contra los cinco genomas de especies modelo. Se distingue los hits encontrados en un único cromosoma de los encontrados en varios cromosomas.

La **Tabla 19** muestra los microsatélites de lenguado agrupados en sus respectivos LG y su homología con los cromosomas de las especies modelo de peces estudiadas. Entre las secuencias con homología en más de una especie modelo, se encontró un único marcador presente en todas (Est-33). Es interesante destacar que este marcador, sólo presenta homología con un único cromosoma en todas ellas y que este microsatélite se encuentra asociado a una proteína ribosomal (ver **Anexo XII**). Si este análisis se realiza sin tener en cuenta a la especie danio (perteneciente a *Ostariofisios*), el número de secuencias microsatélites, que se encuentran conservadas en el resto de especies modelos (pertenecientes a *Acantopterigios*) y en un único cromosoma, aumenta hasta 6: Mss47 (genoteca), Est-28, Est-57, CSse3H07, Est-33 y CSse6A20 (ESTs). Como se puede comprobar en el **Anexo XII**, a parte de la proteína ribosomal conservada en todas las especies, de estas últimas secuencias, solo existe anotación para una de ellas, CSse3H07, correspondiente al factor de regulación del interferón.

Tal y como ha quedado reflejado en el mapa de ligamiento del lenguado (**Figura 12**), estas secuencias con homología en especies modelo, se distribuyen: 4 en LG1 y LG2, 3 en LG3, LG15 y LG17, 2 en LG9, LG10, LG11, LG13, LG25 y LG26 y uno en LG4, LG6, LG8, LG14, LG16, LG19, LG20, LG22, LG23 y LG27. Hay que destacar, que el microsatélite CSse3A04, no ligado en el mapa, presentó la misma homología que los microsatélites del grupo de ligamiento 17 (Est-13 y Est-62) en los cromosomas de las especies modelo por lo que se consideró perteneciente a este mismo grupo de ligamiento.

Es de especial relevancia destacar, que la exploración de los genomas completos de especies modelo, demuestran que algunos microsatélites presentes en el mismo grupo de ligamiento de lenguado, mapean en el mismo cromosoma en cada una de las especies modelo analizadas (**Tabla 19**). El hecho de tener los mismos marcadores ligados en distintas especies, abre la posibilidad de estudiar la conservación de su orden.

Lenguado	Espinoso	Tetraodon	Medaka	Fugu	Danio
EST-16 (LG1)	10-20	8	11-16	7-9-12	16-19-25
EST-32 (LG1)	9	17	1	4-17	1
EST-28 (LG1)	9	18	1	17	NO
Mss47(LG1)	9	18	1	17	NO
EST-42(LG2)	17	NO	5	19	NO
Mss102 (LG2)	9-12-17-19	11	5-6-23	3-9-18-19	4-6-8-11-25
Mss105 (LG2)	NO	NO	NO	19	NO
Mss131 (LG2)	NO	11	5	11-19	NO
CSse2H15 (LG3)	17-19	5	3-6	7-9-13	7-25
EST-29(LG3)	NO	NO	3	13	NO
Mss29 (LG3)	NO	8	NO	7	NO
Mss44(LG4)	1-13	12	9-13	21	NO
EST-8 (LG 6)	2-19	13	6	9-13	
EST-22(LG7)	NO	NO	23	18	4-25
EST-34 (LG7)	7	2	17-18	NO	5
EST-57 (LG8)	15	1	4	20	NO
EST-14 (LG9)	13-14	4-12	NO	6-21	5
Mss54 (LG9)	NO	4	12	6	NO
CSse3H07(LG10)	12	19	7	3	NO
Mss57(LG10)	12	9	NO	3	23
EST-2(LG11)	1-7-15	10-13-14-16	13-14-22	2-9-11-15-16	5-15
EST-33 (LG11)	18	14	24	16	20
CSse1N07 (LG13)	NO	1-3	NO	1-5-8-14-19	NO
Mss24(LG13)	4	NO	NO	NO	14

EST-27G19(LG14)	11	2-13	8	5	NO
CSse6A20(LG15)	15	10	22	2	NO
EST-10 (LG15)	15-18	10-14-16	13-22	2-16	5-13
EST-60 (LG15)	15	10	NO	2	NO
Mss32(LG16)	10-20	NO	16	7-12	16
EST-13 (LG17)	16	2-3	2-21	1-8	1-9
EST-62 (LG17)	16	2-3	21	1-8	NO
CSse3A04 UL	NO	2	21	1	9
EST-39(LG19)	5	NO	19	NO	NO
EST-15(LG20)	20	NO	16	7-15	16
EST-47(LG22)	1-7-13	NO	9-13-14	6-11-15-21	5-15
Mss84 (LG23)	4-12	9	7	3-14	NO
EST-50(LG25)	21	NO	21	1	9
Mss62(LG25)	NO	NO	NO	1	NO
EST-11 (LG26)	2-19	5-13	6-13	9-13	7
Mss64 (LG26)	2-9	5-18	3	13-17	7
EST-5(LG27)	3-7	NO	NO	2-20	20

**Tabla 19:** Homología que relaciona los grupos de ligamiento de lenguado (ordenados siguiendo el mapa) con los cromosomas de las especies modelo de peces: espinoso, tetraodon, medada, fugu y danio.

Para llevar a cabo este análisis de sintenia, se han considerado exclusivamente aquellos grupos de ligamiento de lenguado con tres microsatélites que presentaran homología en el mismo cromosoma de al menos dos de las especies modelo. Cuatro regiones conservadas que se corresponden con los grupos de ligamiento LG1 (Est-32, Est-28 y Mss47), LG2 (Est-42, Mss102 y Mss131), LG15 (CSse6A20, Est-10 y Est-60) y LG17 (Est-13, Est-62 y CSse3A04) fueron seleccionadas por cumplir esos criterios (**Tabla 20**).

Lenguado	Espinoso	Tetraodon	Medaka	Fugu	Danio
EST-32 (LG1)	9	-	1	17	1
EST-28 (LG1)	9	18	1	17	-
Mss47(LG1)	9	18	1	17	-
EST-42(LG2)	17	-	5	19	-
Mss102 (LG2)	17	11	5	19	-
Mss131 (LG2)	-	11	5	19	-
CSse 6A20(LG15)	15	10	22	2	-
EST-10 (LG15)	15	10	22	2	-
EST-60 (LG15)	15	10	-	2	-
EST-13 (LG17)	16	2	21	1	9
EST-62 (LG17)	16	2	21	1	-
CSse3A04 UL	-	2	21	1	9

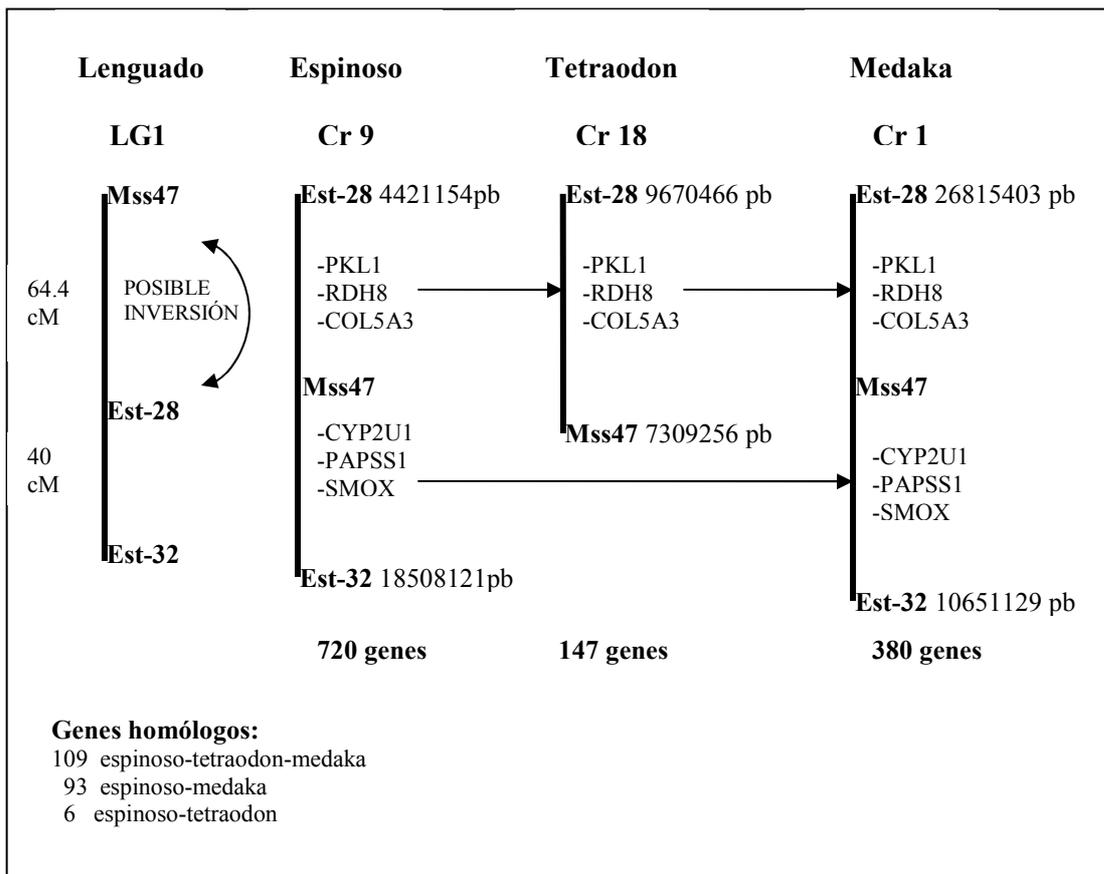
**Tabla 20:** Las cuatro regiones conservadas, representadas por los grupos de ligamiento de lenguado y los cromosomas de las especies modelo.

Para el estudio de sintenia en estas regiones, se buscaron las posiciones de los microsatélites de lenguado en los cromosomas de las especies modelo espinoso, tetraodon y medaka.

El genoma de *fugu* tiene un ensamblaje que aún no agrupa las secuencias en cromosomas por lo que quedó excluido del análisis. Por otra parte, se encontró poca homología con las secuencias de danio por lo que también prescindimos de esta especie para nuestros análisis.

Se estudiaron los genes presentes en estas regiones así como el orden que mantenían dentro de los cromosomas de las especies modelo.

La primera región conservada corresponde al LG1 de lenguado y está definida por la presencia de los microsatélites Est-32, Est-28 y Mss47 que comprenden una región cuyo tamaño estimado es de 104.4 cM (**Figura 13**). Estos tres marcadores fueron encontrados en espinoso (en un total de 14 Mpb apróx.) y en medaka (total de 16 Mpb apróx.), mientras que el microsatélite Est-32 estaría ausente en el genoma del tetraodon (siendo la distancia entre los otros dos restantes de 2,3 Mpb). El orden de estos marcadores se mantiene en todas las especies modelo analizadas. Los marcadores Mss47 y Est-28 tienen sus posiciones relativas invertidas en lenguado, lo que sugeriría que esta región habría sufrido una inversión local en esta especie (**Figura 13**).



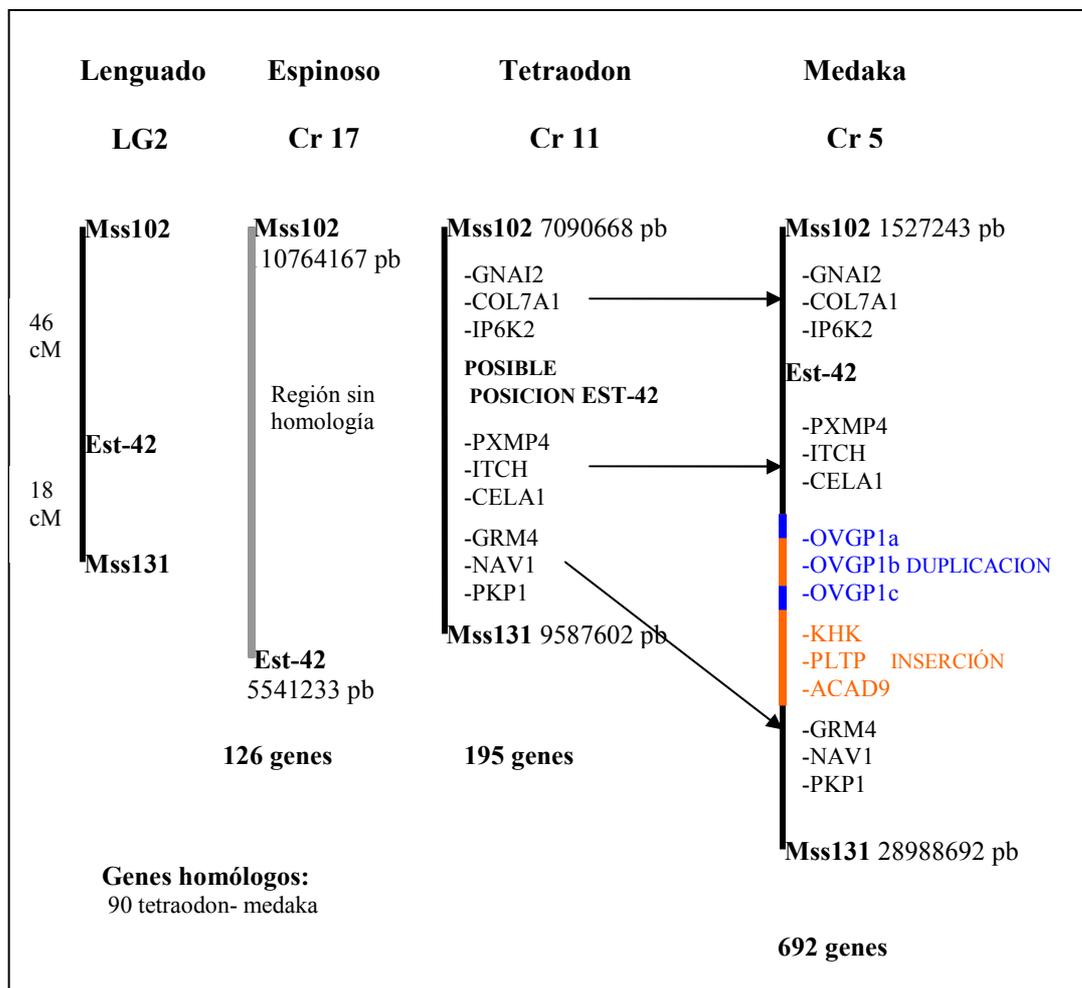
**Figura 13:** Región conservada de los microsatélites Mss47, Est-28 y Est-32, pertenecientes a LG1 de lenguado en los cromosomas Cr9 de espinoso, Cr18 de tetraodon y Cr1 de medaka. Se indica el tamaño y el número de genes presentes en esta región para cada cromosoma modelo, así como los genes homólogos encontrados entre estas especies.

En esta región, existen 720 genes anotados en espinoso, 147 en tetraodon y 380 en medaka. Espinoso, tetraodon y medaka comparten 109 de ellos, además el orden de los mismos se conserva en las tres especies. Entre los cromosomas de espinoso y medaka existen 93 genes compartidos (homólogos), cuyo orden también se encuentra conservado (**Figura 13**). Todo ello, sugeriría la presencia de dos grandes bloques sinténicos presentes en esta región.

Una segunda región conservada de unos 64 cM, correspondiente al LG2 de lenguado, presenta los marcadores Mss102, Est-42 y Mss131, conservados en una región de 27 Mpb de medaka (ver **Figura 14**). En espinoso sólo Mss102 y Est-42 aparecen ligados (en un total de 5Mpb apróx.), mientras que en tetraodon lo están, los microsatélites Mss102 y Mss131 (comprendiendo una región de 2,5 Mpb apróx.). Esta región incluye 126, 195 y 692 genes en espinoso, tetraodon y medaka, respectivamente. En espinoso no ha sido posible detectar homología con el resto especies. Sin embargo, existe un bloque sinténico que incluye 90 genes homólogos (del Mss102 al Mss131) entre tetraodon y medaka (ver **Figura 14**).

El aumento en tamaño en pb de la región comprendida entre el marcador Est-42 y Mss131 encontrada en el Cr5 de medaka (29 Mpb apróx. y 692 genes), se puede deber a fenómenos de duplicación de genes e inserción de nuevos que tienen lugar en esta región.

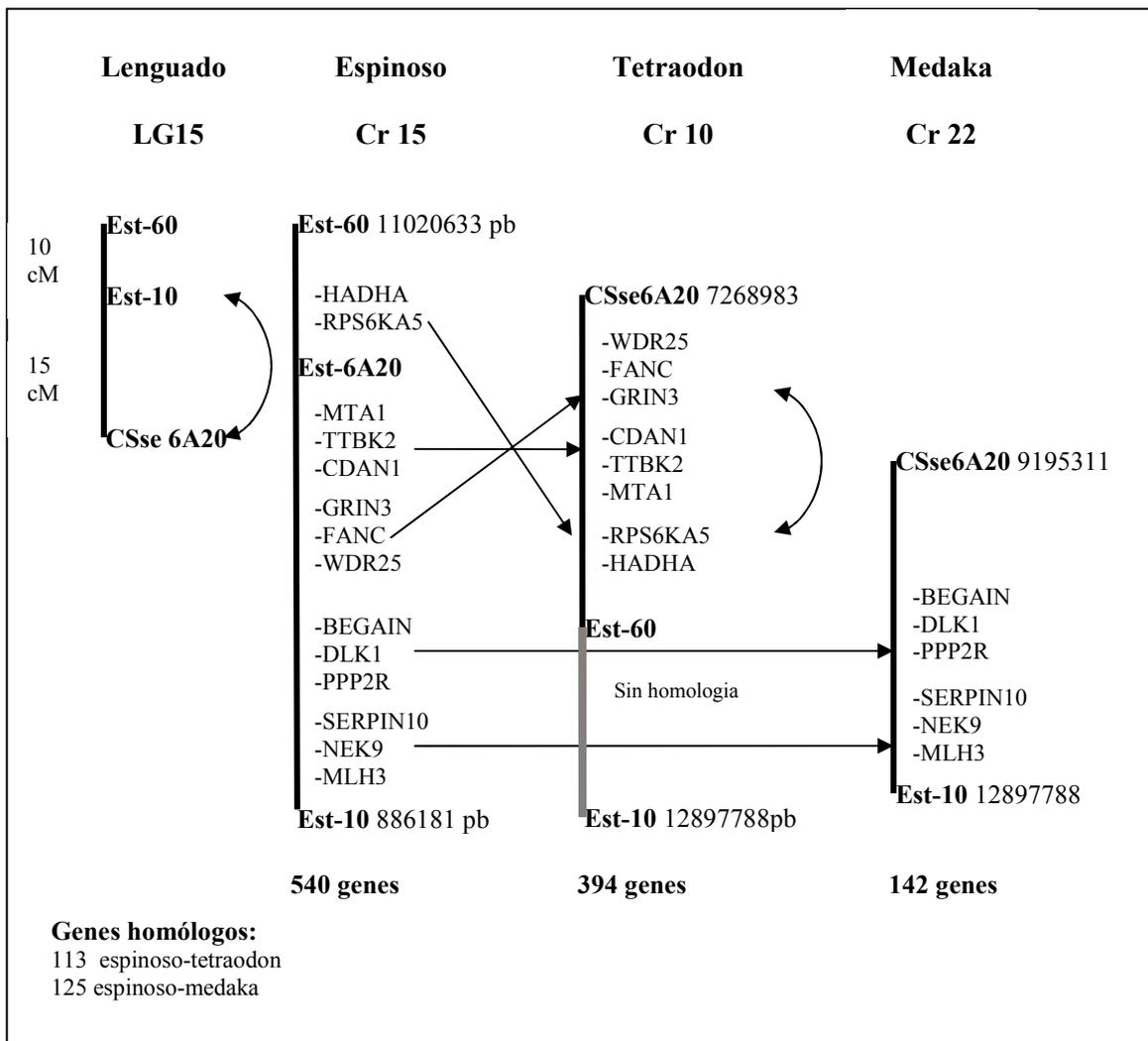
Esto se demuestra en la detección de estos fenómenos con la presencia de genes duplicados y adicionales (**Figura 14**).



**Figura 14:** Región conservada de los microsatélites *Mss102*, *Est-42* y *Mss131*, pertenecientes a LG2 de lenguado en los cromosomas Cr17 de espinoso, Cr11 de tetraodon y Cr5 de medaka. Se indica el tamaño y el número de genes presentes en esta región para cada cromosoma modelo, así como los genes homólogos encontrados entre estas especies.

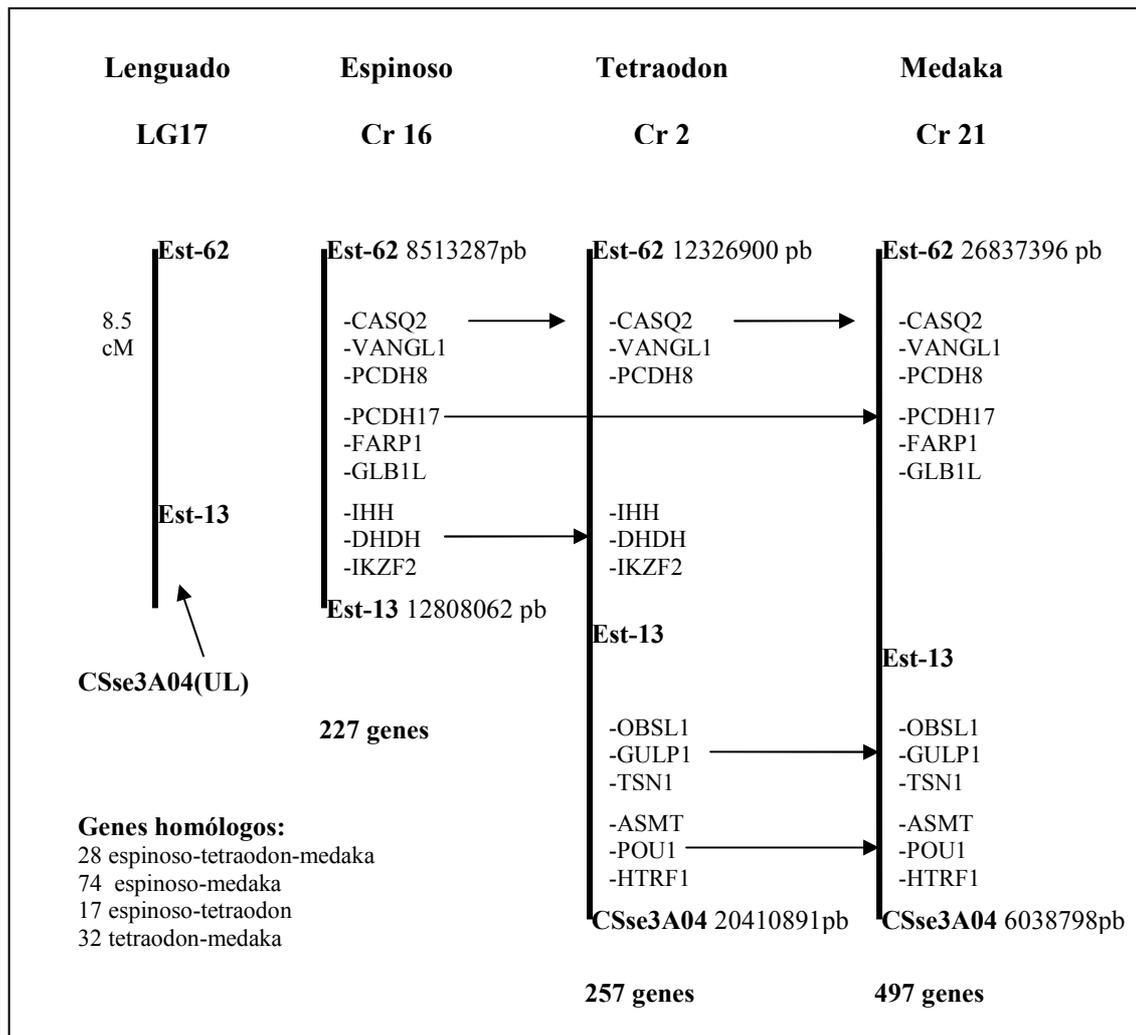
La tercera región conservada, correspondiente al LG15 de lenguado, está comprendida por los microsatélites *Est-60*, *Est-10* y *CSse6A20* y con un tamaño estimado de 25 cM (**Figura 15**). Estos microsatélites se encontraron en el espinoso en una región del Cr15 de 10 Mpb apróx. y en el tetraodon en el Cr10 en 5,6 Mpb apróx. En el medaka, el microsatélite *Est-60* no se localizó, ocupando los dos restantes (*Est-10* y *CSse6A20*) 3,7 Mpb apróx.

Esta región, contiene 540 genes anotados en el espinoso, 394 en tetraodon y 142 en medaka. Entre espinoso y tetraodon existen 113 genes homólogos en la región entre los microsatélites *Est-60* y *CSse6A20*. Además en el tetraodon no se han encontrado secuencias compartidas con otras especies entre los microsatélites *Est-60* y *Est-10*. El espinoso comparte con medaka un bloque sinténico entre los microsatélites *CSse6A20* y *Est-10* con 125 genes compartidos (**Figura 15**).



**Figura 15:** Región conservada de los microsatélites Est-60, CSse6A20 y Est-10, pertenecientes a LG15 de lenguado en los cromosomas Cr15 de espinoso, Cr10 de tetraodon y Cr22 de medaka. Se indica el tamaño y el número de genes presentes en esta región para cada cromosoma modelo, así como los genes homólogos encontrados entre estas especies.

Las posiciones de los microsatélites Est-60 y CSse6A20 se encuentran invertidas en tetraodon, lo que podría indicar una inversión local en esta especie. Por su parte, los microsatélites CSse6A20 y Est-10 mantienen sus posiciones en el espinoso y medaka, lo que sugeriría que esta región habría sufrido una inversión local en lenguado (**Figura 15**).



**Figura 16:** Región conservada de los microsatélites Est-62, Est-13 y CSs3A04, pertenecientes a LG17 de lenguado en los cromosomas Cr16 de espinoso, Cr12 de tetraodon y Cr21 de medaka. Se indica el tamaño y el número de genes presentes en esta región para cada cromosoma modelo, así como los genes homólogos encontrados entre estas especies.

Esta cuarta y última región de lenguado conservada en las especies modelo, se corresponde con el LG17 de lenguado y está definida por los microsatélites Est-62 y Est-13. En este grupo, cabe la posibilidad de posicionar al microsatélite CSs3A04 (UL) que no se pudo incorporar al mapa. El tamaño estimado ocupado por los dos restantes microsatélites es de 8.5 cM (Figura 16).

En el espinoso esta región ocupa 4 Mpb y está comprendida entre los microsatélites Est-62 y Est-13, el microsatélite CSs3A04 está ausente en esta especie. En el tetraodon y medaka se encontraron los tres marcadores ocupando una región de 81 Mpb y 21Mpb, respectivamente. El orden de estos tres microsatélites, se mantienen en las tres especies, por lo que presumiblemente el microsatélite CSs3A04 estaría situado a continuación del Est-13 en lenguado (Figura16).

En esta región hay 227 genes anotados en el espinoso, 257 en tetraodon y 497 medaka, siendo 28 los genes homólogos entre ellos. Espinoso y medaka comparten 74 genes.

El espinoso comparte esta con el tetraodon 17 genes. Y por último, existe 32 genes homólogos entre tetraodon y medaka (**Figura 16**).

Tras esta primera búsqueda de sintenia y resumiendo las homologías encontradas en estas cuatro regiones, hemos encontrado que 137 genes homólogos presentes en todas las especies, 36 genes entre espinoso-tetraodon, 122 entre tetraodon-medaka y por último 292 entre espinoso-medaka siendo estas dos especies las comparten un mayor número de genes.

#### **IV.4.3.2. Análisis de sintenia con especies de peces planos**

Un aspecto que queríamos abordar finalmente en esta Tesis, era el de relacionar los distintos grupos de ligamiento de lenguado con los grupos de ligamiento de otras especies de peces planos para los que ya se han realizado mapas de ligamiento, tales como rodaballo (Bouza y col., 2012), platija (Castaño-Sánchez y col., 2010) y halibut (Reid y col., 2007).

Este análisis, es de interés desde el punto de vista aplicado, pues las regiones detectadas en otras especies de peces planos (con presencia de QTLs, marcadores asociados al sexo,...) podrían estar conservadas en el lenguado. Pero además, desde el punto evolutivo, permite estudiar las reorganizaciones cromosómicas que ha sufrido este grupo de peces, y además aporta datos sobre la dinámica de sus genomas. Adicionalmente, estas comparaciones nos pueden indicar, posibles asociaciones de grupos de ligamiento pequeños y marcadores que no han podido ligarse a grupos mayores. Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron dos estrategias. La primera de ellas, era la de tener marcadores cartografiados y compartidos entre las especies de peces planos y la segunda, relacionar los grupos de ligamiento a través de sus homologías con cromosomas de especies modelo de peces.

En cuanto a la primera estrategia, se ha descrito frecuentemente que la amplificación cruzada entre especies de peces planos es escasa, debido, a la poca conservación que presentan las regiones flanqueantes de los microsatélites, por lo que los mapas de ligamiento de estas especies, comparten pocos marcadores. A pesar de ello, en esta memoria, se han optimizado 16 microsatélites procedentes de otras especies: 9 de rodaballo, de los cuales dos incluyeron en el mapa del lenguado (Sma-E273, Smax-02), 6 de platija de los que 2 (Poli 129TUF y Poli 200TUF) se integraron en el mapa y uno de halibut en el que no se pudo realizar el análisis de ligamiento ya que resultó homocigoto en las hembras de familias FH1 y FH2. Con respecto a los microsatélites de rodaballo, Sma-E273 aunque pudo integrarse en el LG5 del mapa de lenguado, no fue localizado finalmente en el mapa del rodaballo y el Smax-02 q no presentó ligamiento (UL) en el lenguado. Debido a estas dos circunstancias, no pudieron ser utilizados en estudios de sintenia entre estas especies. Con respecto a los microsatélites de platija tanto Poli 129TUF como Poli 200TUF se han podido integrar en el mapa de lenguado, donde aparecen ligados en el LG8, así como en el mapa de platija en este caso en el LG9.

Para tratar de paliar esta deficiencia en cuanto al número de marcadores comunes, hemos usado una segunda estrategia, utilizando los genomas de referencia de las especies modelo de peces y los datos de homología obtenidos para los 129 microsatélites cartografiados en el lenguado (ver apartado anterior). En este estudio prescindimos de danio, por no presentar suficientes homologías, mientras que los resultados obtenidos en las restantes especies modelo se utilizaron para comparaciones con los grupos de ligamiento de rodaballo (Bouza y col., 2012), platija y halibut en, Castaño-Sánchez y col., 2010 y Reid y col., 2007. Para establecer estas relaciones entre los grupos de ligamiento de las cuatro especies de peces planos (lenguado, rodaballo, platija y halibut) se siguió el criterio de

seleccionar aquellos de lenguado con homologías presentes en único cromosoma, en más de una especie modelo modelo y coincidentes con el cromosoma del resto de peces planos (**Tabla 19**).

Las relaciones de homología obtenidas se describen en la **Tabla 20**. Este estudio comparativo permitió, establecer las posibles relaciones de quince grupos de ligamiento de lenguado con catorce de rodaballo, ocho de platija y diez de halibut. Todos ellos dieron lugar a coincidencias únicas, por lo que no podemos inferir reordenaciones cromosómicas mayores.

Con la inclusión de nuevos marcadores al mapa de ligamiento del lenguado, se podrían detectar posibles reordenaciones cromosómicas que han dado lugar a una reducción numérica en lenguado ( $2n=42$ ), dos menos que el rodaballo y platija (ambos con  $2n=44$ ) y seis que el halibut (con  $2n=48$ ).

Lenguado	Espinoso	Tetraodon	Medaka	Fugu	Rodaballo (Bouza y col., 2012 )	Platija (Castaño y col., 2010)	Halibut (Reid y col., 2007)
<b>LG1</b>	Cr 9	Cr 18	Cr 1	Cr 17	<b>LG9</b>	<b>LG7</b>	<b>LG11</b>
<b>LG2</b>	Cr17	Cr 11	Cr 5	Cr19	<b>LG11</b>	<b>LG15</b>	<b>LG15</b>
<b>LG3</b>	-	Cr 5	Cr3	Cr13	<b>LG4</b>	-	<b>LG6</b>
<b>LG4</b>	-	Cr 8	-	Cr21	<b>LG12</b>	<b>LG10</b>	<b>LG10</b>
<b>LG6</b>	-	Cr 13	Cr 6	-	<b>LG6</b>	<b>LG11</b>	<b>LG3</b>
<b>LG9</b>	-	Cr 4	Cr12	Cr 6	<b>LG14</b>	<b>LG9</b>	<b>LG13</b>
<b>LG10</b>	Cr12	Cr9	Cr7	Cr3	<b>LG10</b>	<b>LG1</b>	<b>LG2</b>
<b>LG11</b>	Cr18	Cr14	Cr24	Cr16	<b>LG23</b>	-	<b>LG1</b>
<b>LG14</b>	Cr11	-	Cr8	Cr5	<b>LG13</b>	-	-
<b>LG15</b>	Cr 15	Cr 10	Cr 22	Cr 2	<b>LG3</b>	<b>LG2</b>	<b>LG7</b>
<b>LG17</b>	Cr 16	Cr 2	Cr 21	Cr 1	<b>LG20</b>	<b>LG20</b>	<b>LG12</b>
<b>LG19</b>	Cr5	-	Cr19	-	<b>LG21</b>	-	-
<b>LG20</b>	Cr20	-	Cr16	-	<b>LG2</b>	-	-
<b>LG23</b>	-	Cr 9	Cr 7	-	<b>LG10</b>	<b>LG1</b>	<b>LG2</b>
<b>LG25</b>	-	-	Cr21	Cr 1	<b>LG20</b>	-	-

**Tabla 20:** Correspondencia de los grupos de ligamiento de lenguado con los grupos de ligamiento de otros peces planos mediante las homologías encontradas en los cromosomas de las especies modelo.

## **V. DISCUSIÓN**

---

## V.1. Desarrollo de marcadores microsatélites

Los microsatélites, debido a su sencilla amplificación, herencia codominante, alta densidad en los genomas y elevada variabilidad, se encuentran entre los marcadores moleculares más empleados en la actualidad para numerosos estudios, entre ellos, la construcción de mapas de ligamiento (Danzman y Gharbi, 2001). Antes de iniciar este trabajo, los microsatélites desarrollados en el lenguado eran muy escasos y anónimos. Concretamente, sólo se contaban con 20 descritos por Porta y col., (2004) y Funes y col., (2004). Por tanto, y debido a la gran cantidad de marcadores necesarios para construir un mapa genético, se hizo necesario el desarrollo de nuevos microsatélites y recurrir a distintas fuentes como la construcción de genotecas enriquecidas, búsqueda en bases de datos de ESTs y amplificaciones cruzadas con especies próximas.

### V.1.1. Genotecas enriquecidas

A pesar del tiempo y dedicación que requiere, el método más común que se viene usando para la obtención de una gran cantidad de microsatélites es la construcción de genotecas enriquecidas con microsatélites (Wang y col., 2008) a partir de ADN digerido y posteriormente enriquecimiento con oligos biotinilados (Kandpal y col., 1994; Brown y col., 1995).

Para obtener la máxima variabilidad de microsatélites del genoma del lenguado senegalés se han utilizado repeticiones de dinucleótidos y trinucleótidos individuales y combinados entre ellos. De las 600 secuencias obtenidas, en 169 (28.2%) se encontraron microsatélites con más de tres repeticiones y con regiones flanqueantes de suficiente calidad como para diseñar los oligos. Tras el proceso de optimización de las amplificaciones quedaron disponibles 118 microsatélites

El rendimiento obtenido (considerando desde la secuenciación de 600 clones hasta la obtención de secuencias con microsatélite optimizados) en la construcción de librerías enriquecidas (19.7%) se puede considerar satisfactorio, teniendo en cuenta la dificultad y coste de la técnica. En estudios realizados en el mismo lenguado senegalés este rendimiento varió del 10.5% al 69.1% obtenidos por Funes y col., y Porta y col., (2004) respectivamente. En otras especies de peces planos, como el rodaballo, el rendimiento que se obtuvo realizando genotecas enriquecidas varió desde 29.4% en Pardo y col. (2007), 10.3% en Fortes (2008) y 43.3% en Ruan y col., (2011), mientras que en platija fue del 33.2% en Coimbra y col., (2003).

Los microsatélites obtenidos, según la clasificación de Weber (1990), fueron en un 33.9% perfectos, 42.4% imperfectos y 23.7% compuestos. Estos resultados difieren de los obtenidos en otras especies de peces, ya que, en nuestro caso, se han obtenido una mayor proporción de microsatélites imperfectos mientras que, en otras especies, son los microsatélites perfectos los que predominaron en las genotecas enriquecidas. Así, por ejemplo, en el lucio (Wang y col., 2008) se obtuvo un 63.2% perfectos, un 23.0% imperfectos y un 13.9% compuestos. Proporción en el rodaballo (Pardo y col., 2007) donde se obtuvieron 71% perfectos, 21.5% imperfectos y 7.5% compuestos.

De los 118 microsatélites analizados un 62.7% están formados por dinucleótidos, 28.0% por trinucleótidos, 3.4% por tetranucleótidos y 0.8% por pentanucleótidos, por último, y en un 6.8% el motivo era combinado. Aunque entre los distintos genomas de las

especies existen diferencias en el motivo repetido así como en el número de repeticiones del mismo, en el lenguado, al igual que ocurre generalmente en Vertebrados, la repetición más abundante es el dinucleótido CA/GT seguido de AG/CT (Brenner y col., 1993; Chistiakov y col., 2005). Así, en librerías construidas en *Solea vulgaris* (Garoia, 2006), en rodaballo (Fortes, 2008) y en halibut (Reid y col., 2005) se empleó la repetición CA, además, en otros estudios realizados en el rodaballo se construyeron librerías enriquecidas con motivos de dinucleótidos y trinucleótidos obteniéndose una mayoría de microsatélites dinucleótidos concretamente un 88.8% y un 73.2% (Pardo y col., 2007; Ruan y col., 2011).

Se ha observado una correlación negativa entre el tamaño del motivo repetido y el número de copias, siendo menor el número de copias que presenta cuanto mayor es el tamaño del motivo repetido. Esto, posiblemente, es debido a una mayor presión selectiva contra las unidades de mayor longitud (Samadi y col., 1998), esto mismo ocurre en el rodaballo (Pardo y col., 2007; Ruan y col., 2011), lo que conduce a pensar que los dinucleótidos sean la base del origen y la evolución de las secuencias repetidas (Ruan y col., 2011).

### V.1.2. Microsatélites en ESTs

Durante la última década, el uso de microsatélites derivados de ESTs se ha incrementado en la mayoría de las especies de interés. Al formar parte de secuencias génicas, las ESTs suelen estar más conservadas y han demostrado su utilidad en estudios de mapas de ligamiento, en la detección QTLs y en el análisis comparativo entre organismos evolutivamente diferentes. Así, en peces planos, podemos destacar los desarrollados en rodaballo (Chen y col., 2007; Bouza y col., 2007, 2008, 2011; Ruan y col., 2010; Navajas y col., 2012), en tongue solea (*Cynoglossus semilaevis*) (Sha y col., 2011, Liu y col., 2007), en la platija (Kang y col., 2008) y en el halibut (Douglas y col., 2007).

En el lenguado senegalés, la existencia de una base de datos de secuencias ESTs (Cerdá y col., 2008) ha servido para ampliar el número de microsatélites en este trabajo. Este tipo de secuencias, y al presentar regiones codificadas están muy conservadas, por lo que son muy útiles en estudios de genómica comparada con especies modelo u otros peces planos puede dar información acerca de genes implicados en mecanismos fisiológicos importantes. A partir de estas secuencias, se escogieron microsatélites con repeticiones de dinucleótidos a partir de 4 repeticiones y tri- y tetranucleótidos a partir de 3 repeticiones, y según la calidad de sus regiones flanqueantes. A partir de estos criterios se diseñaron oligos para un total de 84 secuencias con microsatélite con un resultado de amplificación del 90.47%, en otras especies como la carpa común se ha obtenido un 90% de amplificación (Wang y col., 2007) y en el rodaballo se ha obtenido una amplificación del 66.4% o 43.9% (Navajas y col., 2012; Bouza y col., 2008).

El tipo de microsatélite obtenido según la clasificación de Weber (1990) fue de 57.9% para microsatélites perfectos, 25% imperfectos y 17.1% por microsatélites compuestos.

Con respecto a la repetición del motivo microsatélite ESTs, en el genoma del lenguado predominan los dinucleótidos con un 57.9% dinucleótidos, un 19.5% los tri-, un 7.9% los tetra-, y un 1.3% los hexanucleótidos, por último un 2.26% de motivo microsatélite combinado. En otras especies estudiadas a partir de secuencias ESTs de nuevo el dinucleótido es el más abundante, por ejemplo en carpa común se obtiene un 37.2% (Wang y col., 2007).

Al igual que en las librerías enriquecidas hemos obtenido una mayor proporción de microsatélites dinucleótidos. En cambio, las repeticiones de trinucleótidos están poco conservadas, aún formando parte de secuencias en la codificación de proteínas, ya

que grandes tramos formados por trinucleótidos, probablemente fruto de la mutación, provocan inestabilidad durante la meiosis ó gametogénesis (Metzgar y col. 2000; Ruan y col., 2011) además, los ácidos nucleicos contienen menor proporción del trinucleótido AUG alrededor de los codones de inicio en la transcripción ya que se piensa que puedan influir negativamente sobre ellos (Saito y Tomita, 1999).

El estudio de la distribución de los trinucleótidos en el genoma podría aportar datos interesantes sobre las mutaciones y la evolución del genoma (Ruan y col., 2011).

### V.1.3. Amplificación cruzada

La amplificación cruzada de microsatélites entre especies estrechamente relacionadas es de gran importancia en la construcción de una mapa de ligamiento ya que supone un ahorro en recursos (tiempo y costes durante el diseño) al ser regiones muy conservadas (Rajapakse y col., 2001; Pínera y col., 2006) e indican las posibles relaciones estructurales y funcionales entre los genomas (Kang y col., 2008), así por ejemplo se ha demostrado que el uso de microsatélites de platija en el halibut (dos especies de peces planos) ha permitido identificar grupos de ligamiento con microsatélites comunes en las dos especies (Reid y col., 2007) y además con el actual mapa de ligamiento de platija (Kang y col., 2008) que aporta nuevos microsatélites la correspondencia entre los grupos de ligamiento ha aumentado entre estas dos especies (Cerdá y col., 2010), por ello con el fin de aumentar la resolución del mapa y realizar posteriores análisis comparados, se escogieron una serie de microsatélites desarrollados en dos familias filogenéticamente próximas: la familia Scophthalmidae de la que pertenece el rodaballo (Coughlan y col., 1996 y Navajas-Perez 2012) y la familia Pleuronectidae de la que pertenecen la platija japonesa (Coimbra y col., 2001, 2003, Castaño-Sánchez y col., 2010) y el halibut (Reid y col., 2007).

La selección se basó en la existencia de alta variabilidad para esos microsatélites, en sus localizaciones en sus respectivos mapas, eligiendo aquellos que se encontraban ligados, y por último en la presencia de homología con especies de peces planos.

Dispusimos de un total de 31 microsatélites consiguiendo amplificación cruzada en el 51.6 % de los microsatélites: 29% en rodaballo, 19.35 % en platija y 3.2% en el halibut. Los resultados obtenidos entre otras especies y otros autores varían, así por ejemplo en amplificación cruzada entre la platija y el fletán la proporción de microsatélites amplificados es de 63,9% (Kang y col., 2008) y en otros casos un 22% (Iyengar y col., 2000), en amplificaciones realizadas entre rodaballo, platija y fletán se ha obtenido un 11% de microsatélites (Fortes, 2008).

Las razones de la escasa amplificación cruzada obtenida entre estas especies es el hecho de que los Pleuronectiformes podrían tener un origen mucho más antiguo del aceptado actualmente por lo ictiólogos (Castro, 2006) y que este orden podría presentar una tasa de evolución molecular mayor que la de otros peces relacionados (Verneau y col., 1994). Independientemente del origen del orden de los Pleuronectiformes, las especies como el *S. maximus*, *S. rhombus*, *S. solea* y *S. senegalensis* demuestran bien una mayor tasa evolutiva o una menor conservación en las regiones flanqueantes de los microsatélites dentro de los Pleuronectiformes (Rico y col., 1996; Bouza y col., 2002; Castro y col., 2006). En cambio, otros autores han obtenido un relativo éxito de amplificación (~22%) entre las especies de *S. maximus*, *P. olivaceus* e *H. hipoglossus* (Iyengar y col., 2000).

Con respecto a las posibles correspondencias entre los grupos de ligamiento de lenguado y los de los peces planos, en el mapa de ligamiento de lenguado se han incluido tres microsatélites pertenecientes a otros peces planos, concretamente Smax-E273 de rodaballo que se encuentra en el LG5 de lenguado mientras que en el nuevo mapa de rodaballo (Bouza

y col., 2012) no está incluido por lo que no podemos hacer análisis comparativos entre ambas especies. Por otro lado, los microsatélites Poli200TUF y Poli129TUF ambos pertenecientes a la platija aparecen ligados en el LG8 de lenguado y en cuyo mapa de platija aparecen también ligados en LG9 (Coimbra y col., 2003; Kang y col., 2008) además estos dos microsatélites han sido estudiados en el halibut e incluidos en sus mapa de ligamiento (Reid y col., 2007), en este caso también se encuentran ligados pero se sitúan en el LG20. Aunque estos resultados no son suficientes para establecer una clara correspondencia entre estos peces planos suponen un primer paso para establecer en un futuro posibles relaciones de sintenia entre estas especies.

#### V.1.4. Análisis de la variabilidad

Una de las características más importantes de los microsatélites es la gran variabilidad en el tamaño de sus alelos por lo que actualmente junto con los SNPs son los marcadores más utilizados en el desarrollo de mapas de ligamiento (Sakamoto y col., 2000; Lee y col., 2005).

El gran polimorfismo que presentan se refleja en estudios realizados en peces planos donde se han descrito rangos alélicos de más de 100pb de diferencia en el rodaballo (Estoup y col., 1998) y en la platija (Sekino y Hara, 2000) y de 40pb en el halibut (Coughlan y col., 2000). En el lenguado, la mayoría de los microsatélites amplificados no superan los 40 pb, excepto en cuatro de ellos cuyo rango es mayor de 100pb, Mss47, Mss143, Mss150, Est 16C12 e incluso mayor de 250pb como el Mss45.

Los tamaños alélicos de los microsatélites oscilan desde valores de 65 o 66 pb (Poli129TUF; Poli200TUF) hasta 648 o 678 pb (Sma-E273; Est-42).

Un total de 71.9% de microsatélites fueron polimórficos, concretamente un 60.1% procedentes de las genotecas y un 34.4% de las secuencias ESTs. En otros estudios, por ejemplo en tongue solea se ha obtenido un 34.7% (Sha y col., 2011) y en la carpa común un 41.6% (Wang y col., 2007) de ESTs polimórficos, en rodaballo un 43.9% (Ruan y col., 2011) de ambas procedencias y 28.30% en rodaballo a partir de genotecas (Pardo y col., 2007).

El número medio de alelos por microsatélite es de 7, siendo este valor igual o muy similar al obtenido en la carpa común con 7 (Wang y col., 2007), el rodaballo con 4 y 5 (Pardo y col., 2007; Navajas-Pérez y col., 2012) y en *Cynoglossus abbreviatus* con 6 alelos (Sha y col., 2011). Las diferencias entre el número medio de alelos que se puede encontrar entre las especies no son significativas, ya que depende del número de individuos empleados en cada especie para el análisis de la variabilidad.

En el lenguado senegalés este valor oscila entre 2 y 19 alelos, hay diversos microsatélites con sólo dos alelos, en cambio 19 alelos lo presenta Mss7, aunque también con 17 alelos nos encontramos al Mss45, Mss46 y Mss 47.

Análisis realizados en los microsatélites de algunas especies de peces afirman que hay una relación positiva entre el número de repeticiones del motivo de un microsatélite con los diferentes alelos que pueda presentar, es decir a mayor número de repeticiones mayor es el número de alelos diferentes de un microsatélite determinado (Slettan y col., 1993; Lee y Kocher 1996; Pardo y col., 2007). Así, en nuestro estudio se ha comprobado que esta relación también es positiva en la mayoría de los casos, por ejemplo dentro de los microsatélites anónimos el microsatélite Mss7 tiene un motivo (CTAT)<sub>13</sub> y presenta 19 alelos y Mss42 tiene un motivo de (CA)<sub>30</sub> y presenta 15 alelos mientras que Mss120 tiene el motivo (GT)<sub>6</sub> y sólo presenta dos alelos al igual que el Mss164 que tiene el motivo (CA)<sub>4</sub> y sólo dos alelos; dentro de los microsatélites ESTs la relación también se mantiene de manera que por ejemplo el microsatélite CSse2H15 tiene el motivo (TG)<sub>23</sub> con 12 alelos o el Est-65 con el motivo (CA)<sub>34</sub> y 15 alelos por el contrario el Est-9 tiene el motivo (TG)<sub>6</sub> y presenta 3 alelos o el Est-34 con (CA)<sub>5</sub> y sólo tiene 2 alelos. Además, los microsatélites monomórficos de este trabajo,

presentan en su mayoría una menor repetición de su motivo, como es el caso por ejemplo de Mss2 (CCG)<sub>3</sub>, Mss15 (GA)<sub>3</sub>, Est-21 (CT)<sub>5</sub> o Est-4 con (CA)<sub>6</sub>.

Sin embargo otros autores afirman que el nivel de polimorfismo no depende del tamaño del motivo repetido como es el caso de los microsatélites Mss 141 cuyo motivo es (GT)<sub>19</sub> y Est-45 con (GA)<sub>15</sub> y ambos son monomórficos (Nonneman y Waldbieser, 2005; Wang y col., 2007).

El valor de PIC obtenido tanto en secuencias anónimas como en secuencias ESTs es muy similar, 0,591 y 0,590 respectivamente, y como ocurre en otros estudios, cuando se comparan el valor PIC en ambos microsatélites, el nivel de polimorfismo normalmente es ligeramente inferior en ESTs (Cho y col., 2000; Pérez y col., 2005).

Por otro lado los valores de heterocigosidad observada (0.6014) y esperada (0.6358) obtenidas en los microsatélites son similares a los obtenidos en el mismo lenguado senegalés en Funes y col., y Porta y col., (2004) así como en otras especies (Bouza y col., 2008; Sha y col., 2011).

La aplicación del test de Hardy-Weinberg (Pvalue H-W) y la frecuencia de alelos nulos (FAN) reveló que varios microsatélites presentaban un déficit de heterocigosis posiblemente causados por la presencia de éstos, así por ejemplo el microsatélite Mss106 (Ho=0.0870; Pvalue=0.0049; FAN=+0.5333) y EST-50 (Ho=0.2000; Pvalue=0.0036; FAN=+0.4179). Además, hay una mayor cantidad de microsatélites anónimos con frecuencia de alelos nulos (18 con FAN<0.1) frente a los 10 microsatélites ESTs con FAN>0.1, probablemente esta diferencia se deba al hecho de que los microsatélites anónimos al no encontrarse en regiones codificadas tienen más probabilidad de presentar alguna mutación en sus regiones flanqueantes.

El análisis de frecuencias alélicas por pares microsatélites para el análisis de ligamiento (datos no mostrados) así dos microsatélites que presentan un desequilibrio de ligamiento (P<0.05) considerándose ligados y confirmados en el mapa son CSs2H15 y CSs2G14 (LG3), y otro ejemplo de dos microsatélites que no presentaban desequilibrio en el test (P=1.00) y tras la realización del mapa de ligamiento aparecen ligados son los microsatélites Mss1 y Mss7 (LG6).

## V.2. Obtención y empleo de familias ginogenéticas

El empleo de familias ginogenéticas para el desarrollo de mapas de ligamiento se realiza desde hace tiempo en peces, como ejemplo, en el salmón atlántico (Lie, 1994., Slettan y col., 1997), en el pez cebra (Postlethwait y col., 1994), en tilapia (Kocher 1998), en la carpa común (Cheng, 2010) y dentro de peces planos los realizados en la platija japonesa, *Paralichthys olivaceus* (Coimbra y col 2003), el fletán, *Hippoglossus hippoglossus* (Reid y col., 2007) y el rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Bouza y col. 2007).

El uso de ginogenéticos aporta una serie de ventajas como son el ahorro en costes que supone la creación y mantenimiento de generaciones de individuos, el disponer de un elevado número de muestras que darán lugar a resultados más fiables y la simplicidad de los mismos tras el genotipado. Además, la progenie haploide, al representar un solo juego cromosómico procedente de la madre, facilita el análisis de la segregación de marcadores así como la detección de la presencia de alelos nulos (Slettan y col., 1997; Spruell y col., 1999; Fopp-Bayat, 2008).

Pero también presentan una serie de inconvenientes ya que el mapa que se obtiene es femenino pudiendo diferir del masculino ya que por lo general poseen diferentes tasas de recombinación (Sakamoto y col., 2000; Singer y col., 2002), también, al trabajar con huevos y larvas no se pueden mapear caracteres fenotípicos adultos reduciendo la información de los

microsatélites (Fortes, 2008), la técnica utilizada en la manipulación cromosómica requiere experiencia y precisión ya que la efectividad depende de varios factores como el tiempo, cantidad de radiación o la temperatura y por último la cantidad de ADN obtenido en las larvas es mínima y requiere la aplicación de protocolos de amplificación (GenomiPhi™) lo que se traduce en dinero y tiempo.

Muchos son los protocolos utilizados en peces, el aplicado en este trabajo es el empleado en rodaballo por Cal y col. 2002, siendo muy similar al desarrollado por Piferrer y col., 2004 también en rodaballo.

La efectividad de la técnica descrita y verificación de la condición ginogenética haploide y diploide de la descendencia se llevó a cabo mediante el estudio del cariotipo y análisis de marcadores. Con la obtención del cariotipo se confirmó la dotación cromosómica y la efectividad de la técnica, pero en ginogenéticos diploides no es suficiente ya que el número de cromosomas coincide con el de un individuo normal ( $2n=42$ ). Para demostrar la herencia exclusiva materna se hace necesaria la amplificación mediante los marcadores microsatélites de los alelos procedentes de la madre. Para ello, se recomienda utilizar al menos dos marcadores ya que hay que tener en cuenta la tasa de mutación así como la posibilidad de transmisión paterna residual en los descendientes (Thorgaard y col., 1985). En este trabajo se utilizó inicialmente para ello los microsatélites GATA 3 (Funes y col., 2004) y Mss66.

Los resultados de la amplificación de los microsatélites en la descendencia, confirmaron un 82% (18% falsos haploides) en los ginogenéticos haploides y un 93.4% (6.6% diploides normales) en los ginogenéticos diploides de efectividad, resultados similares a los obtenidos en el rodaballo.

### V.3. Mapa de ligamiento

Como ya hemos mencionado, los mapas de ligamiento son una herramienta esencial en genética estructural y funcional ya que proporcionan una descripción del genoma de cualquier organismo basado en la frecuencia de recombinación de sus marcadores moleculares, dando lugar a tantos grupos de ligamiento como números de cromosomas contiene el organismo en estudio. Para ello se requiere de cientos de marcadores informativos y espaciados lo más uniformemente posible por todo el genoma (Cerdá y col., 2010).

Este primer mapa de lenguado senegalés lo comprenden 27 grupos de ligamiento (6 más del complemento haploide), en los que se distribuyen 129 microsatélites (90%) mientras que 15 microsatélites (10%) resultaron no ligados. El obtener un número mayor de grupos de ligamiento al número de cromosomas haploides de la especie (21) y microsatélites sin incluir en el mapa por falta de ligamiento, es común en mapas preliminares con poca densidad de marcadores (Postlethwait y col., 1994, Korcher y col., 1998) ya que, los más alejados, son identificados como grupos de ligamiento de tamaño menor e independientes (Pérez y col., 2004; Cerdá y col., 2010) que no llegan a alcanzar los valores mínimos para la detección significativa de ligamiento con el resto de marcadores (Lander y col., 1987). En nuestro caso catorce son los grupos constituidos por menos de 4 microsatélites.

La diferencia entre LGs y cromosomas y la presencia de microsatélites sin ligamiento, es debida a la falta de cobertura con microsatélites en los extremos terminales de los grupos ya que, la ausencia de marcadores en esta zona, impide la detección de dicho ligamiento. Para evitar esto, se debería incrementar tanto el número de marcadores como el número de familias de referencia, obteniendo así un mapa consenso cada vez más sólido (Shimoda y col., 1999; Lee y col., 2005), además de aumentar el tamaño muestral de larvas, reduciendo los errores en el análisis de ligamiento de los microsatélites. Aún así, hay especies en las que

a pesar de contar con un elevado número de marcadores, el mapa resultante tiene un mayor número de grupos de ligamiento que cromosomas haploides de la especie, es el caso del pez tilapia (Lee y col., 2005) y otros en los que ni aumentando al doble el número de muestras analizadas, se consigue reducir el número de marcadores sin ligamiento (Plomion y col., 1995).

De cualquier forma, un mapa de ligamiento es una representación probabilística cuya consistencia depende principalmente del umbral LOD empleado en el análisis de ligamiento entre los pares de microsatélites (Fortes, 2008). En este mapa las relaciones de ligamiento se establecieron a partir de un valor de  $LOD > 3$ , siendo este valor el mínimo recomendado para las construcciones de mapas genéticos (Maliapaard y col., 1997). Un valor menor puede dar lugar a grupos de ligamiento dudosos procedentes de la unión de grupos grandes con grupos pequeños, fruto del aumento de la frecuencia de recombinación que produce un valor de  $LOD < 3$ . Posteriormente, en algunos microsatélites se aplicó un valor  $LOD 2$  permitiendo un mejor ajuste del orden en sus respectivos grupos de ligamiento. Estos microsatélites se sitúan en los extremos ya que presentan una mayor frecuencia de recombinación con respecto al resto (Li y col., 2005).

El tamaño del mapa se obtiene de la suma de cada grupo siendo el resultado una estimación. En nuestro caso, el mapa tiene un tamaño total de  $\sim 1004cM$ . Sin embargo, la presencia de microsatélites no ligados así como de seis grupos extra en relación con el número cromosómico haploide, indica que la longitud real del mapa es mayor que la obtenida (Moen y col., 2004). En otras especies se han obtenido valores de  $741cM$  en la platija (Coimbra y col., 2003),  $1.343cM$  en el rodaballo (Bouza y col., 2007),  $1.500cM$  en el halibut (Reid y col., 2007) y  $2.750cM$  de la trucha arco iris (Guyomard y col., 2006). Tal como se puede observar, el tamaño del mapa del lenguado tiene un valor medio entre los mapas de peces planos.

La distribución de los microsatélites a lo largo de los grupos de ligamiento no es uniforme, encontrándonos con grupos de dos hasta catorce microsatélites, como se puede observar en el LG18 y el LG3, respectivamente. Además, en la mayoría de los grupos, hay tramos que carecen de marcadores, regiones *gaps*, que en ocasiones ocupan un tamaño de hasta  $25cM$  como en el LG5 y LG8. Son varias las razones que explican la presencia de estas regiones como el azar en la distribución de los marcadores cartografiados (Knaip y col., 1998), puntos calientes de recombinación (Paglia y col., 1998; Saal y Wricke y col., 2002), regiones inaccesibles a las enzimas de restricción o simplemente por la ausencia de motivos repetidos (Cervera y col., 2001; Saal y Wricke y col., 2002). Aunque dada la densidad de nuestro mapa, la razón más posible por la que aparecen, sería la falta de cobertura de estas regiones por marcadores (Vallejos y col., 1992).

Por otro lado, el uso de varias familias para la construcción de un mapa de ligamiento tiene varias ventajas. Así, un mapa consenso, integrado por varias familias, contiene mayor información y utilidad ya que, además de contener un mayor número de marcadores, permite ligar aquellos marcadores no asociados en un primer análisis. En nuestro caso, con la integración de los análisis realizados en las dos familias, en el mapa consenso hemos podido integrar seis microsatélites que en un principio no presentaban ligamiento como son SolCA13 (LG9), Mss108 (LG14), Mss75 (LG15), Mss43 (LG16), Est-62 (LG17) y Mss37 (LG18). Además, aporta mayor fiabilidad al mapa, ya que hay un mejor ajuste en las distancias al disponer de más marcadores ligados y más muestras.

#### **V.4. Estimaciones de distancia con respecto al centrómero**

En esta memoria, hemos llevado a cabo la construcción de una familia de genotipos diploide para la estimación de la distancia de marcadores de microsatélites con

respecto al centrómero. Esta misma metodología ha sido aplicada, en trabajos previos, en otras dos especies de peces planos, platija (Reid y col., 2007) y rodaballo (Martínez y col., 2008).

En el lenguado, se ha podido establecer la localización del centrómero en 18 grupos de ligamiento, con el análisis de, al menos, un marcador en cada uno de ellos. Sin embargo, la media de marcadores localizados con respecto al centrómero es de 4 por LG, variando desde 1 (LG20) a 8 (LG1). En algún caso (LG10), las distancias entre los marcadores incluidos en el LG y de estos al centrómero son concordante, aunque esto no siempre ocurre así, debido principalmente a la escasez de marcadores o a las diferentes frecuencias de recombinación entre regiones cromosómicas (Martínez y col., 2008).

La estima de la posición del centrómero es relevante para estudios de la función meiótica y para mapas comparativos. También se puede aplicar en mejora por selección asistida por marcadores (Martínez y col., 2008).

## V.5. Estudios evolutivos. Análisis de conservación y sintenia

### V.5.1. Anotación, clasificación y zonas UTRs

El estudio comparado de los 194 microsatélites caracterizados en esta memoria, con la base de datos GenBank, reveló un bajo porcentaje de secuencias homólogas (15%). En la mayoría de los casos (93%) fueron procedentes de ESTs y solo el 7% de las anotaciones procedían de microsatélites obtenidos de genotecas (**Anexo XII**). Estos resultados son los esperados, pues los microsatélites procedentes de ESTs se encuentran asociados a genes y sus secuencias más conservadas, mientras que los procedentes de genotecas, suelen estar en regiones génicas no codificantes y anónimas.

Todas las homologías encontradas, fueron con secuencias de especies de peces como tetraodon, danio, fugu, salmón y tilapia, y de peces planos como rodaballo, halibut e incluso el propio lenguado senegalés. Concretamente, y para estas especies de peces planos, podemos destacar el microsatélite EST-16, con homología con el gen ribosómico 40s del rodaballo, el EST-31 que presenta homología con la proteína estructural *alfa-actina* del halibut y los microsatélites EST-7 y EST-62 con anotaciones para *Solea senegalensis* correspondientes a las proteínas *keratina tipo II* y *calsequestina* respectivamente (Infante y col., 2011).

De acuerdo a la clasificación GO (Gene Ontology), la mayoría de las secuencias anotadas, dentro del apartado componentes celulares son de membrana y retículo endoplasmático (53.3%), del núcleo (20%) y del citoplasma (20%), mostrando una distribución similar a las encontradas en el rodaballo (Navajas-Pérez et al., 2012)

La localización de los microsatélites en las regiones génicas amplía el conocimiento sobre el papel que juegan durante la expresión génica y la presión selectiva que hay en ellos, dependiendo del tipo de repetición del que consten sus motivos.

En los Vertebrados, la mayoría de microsatélites formados por repeticiones de di- y tetranucleótidos se localizan en regiones no codificantes, siendo menos frecuentes su presencia en los exones (Tóth y col., 2000). Estas repeticiones se han localizado principalmente en las zonas 5'-UTR y 3'-UTR en una gran variedad de peces como en salmón (Grimholt y col., 2002), en pez cebrá (Gerhard y col., 2000) en platija (Hirono y col., 2000). En este trabajo, y en esta misma línea, todos los microsatélites con motivo di- y tetranucleótido (65.5%) se han localizado también en las regiones no codificantes (UTRs) del lenguado, principalmente en en la 5'-UTR (79.3%).

Sin embargo, estos motivos, formados por un número elevado de repeticiones, suelen inestabilizar las regiones génicas, por lo también se encuentra más frecuentemente en las zonas no codificadas, debido principalmente a que estas regiones están sometidas a una mayor tasa de mutación (Dokholyan y col., 2000). Este es el caso de los microsatélites CSse2H15 (TG)<sub>23</sub> o Mss 44(CT)<sub>15</sub> ambos en regiones 5'-UTR. Cuando los microsatélites se encuentran en las regiones 5'-UTR pueden formar ADN específicos pocos usuales en su estructura afectando a la traducción del ARNm (Liu y col., 2001). Y cuando se localizan en las regiones 3'-UTR podrían afectar a la estabilidad de los productos transcritos, ya que desestabilizan la estructura del extremo 3' de la molécula de ARNm facilitando la degradación intracelular mediante exonucleasas (Wang y col., 2002). Este caso se describe en la anguila europea (*Anguilla anguilla*) en donde las repeticiones del microsatélite en 3'-UTR del gen *TSHB* provocan una forma inusual en la doble hélice que inestabilizan al promotor (Pradet-Balade et al., 1998; Chistiakoz et al., 2006). En este memoria, son 4 los microsatélites localizados en esta región (**Anexo XIII**), correspondiendo a dos dinucleótidos y dos trinucleótidos.

Se cree que la distribución al azar de los microsatélites está seleccionada en contra (Bachtrog y col., 1999), aunque hay estudios (Venkatesh y Brenner, 1997) que revelan la presencia de dinucleótidos en regiones codificadas como en las especies de peces *Lates calcarifer* (barramundi) o *Paralynchius olivaceus* (platija). Nuestro estudio, confirma esta hipótesis, pues no hemos encontrado repeticiones de dinucleótidos en las regiones codificantes, ya que alteran el maraco de lectura, afectando a la traducción.

Por otro lado las repeticiones de trinucleótidos se encuentran tanto en regiones traducidas, no afectando el marco de lectura, como en las no traducidas (Wren y col., 2000; Morgante y col., 2002). Así, por ejemplo, en nuestro caso los microsatélite de trinucleótidos CSse2M07, Est-13 y Mss32 se encuentran en las regiones 3'-UTR-3', 5'-UTR y zona traducida respectivamente y el microsatélite Est-5 es un hexanucleótido de la zona traducida.

### V.5.2. Conservación y evolución de los microsatélites

Con el fin de obtener una primera estimación del grado de conservación entre las especies del orden de los Pleuronectiformes y su aplicación en genómica comparada, se han buscado posibles homologías entre las secuencias microsatélites del lenguado y las secuencias que forman las bases de datos de ESTs disponibles de otras especies de este orden como rodaballo, platija y halibut. Este estudio aporta conocimientos sobre la evolución de este orden y mediante identificación de grupos comunes de microsatélites se podrían identificar, a partir de una especie, regiones genómicas relacionadas con caracteres productivos en las demás especies, sirviendo de anclaje entre sus respectivos mapas genéticos.

Así, un 28.4% de secuencias flanqueantes de los microsatélites analizadas en este estudio, presentan homología con secuencias de alguna de las bases de datos de ESTs de las especies mencionadas. Este dato, pone de manifiesto la existencia de cierto grado de conservación de estos marcadores del lenguado en los genomas de peces planos, tal y como ya se ha visto en estudios evolutivos en otros peces (Rico y col., 1996; DeWoody y Avise, 2000). De las secuencias con homología, en su mayoría (81.8%) corresponden a microsatélites procedentes de la base de datos de ESTs del lenguado. Este alto porcentaje se debe a una mayor conservación de este tipo de secuencias con respecto a las genómicas, entre especies relacionadas. Resultados similares han sido obtenidos en rodaballo, con 31% de

homología al comparar las secuencias de sus microsátélites con las bases de datos de ESTs de los peces planos (Navajas- Pérez y col., 2012).

Por especies, es interesante destacar que el número de secuencias de microsátélites encontrada en las tres especies es muy similar (37 secuencias comunes para halibut, 35 con platija y 34 con rodaballo).

Aunque en estudios realizados en rodaballo por Navajas-Pérez y col., (2012) la mayor homología se encontró con platija, seguida de halibut y de lenguado senegalés, con menor homología entre el lenguado y el rodaballo que con el resto de peces planos, al igual que se describe en Pardo y col., (2005) y Castro y col., (2006), nuestros datos no reflejan estas asociaciones. En este sentido, hay que poner de manifiesto que nuestros estudios son preliminares y que las bases de datos exploradas son todavía muy incompletas. De hecho, existen diferencias tanto en número de secuencias como en tamaño medio de estas (Navajas-Pérez, et al., 2012). La influencia de la calidad de las bases de datos de ESTs sobre las homologías se refleja en el hecho de que la base de datos del lenguado es la más incompleta y, por lo tanto, cuando se hacen búsquedas sobre ella, el número de secuencias es escaso. Sin embargo, cuando el análisis se hace utilizando secuencias del lenguado sobre las otras tres bases de datos, como es el caso de esta memoria, los resultados de homología son muy similares para todas las especies

Por otro lado, los microsátélites del lenguado con motivo perfecto es frecuente encontrarse el motivo de manera imperfecta en el resto de especies, esta misma premisa ha sido descrita en rodaballo (Navajas-Pérez y col., 2012).

El análisis de la variabilidad de estos microsátélites del lenguado encontrada en las bases de datos de las otras especies de peces planos, muestra que los marcadores polimórficos en el lenguado, en su mayoría (95,5%) presentan un tamaño distinto, en cuanto al número de repeticiones, en las otras especies. Este dato no revela si se mantiene el polimorfismo en las otras especies, ya que sólo nos indica un tamaño alélico diferente, pudiendo ser tanto polimórfico como monomórfico. Para llegar a conclusiones, se debería realizar un estudio de variabilidad *in vitro* en cada una de las especies.

Con respecto a la conservación de la variabilidad hay una mayor proporción de microsátélites polimórficos que se conservan en las otras especies, dato que varía con los obtenidos por Navajas y Pérez y col., (2012) en el rodaballo, ya que en este caso son los microsátélites monomórficos los que más se conservan en las otras especies.

Entre los vertebrados, la secuenciación de los genomas de peces es de gran interés y especialmente los Actinopterygios ya que es un grupo muy diverso y abarca más de 31.000 especies. (<http://www.fishbase.org/>). Durante la última década se han secuenciado los genomas completos de varias de estas especies el fugu (*Takifugu rubripes*), pez cebra (*Danio rerio*), pez globo (*Tetraodon nigroviridis*), espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) y medaka (*Oryzias latipes*) y estos estudios se están extendiendo a otras muchas especies por su importancia en la evolución o por su interés comercial, como son la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), el salmón Atlántico (*Salmo salar* L), la dorada (*Sparus aurata*) o la lubina (*Dicentrarchus labrax* L) (Sarropoulou y col., 2011). Sin embargo, la secuenciación de un genoma completo aún sigue siendo costosa y laboriosa, y no justificable para especie con poco o sin interés comercial y económico, por lo que para muchos organismos se están generando mapas de ligamiento como primer paso.

La obtención de un mapa de ligamiento es esencial para el conocimiento de la secuencia del genoma de cualquier especie. Además tiene gran valor como herramienta en genómica comparada (Kai y col., 2005), ya que es posible conseguir una transferencia de información entre genomas de especies ampliamente secuenciados y genomas de otras poco estudiados y aportando conocimientos de la organizaciones de sus genomas y de los cambios evolutivos entre ellas en particular y con el resto en general mediante el análisis cruzado de

los marcadores (Cristescu y col., 2006; Wang y col., 2007). Una forma de comparar los genomas de especies relacionadas pero poco estudiados es mediante las relaciones con los genomas modelo, así por ejemplo, se pueden establecer relaciones entre mapas de ligamiento de dos especies mediante las homologías encontradas en los cromosomas de una especie modelo, como el realizado por Cerdá y col., (2010) en el rodaballo y halibut, en el que se estableció una correspondencia entre los grupos de ligamiento de ambas especies empleando a los cromosomas del tetraodon como intermediarios, así por ejemplo se considera que el grupo de ligamiento 6 del rodaballo se corresponde con el grupo 3 del halibut, porque ambos grupos comparten marcadores con el cromosoma 13 de tetraodon. Este mismo estudio comparado se ha aplicado en el lenguado con otras especies de peces planos como el rodaballo, la platija y el halibut, empleando para ello los resultados de homología de secuencias de varios marcadores (microsatélites, AFLPs y SNPs) obtenidos en cada una de estas especies con el tetraodon de diversos estudios, por ejemplo en rodaballo Bouza y col., (2012) relaciona el Cr18 de tetraodon con el LG9 y el Cr10 con el LG3. En el halibut Reid y col., (2007) y Cerdá y col., (2010) relacionan el Cr18 de tetraodon con el LG11 y el Cr10 con el LG7. Y por último en la platija Castaño-Sánchez y col., (2010), el Cr18 se relaciona con el LG7 y el Cr10 se relaciona con LG2. Además, estas relaciones están apoyadas con la homología que presentan algunos microsatélites en estas especies. Muchas veces, como en el caso de los peces planos, la amplificación cruzada de marcadores *in vivo* es difícil, por lo que hay que recurrir a herramientas bioinformáticas. Este tipo de análisis permite anclar los distintos marcadores en las secuencias de otras especies, y en consecuencia asignar regiones del genoma en estudio a regiones ya conocidas de otras especies, orientar los fragmentos involucrados y analizar la conservación de los genes presentes en los mismos, así como las posible reordenaciones cromosómicas que han podido tener lugar (Guyon et al., 2012).

En este contexto, dentro del análisis sobre conservación de las secuencias de lenguado llevado a cabo en esta Tesis, se he investigado la homología de las secuencias de los microsatélites ya anclados en el mapa de ligamiento con la secuencia de los genomas de las especies modelo de peces mencionadas anteriormente. Esta aproximación revela que sólo un 30% de las 144 secuencias analizadas presentaba homología con secuencias de especies modelo. La homología encontrada ha sido mayor con secuencias de fugu (93%), espinoso (78%), medaka (76%), tetraodon (71%) y danio (54%). Estos resultados son similares a los obtenidos en rodaballo por Bouza y col., 2012, en tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Lee y col., 2005), en el gobio (*Cottus Gobio*) (Stemshorn y col., 2005); la dorada *S. aurata* (Franch y col., 2006) y el barramundi (*Lates calcarifer*) (Wang et al. 2007) mostrándose en todos ellos mayor homología con los Acantopterigios (fugu, espinoso, medada y tetraodon) que con Ostariofisios (danio), este hecho, en particular, apoya los datos filogenéticos obtenidos por Miya y col., (2003) que demuestran una mayor relación del rodaballo con los Acantopterigios, por tanto nuestros serían un apoyo adicional a esta idea, ya que el lenguado y el rodaballo pertenecen al mismo orden (Pleuronectiformes).

Con respecto a la secuencia de los microsatélites, y dada la separación filogenética de *Solea senegalensis* y las especies modelo utilizadas, no es extraño que el mayor número de coincidencias correspondiera a secuencias ESTs (68.3%), que provienen de secuencias expresadas, y por ende, adicionalmente más conservadas. Este hecho ha sido descrito por otros autores para otras especies como la lubina, la dorada y el rodaballo (Chistiakov y col., 2008, Franch y col., 2006 y Bouza y col., 2012). Además, la longitud relativamente grande de las secuencias ESTs, hace que sean una herramienta primordial para la búsqueda de genes de interés (Sarpoglou y col., 2008, Naruse y col., 2009, Wang y col., 2011), ya que permite el estudio de reorganizaciones cromosómicas locales que puedan sufrir los distintos genomas a lo largo del tiempo. El genoma de los Teleósteos es de gran interés ya que posee varias

copias de un mismo gen fruto de la duplicación de su genoma a lo largo de la evolución hasta llegar al pez teleosteo actual (Steinke y col., 2006a).

Así, en nuestro análisis hemos sido capaces de asignar a casi todos los grupos de ligamiento de lenguado homología con un cromosoma de las especies modelo, a través de al menos un microsatélite. Por ejemplo, el LG2 presenta 4 microsatélites presentes en el Cr19 de fugu, el LG1 3 microsatélites en el Cr9 de espinoso, Cr1 de medaka y Cr17 de fugu, el LG15 3 microsatélites presentes en Cr15 de espinoso, Cr10 de tetraodon y Cr2 de fugu y por último el LG17 con 3 microsatélites en el Cr2 de tetraodon, Cr21 de medaka y Cr1 de fugu. Esto indicaría la posible existencia de bloques sinténicos entre el lenguado y estas especies, y apoya la idea de la baja reordenación intercromosómica que han podido sufrir los Acantopterigios durante su evolución (Kasahara y col., 2004; Kai y col., 2011).

El siguiente paso es averiguar la funcionalidad de las secuencias contenidas en dichas regiones, lo que confirmaría los marcadores microsatélites como herramientas útiles para vincular de forma aplicada la información generada en lenguado con los genomas de referencia (Gaffney y Keightley 2004; Franch y col., 2006; Bouza y col., 2007). La sintenia entre especies representa una oportunidad para iniciar en este caso estudios de QTLs mediante la búsqueda de genes candidatos en las regiones de homología con las especies modelo (Erickson y col., 2004; Reid y col., 2005b). Sin embargo, hay que tener en cuenta los reordenamientos intracromosómicos que sufren los genomas a lo largo de la evolución que dificulta la transferencia de información posicional entre los genomas (Bouza y col., 2007).

Nosotros hemos encontrado y caracterizado más en profundidad cuatro bloques sinténicos compartidos por lenguado, espinoso, tetraodon y medaka. Estos bloques sinténicos fueron determinados por al menos la presencia de tres marcadores microsatélites anclados al mapa de ligamiento de lenguado, que mapearan sobre el mismo cromosoma en las distintas especies modelo.

En resumen, tras el estudio de cuatro bloques sinténicos presentes en lenguado y tres especies modelo (espinoso, tetraodon y medaka) es posible concluir que en todas las especies aparecen genes muy conservados, no sólo en secuencia, sino en su orden. La conservación en el orden de un gran número de genes en organismos relativamente distantes puede ser indicio de una especial funcionalidad de los mismos. Este aspecto se estudiará en futuras investigaciones. Además, en algunas especies se detecta la presencia de genes exclusivos de la misma, lo que sugeriría la ocurrencia de deleciones/inserciones y/o duplicaciones. También hemos detectado la presencia de inversiones a nivel local que tendría interés cladístico, ya que han ocurrido en especies concretas.

Por último, cabe destacar que la comparación con especies modelo tiene una utilidad adicional en el mapeo, ya que ha permitido añadir al grupo de ligamiento (LG17) un microsatélite (CSse3A04 UL) que en principio no se había anclado al mapa por falta de ligamiento. Asimismo, el hecho de que LG10 y LG23 de lenguado muestren homología con los mismos cromosomas de tetraodon y medaka sugeriría que ambos deberían agruparse en el mismo grupo de ligamiento. Disponer de un mayor número de secuencias de lenguado que aumente la densidad del mapa de ligamiento permitirá aumentar disminuir el número de grupos de ligamiento, así como una comparación más detallada entre el mapa de ligamiento y los genomas de especies modelo de peces detectando nuevas regiones sinténicas potencialmente utilizables en programas de mejora y en estudios evolutivos.

## **VI. CONCLUSIONES**

---

1. La construcción de librerías genómicas específicas de una especie, es un método rápido y eficaz para la obtención de microsatélites. En *Solea senegalensis* se han conseguido caracterizar 118 loci microsatélites susceptibles de ser informativos (polimórficos).
2. La disponibilidad de secuencias asociadas a genes (ESTs) en bases de datos específicas, supone una ventaja en la obtención de marcadores dado el carácter conservacionista y funcional de estas secuencias, además de suponer un ahorro en costes y tiempo. La base de datos de *Solea senegalensis* “*Soleamold*” ha permitido el desarrollo de otros 76 loci microsatélites polimórficos provenientes de estas ESTs.
3. El empleo de familias ginogenéticas haploides, obtenidas a través de las técnicas de manipulación cromosómica, facilita el desarrollo de mapas de ligamiento, por un lado, prescindiendo de identificaciones parentales y sucesivas generaciones y pudiendo disponer directamente de material larvario y de tamaño muestras elevado, (en torno a 100 individuos) y por otro, simplificando el análisis de ligamiento de marcadores con la segregación de un único alelo materno en la descendencia. Por otro lado, el empleo de las familias ginogenéticas diploides permite la localización del centrómero en los grupos de ligamiento mediante el análisis de medias tétradas. Ambos tipos de familias han sido utilizadas en este trabajo para desarrollar el mapa del lenguado senegalés, siendo por tanto, un mapa genético femenino.
4. Para la construcción de este primer mapa de lenguado senegalés, se ha realizado el análisis de ligamiento de 144 microsatélites en dos familias ginogenéticas haploides. El mapa obtenido está compuesto de 27 grupos de ligamiento en los que se distribuyen 129 microsatélites y con un tamaño aproximado de 1004cM. La presencia de 6 grupos de ligamientos extra, así como de 15 marcadores no ligados, indican que se trata de un mapa parcial, con regiones no cubiertas por los marcadores desarrollados. Un aumento del número de marcadores, permitirá la localización de puntos intermedios entre los marcadores ligados y no ligados, además se detectarán las posibles relaciones de ligamiento con los grupos extra ajustándose al número de cromosomas de la especie ( $2n=42$ ).
5. Se ha podido estimar, mediante el estudio de una familia ginogenética diploide, la distancia con respecto al centrómero en 73 marcadores de 19 grupos de ligamiento.
6. Un 15% de las secuencias de microsatélites analizados fueron anotadas tras ser contrastadas con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. Como era previsible, el mayor número de ellas pertenecían a las obtenidas de la base de datos de ESTs (93%) y sólo un 6.9% procedían de las genotecas. Se encontraron homologías con otros peces planos como el rodaballo en el Est-16 (gen ribosómico 40s) y el halibut en el Est-31 (proteína estructural *alfa-actina*), así como para el propio lenguado en el Est-7 y Est-63 para las proteínas *keratina tipo II* y *calsequestina* respectivamente. Las anotaciones, de forma general se distribuyeron, según los términos GO en procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares perteneciendo a ésta última clasificación un mayor número de microsatélites y siendo la estructura y transporte de membrana las funciones más representativas. Adicionalmente, se ha realizado un estudio de la localización del motivo de repetición, poniendo de manifiesto que en las UTRs se localizan los microsatélites con motivo dinucleótido, sin afectar así al marco de lectura, mientras

que los microsatélites con motivos trinucleótidos se han localizado tanto en zonas UTRs y traducidas.

7. Mediante estudios de genómica comparada, hemos comprobado que el 28.4% de las secuencias de microsatélites caracterizados en este estudio, presentan homología con secuencias de las bases de datos de ESTs de otros peces planos (rodaballo, platija y halibut), en su mayoría (81.8%) se trataba de secuencias procedentes de la base de datos de ESTs. El estudio de la conservación y variabilidad del motivo repetitivo, permite analizar la dinámica evolutiva de este tipo de marcador, da una estimación del grado de conservación entre las especies del orden de los Pleuronectiformes y abre la perspectiva de su aplicación cruzada.
8. La comparación de las secuencias de los marcadores presentes en el mapa del lenguado con genomas completos de especies modelo de peces (espinoso, tetraodon, medaka, fugu y danio), ha permitido, por un lado, evaluar la conservación de las mismas. Por otro, también hemos podido establecer la relación entre grupos de ligamiento del lenguado y cromosomas de estas especies modelo (macrosintenia). Por último, también hemos caracterizado cuatro bloques sinténicos muy conservados y compartidos por los genomas de estas especies (microsintenia). El estudio en profundidad de dichas regiones aportaría conocimientos sobre la evolución de este orden y se pueden identificar a partir de una especie regiones genómicas relacionadas con caracteres productivos en las demás especies sirviendo de anclaje entre sus respectivos mapas genéticos.
9. Mediante el estudio cruzado de marcadores anclados en el mapa del lenguado y conservados en especies modelo y entre estas especies modelo y grupos de ligamiento de peces planos en las cuales existen mapas genéticos (rodaballo, platija, halibut), ha permitido establecer asociaciones entre entre los grupos de ligamiento de todas las especies de peces planos.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

---

- Agulleiro MJ. 2008. Fisiología de la reproducción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*): Mecanismos endocrinos y aplicaciones en acuicultura. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Ahsan B, Kobayashi D, Yamada T y col. 2007. UTGB/ medaka: genomic resource database for medaka biology. *Nucleic Acids Res.* 36, D747–752.
- Ajmone-Marsan P, Negrini R, Crepaldi P y col. 2001. Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers. *Animal genetics* 32(5):281-8.
- Allendorf FW, Seeb KE, Knudsen KL, Thorgaard GH y Leary RF. 1986. Gene-centromere mapping of 25 loci in rainbow trout. *J. Hered.* 77:307-321.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W y Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Angers A y Bernatchez L. 1997. Complex evolution of an imperfect salmonid microsatellite and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Molecular Biology and Evolution.* 14: 230-238.
- Anguis MV y JP Cañavate. 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243: 133-145.
- Aparicio S y col., 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297, 1301–1310.
- Apromar, 2011. La acuicultura marina de peces en España.
- Aragão C, Conceição L, Fyhn HJ y Dinis MT. 2004. Estimated amino acid requirements during early ontogeny in fish with different life styles: gilthead seabream (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 242: 589-605.
- Arellano JM y Sarasquete C. 2005. Atlas Histológico del lenguado Senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Consejo Superior de Investigaciones Científicas, pp. 15-34.
- Arijo S, Rico R, Chabrillon M, Díaz-Rosales P, Martínez-Manzanares E, Balebona MC; Magariños B, Toranzo AE y Moriñigo MA. 2005. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp piscicida. *J. Fish Dis.* 28: 33-38.
- Aritaki MY y Seikai T. 2004. Temperature effects on early development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared brown sole *Pseudopleuronectes herzensteini*. *Aquaculture*, 240: 517–530.
- Arjona FJ, Vargas-Chacoff L, Ruiz-Jarabo I, Martín del Río MP y Mancera JM. 2007. Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) to changes in environmental salinity. *Comp Biochem Physiol A* 148:413–421.

- Bachtrog D, Wesis S, Zangerl B, Brem G y Schlötterer C. 1999. Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. *Mol. Biol. Evol.* 14, 1023–1034.
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD y Johnson SL. 2000. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Research* 10, 1351-1358.
- Borges P, Oliveira B, Casal S, Dias J, Conceição L y Valente LMP. 2009. Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Brit. J. Nutr.* 3055, 17-53.
- Borrell Y, Álvarez J, Vázquez E, Sánchez Prado JA, Fernández-Pato C, Martínez-Tapia C y Blanco G. 2002. Aplicación de marcadores microsatélites a los programas de cultivo del rodaballo *Scophthalmus maximus* (L., 1758) *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4): 203-209.
- Bouza C, Sánchez L y Martínez P. 1994. Karyotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional, fluorochrome and restriction endonuclease-banding techniques. *Mar Biol*, 120, 609–613.
- Bouza C, Presa P, Castro J, Sánchez L y Martínez P. 2002. Allozyme and microsatellite diversity in natural and domestic populations of turbot (*Scophthalmus maximus*) in comparison with other Pleuronectiformes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 1-14.
- Bouza C, Hermida M, Pardo BG y col. 2007. A microsatellite genetic map in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics* 177, 2457–67.
- Bouza C, Hermida M, Millán A, Vilas R, Vera M, Fernández C, Calaza M, PardoBG y Martínez P. 2008. Characterization of EST-derived microsatellites for genemapping and evolutionary genomics in turbot. *Animal Genetics* 39, 666-670.
- Bouza C y Martínez P. 2009. *Genética y Genómica en Acuicultura*. Cap.8. Editores Martínez P y Figueras A. 1ª Edic. Publicaciones científicas y tecnológicas de la fundación observatorio español de Acuicultura. Madrid.
- Bouza C, Hermida M, PardoBG, Vera M, Fernández C, de la Herrán R, Navajas-Pérez R, Álvarez-Dios JA, Gómez-Tato A y Martínez P. in press. An Exoressed Sequence Tag (EST)-enriched genetic map of turbot (*Scophthalmus maximus*): a useful framework for comparative genomics across model and farmed teleost. *BCM Genomics* (in press).
- Brenner S, Elgar G, Sandford R, Sanford R, Macrae A, Venkatesh B, Aparicio S. 1993. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*, 366:265-268.
- Bronw J, Hardwick LJ, Wright AF. 1995. A simple method for rapid isolation of microsatellites from yeast artificial chromosomes. *Molecular and Cellular Probes*, 9:53-58.
- Brown NP, Bromage NR, Penman DJ y Shields RJ. 1997. The karyotype of the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (Linnaeus). *Aquac. Res.* 28: 489–491.

- Cabrita E, Soares F y Dinis MT, 2006. Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture* 261: 967-975.
- Cal R, Gómez C, Castro J, Bouza C, Martínez P y Piferrer F. 2002. Production of haploid and diploid gynogenetic turbot (*Scophthalmus maximus*). Presented at Aquaculture Europe 2002, Trieste, Italia.
- Cal RM, Vidal S, Martínez R, Álvarez Blázquez B, Gómez C y Piferrer F. 2006. Growth and gonadal development of gynogenetic diploid *Scophthalmus maximus*. *J Fish Biol* 68(2):401–413.
- Camon E, Barrell D, Lee V, Dimmer E y Apweiler R. 2004. The Gene Ontology Annotation (GOA) Database - An integrated resource of GO annotations to the UniProt Knowledgebase. *In Silico Biology* 4, 5-6.
- Cañavate JP y Fernández-Díaz C. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174: 255-263.
- Cañavate JP, 2005. Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4): 147-154.
- Castaño-Sánchez C, Fuji K, Ozaki A, Hasegawa O, Sakamoto T, Morishima K, Nakayama I, Fujiwara A, Masaoka T, Okamoto H, Hayashida K, Tagami M, Kawai J, Hayashizaki Y, Okamoto N. 2010. A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) *BMC Genomics*. Oct 11; 11: 554.
- Castro J, Bouza C, Sánchez L, Cal RM, Piferrer F y Martínez P. 2003. Gynogenesis assessment using microsatellite genetic markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biotechnol.* 5: 584-592.
- Castro J, Pino A, Hermida M y col. 2006. A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions *Aquaculture* 261:1194–1203.
- Cerdà J, Mercadé J, Lozano J, Manchado M y col. 2008. Genomic resources for a commercial flatfish, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): EST sequencing, oligo microarray design, and development of the Soleamold bioinformatic platform. *BMC Genomics* 9:508 doi: 10.1186/1471-2164-9-508.
- Cerdá J, Douglas S y Reith M. 2010. Genomic resources for flatfish research and their applications. *Journal of Fish Biology* 77, 1045–1070.
- Cervera MT, Storme V, Ivens B, Gusmao J, Liu BH y col. 2001. Dense genetic linkage map of three *Populus* species (*P. deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics* 158: 787-809.

- Chen SL, Ma HY, Jiang Y, Liao XL, Meng L. 2007. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite sequences from an EST library of turbot (*Scophthalmus maximus*) and cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes.* 7: 848–850.
- Chen SL y col. 2008. Development of 15 novel dinucleotide microsatellite markers in the Senegalese sole *Solea senegalensis* *Fisheries Science* 74, 1357–135.
- Cheng L, Liu L, Yu X, Wang D, Tong J. 2010. A linkage map of common carp (*Cyprinus carpio*) based on AFLP and microsatellite markers. *Anim Genet.*;41(2):191-8.
- Chistiakov DA, Hellemans B, Haley CS, Law AS y col. 2004. Microsatellite Linkage Map of the European Sea Bass *Dicentrarchus labrax* L. *Genetics* 10.1534/104.039719.
- Chistiakov DA, Hellemans B y Volckaert FAM. 2005 Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1-29.
- Cho YG, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, Park WD, Ayres N, Cartinhour S y McCouch SR. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 100: 713–722.
- CIESM. 2002. Alien marine organisms introduced by ships in the Mediterranean and Black Sea. F. Briand (Ed.) CIESM Workshop Series N. 20, 136 pp., Monaco.
- Coimbra MRM, Hasegawa O, Kobayashi K, Koretsugu S, Ohara E, Okamoto N. 2001. Twenty microsatellites for the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.* 67, 358–360.
- Coimbra MRM, Kobayashi K, Koretsugu S y col. 2003. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 220,203-218.
- Costas B, Conceição LEC, Aragao C, Martos JA, Ruiz-Jarabo I, Mancera JM y Alfonso A. 2011. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: Effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture*, 316: 68-76.
- Coughlan J, McCarthy E, McGregor D., O'Donoghue P, Galvin P, Fitzgerald R, Daemen E, Imstrand A, Stefansson S y Cross T. 1996. Four polymorphic microsatellites in turbot *Scophthalmus maximus*. *Anim.Genet.* 27: 433-442.
- Coughlan J, Stefansson M, Galvin P, Dillane E, Fitzgerald R y Cross TF. 2000. Isolation and characterization of 11 microsatellite loci in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Molecular Ecology* 9: 817-829.
- Cross I, Merlo A, Machado M, Infante C, Cañavate JP, Rebordinos L. 2006. Cytogenetic characterization of the sole *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleuronectiformes: Soleidae): Ag-NOR, (GATA)<sub>n</sub>, (TTAGGG)<sub>n</sub> and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. *Genetica*.128 (1-3):253-9.

- Danzmann RG y Gharbi K. 2001. Gene mapping in fishes: a means to an end. *Genetica* 111: 3–23.
- Day OJ, Howell BR, Aksnes A y Nygard E. 1999. Recent advances in the weaning of sole, *Solea solea* (L.). En: Abstracts of contributions presented at the International Conference Aquaculture Europe. EAS Special Publication 27: 40-41.
- De la Herrán R, Robles F, Navas JI, Hamman-Khalifa AM, Herrera M, Hachero I, Mora MJ, Ruiz-Rejon C, Garrido-Ramos M y Ruiz-Rejon M. 2008. A highly accurate, single PCR reaction for parentage assignment in Senegal sole based on eight informative microsatellite loci. *Aquaculture Research*, 39, 1169-1174.
- Derayat A, Houston RD, Guy DR, Hamilton A, Ralph J, Spreckley N, Taggart JB, McAndrew BJ, Haley CS. 2007. Mapping QTL affecting body lipid percentage in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 272(Suppl. 1):S250-S251.
- Desoutter M. 1990. Soleidae. En: Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). Editado por J. C. Quero, J. C. Hureau, C. Karrer, A. Post, L. Saldanha. Vol. 2. JNICT, Lisbon; SEI, Paris; y UNESCO, Paris, pp.1037-1049.
- DeWoody JA y Avise JC. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56, 461-473.
- Díaz-Rosales P, Arijo S, Chabrilón M, Alarcón FJ, Tapia-Paniagua S, Martínez-Manzanares E, Balebona MC y Morfiño MA. 2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 293: 16-21.
- Dinis MT. 1986. Quatre soleidae de l'Estuaire du Tage. Reproduction et Croissance. Essai d'Élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. Tesis doctoral. Universidad de Bretaña Occidental. Brest, Francia: 347 pp.
- Dinis MT, Reis J, Arrobas I, 1996. Evaluation of the farming potential for *Solea senegalensis* Kaup, a new species for aquaculture in the Mediterranean area. *Book of Abstracts World Aquaculture 96*, Bangkok, pp. 107-109.
- Dinis MT, Ribeiro L, Soares F, y Sarasquete C. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and Portugal. *Aquaculture* 176: 27-38.
- Dokholyan NV, Buldyrev SV, Havlin S, Stanley HE. 2000. Distribution of dimeric tandem repeats in noncoding and coding DNA sequences. *J. Theor. Biol.* 202, 273–282.
- Douglas S.E., Knickle L.C., Kimball J. & Reith M.E. 2007. Comprehensive EST analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), a commercially relevant aquaculture species. *BMC Genomics* 8, 144–155.
- Elgar G. 1996. Quality not quantity: the pufferfish genome. *Human Molecular Genetics* 5, 1437–1442.

Engrola S, Iglesias-Romero M, Dias ML, Ribeiro L, Conceição L, Dinis MT y Pousão-Ferreira P. 2004. Recent studies on the weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). En: Book of abstracts of the 11th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish (2-7 de mayo. Phuket, Tailandia).

Estoup A y Anger B. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. En: Advances in Molecular Ecology. G. R. Carvalho (ed.): 51-86. IOS Press. Amsterdam.

**F**ernández-Díaz C, Yufera M, Cañavate JP, Moyano FJ, Alarcón FJ y Díaz M. 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of fish Biology*, 58: 1086- 1097.

Fernández-Trujillo, MA, Porta J, Manchado M, Borrego JJ, Alvarez MC y Béjar J. 2008. c-Lysozyme from Senegalese sole (*Solea senegalensis*): cDNA cloning and expression pattern. *Fish and Shellfish Immunology* 25:697-700.

Flos R, Reig L, Fernandez JV, Ambrosio PP y Carbo R. 1995. Ensayos preliminares para el cultivo intensivo de lenguado. In: Castello i Orvay, F., Calderer i Reig, A. (Eds). Proceedings of the V Congreso Nacional de Acuicultura. Barcelona, España, pp. 839-844.

Fopp-Bayat D. 2008. Inheritance of microsatellites in haploid sturgeons *Aquaculture Research*, 2008, 39, 1787-1792

Fortes GG, Nonnis-Marzano F, Gandolfi G, Cal R, Piferrer F, Bouza C, Martínez P y Sánchez L. 2004. Preliminary linkage map in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with AFLPs and microsatellite markers. En: *Aquaculture Europe 2004: Biotechnologies for Quality* (20-23 de octubre, 2004. Barcelona, España). S. Adams y J. A. Olafsen (eds.). 34: 346-348. European Aquaculture Society. Special Publication. 34: 346-348.

Fortes GG. 2008. Desarrollo de un mapa genético con marcadores AFLP y microsatélite en rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Fortes GG, Marzano FN, Bouza C, Martinez P, Ajmone-Marsan P y Gandolfi G. 2008. Application of amplified fragment length polymorphism markers to assess molecular polymorphisms in gynogenetic haploid embryos of turbot (*Scophthalmus maximus*) *Aquaculture Research* 39, Pages: 41-49.

Franch R, Louro B, Tsalavouta M, Chatziplis D, Tsigenopoulos CS y col. 2006. A Genetic Linkage Map of the Hermaphrodite Teleost Fish *Sparus aurata* L. *Genetics* 174: 851 -861.

Freire R, Arias Pérez A, Méndez J e Insua A. 2005. Aislamiento y caracterización de secuencias microsatélites en *Mimachlamys varia*. Comunicación Congreso SEG (5-7 de Octubre. Roquetas de Mar, Almería).

Fujiwara A, Fujiwara M, Nishida-Umehara C, Abe S y Masaoka T. 2007 Characterization of Japanese flounder karyotype by chromosome bandings and fluorescence in situ hybridization with DNA markers. *Genetics* 131:267–274.

Funes V, Zuasti E, Catanese G, Infante C y Manchado M. 2004. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Molecular Ecology* 4: 339-341.

**G**arcía-López A, Martínez-Rodríguez G, Sarasquete C. 2005. Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): Anatomy, histology and histochemistry. *Histology and Histopathology* 20: 1179-1189.

Garoia F, Marzola S, Guarniero I, Trentini M y Tinti F. 2006. Isolation of polymorphic DNA microsatellites in the common sole *Solea vulgaris*. *Molecular Ecology Notes* 6, 144–146.

Gavaia PJ, Dinis MT y Cancela ML. 2002. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 211: 305-323.

Gerhard GS, Kauffman EJ, Grundy MA. 2000. Molecular cloning and sequence analysis of the *Danio rerio* catalase gene. *Comp. Biochem. Physiol., B Biochem. Mol. Biol.* 127, 447–457.

Goldgar DR, Fain PR y Kimberling WJ. 1989. Chiasma-based models of multilocus recombination: Increased power for exclusion mapping and gene ordering. *Genomics* 5:283-290.

Goldstein D y Schlötterer C. 1999. *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Grimholt U, Drablos F, Jorgensen SM, Hoyheim B y Stet RJM. 2002. The major histocompatibility class I locus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): polymorphism, linkage analysis and protein modelling. *Immunogenetics* 54:570-581.

Guyon R, Rakotomanga M, Azzouzi N, Coutanceau JP, Bonillo C, D'Cotta H, Pepey E, Soler L, Rodier-Goud M, D'Hont A, Conte MA, van Bers NE, Penman DJ, Hitte C, Crooijmans RP, Kocher TD, Ozouf-Costaz C, Baroiller JF, Galibert F. 2012. A high-resolution map of the Nile tilapia genome: a resource for studying cichlids and other percomorphs. *BMC Genomics*. Jun 6;13(1):222.

Guyomard R, Mauger S, Tabet-Canale K, Martineau S, Genet C, Krieg F, Quillet E. 2006. A type I and type II microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms. *BMC Genomics* 7, 1–13.

Guzmán JM y col. 2011. Effects of in vivo treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Molecular & Integrative Physiology* 158, Issue 2, 235–245.

**H**aldane JBS. 1919. The mapping function. *J. Genet.* 8: 299-309.

Hartl DL y Jones EW. 1998. *Genetics: Principles and Analysis*. 4ª Ed. Gareth Stevens Publishing. Sudbury, MA.

Hirono I, Nam BH, Kurobe T, Aoki T. 2000. Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. J. Immunol. 165,4423–4427.

Infante C, Ponce M, Manchado M. 2011. Duplication of calsequestrin genes in teleosts: Molecular characterization in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 58(4):304-14.

Iyengar A, Piyapattanakorn S, Heipel DA, Stone DM, Howell BR. 2000. A suite of highly polymorphic microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with potential for use across several flatfish species. Mol. Ecol. 9: 365-378.

Jaillon O y col., 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. Nature 431, 946–957.

Ji XS, Chen SL, X.L. Liao, JF. Yang, TJ. Xu, HY. Ma, Y.-S. Tian, Y.-L. Jiang y P.-F. Wu 2009. Microsatellite-centromere mapping in *Cynoglossus semilaevis* using gynogenetic diploid families produced by the use of homologous and non-homologous sperm. Journal of Fish Biology 75, 422–434.

Jones FC y col. 2012b. The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks. Nature, 484:55-61.

Kai W, Kikuchi K, Fujita M, Suetake H, Fujiwara A, Yoshiura Y, Ototake M, Venkatesh B, Miyaki K, Suzuki Y: A genetic linkage map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. Genetics 2005, 171:227-238.

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. 2006. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology 6:974-979.

Kandpal RP, Kandpal G, Weissman SM. 1994. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region specific markers. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 88-92.

Kang JH, Kim WJ, Lee WJ. 2008. Genetic linkage map of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Int.J.Biol.Sci 4(3):143-149.

Kasahara M, Naruse K, Sasaki S y col. 2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. Nature 447, 714–719.

Kauffman EJ y col. 1995. Microsatellites-centromere mapping in the zebrafish (*Danio rerio*). Genomics 30:337-341.

Knapik EW, Goodman A, Ekker M, Chevrette M, Delgado J y col. 1998. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). Nature Genetics 18: 338-343.

Kocher TD, Lee WJ, Sobolewska H, Penman D y McAndrew B. 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148: 1225-1232

Kosambi DD. 1994. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics* 12: 172:175.

Lander ES y Green P. 1987. Construction of multilocus linkage maps in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2363-2367.

Lauder GV y Liem GF. 1983. The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 150:95-197.

Lee WJ y Kocher TD. 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology* 49:169-171.

Lee BY, Lee WJ, Streelman JT, Carleton KL, Howe AE, Hulata G, Slettan A, Stern JE, Terai Y, Kocher TD. 2005. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis spp.*). *Genetics* 170, 237–244.

Li L, Xiang J, Liu X, Zhang Y, Dong B y Zhang X. 2005. Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. *Aquaculture* 245: 63-73.

Lie O, Slettan A, Lingaas F, Olsaker I, Hordvik I y col. 1994 Haploid gynogenesis: a powerful strategy for linkage analysis in fish. *Anim. Biotechnol.* 5: 33-45.

Liu Z, Tan G, Li P, Dunham RA. 1999a. Transcribed dinucleotide microsatellites and their associated genes from channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 190–194.

Liu Z, Li P, Kocabas A, Karsi A, Ju Z. 2001. Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 317–324

Liu YG, Sun XQ, Gao H, Liu LX. 2007. Microsatellite markers from an expressed sequence tag library of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and their application in other related fish species. *Molecular Ecology Notes* 7, 1242-1244.

López GG y Moncada BP. 2005. Construcción de un mapa de ligamiento genético preliminar en *Coffea liberica* x *C. eugenioides*. *Cenicafé* 56(4):319-338.

Maliepaard C, Jansen J y Van Ooijen JW. 1997. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. *Genet. Res., Camb.* 70: 237-250.

Manchado M, Zuasti E, Cross I, Merlo A, Infante C, Rebordinos. 2006. Organization, nucleotide sequence and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *S. senegalensis*: a new linkage to the U1, U2 and U5 small nuclear RNA genes. *Genome*, 49: 79- 86.

- Manly KF, Cudmore Jr y Meer JM. 2001. Map Manager QTX, crossplatform software for genetic mapping. *Mammalian Genome*. 12: 930- 932.
- Martínez P, Hermida M, Pardo BG, Fernández C, Castro J, Cal RM, Alvarez-Dios JA, Gómez-Tato A. y Bouza C. 2008. Centromere- linkage in the turbot (*Scophthalmus maximus*) through half-tetrad analysis in diploid meiogynogenetics. *Aquaculture* 280, 81–8.
- Martínez P, Bouza C, Hermida M, Fernández J y col. 2009. Identification of the Major Sex-Determining Region of Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics* 183: 1443–1452.
- Matsuoka MP, Infante C, Reith M, Cañavate JP, Douglas SE y Manuel Manchado M. 2008. Translational Machinery of Senegalese Sole (*Solea senegalensis* Kaup) and Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): Comparative Sequence Analysis of the Complete Set of 60S Ribosomal Proteins and their Expression. *Marine Biotechnology* 10:6, 676-691.
- Mechaly AS, Vinas J, Murphy C, Reith M y Piferrer F. 2010. Gene structure of the kisspeptin-1 receptor-2 (Kiss1r-2) in the Atlantic halibut: insights into the evolution and regulation of Kiss1r genes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 317, 78–89.
- Metzgar D, Bytof J, Wills C. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA, *Genome Res.* 10: 72-80.
- Millán Pérez, Adrián. 2010. Tesis doctoral. Desarrollo de un microarray para la identificación de genes de resistencia a patógenos de interés industrial en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) Universidad de Santiago de Compostela.
- Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB, Inoue JG y col. 2003 Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 121–138.
- Moen T, B. Hoyheim B, Munck H y Gomez-Raya L. 2004 A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. *Anim. Genet.* 35: 81–92.
- Mohideen M, Moore JL, Cheng KC. 2000. Centromere-linked microsatellite markers for linkage groups 3, 4, 6, 7, 13, and 20 of zebrafish (*Danio rerio*). *Genomics* 67, 102–106.
- Molina-Luzón MJ, Mora MJ, Navajas-Pérez, R, Robles F, Herrera M, Ruiz-Rejón C, De la Herrán R y Navas JI. Chromosomal manipulation in senegal sole: obtaining of gynogenetic and triploides offspring. Congreso anual de la European Aquaculture Society. Rodas, 2011.
- Molina-Luzón MJ, López JR, Navajas-Pérez R, Robles F, Ruiz-Rejón C y de la Herrán R. Validation and comparison of microsatellite markers derived from Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) genomic and expressed sequence tags libraries. *Molecular Ecology Resources*, doi: 10.1111/j.1755-0998.2012.03163.
- Morgan TH. 1928. The theory of genes. Yale University Press, New Haven, Conn.
- Morgante M, Hanafey M, Powell W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.* 30, 194–200.

Morton NE. 1995b.LODs past and present. *Genetics* 140: 7-12.

Moxon ER y Wills C. 1999. DNA microsatellites: agents of evolution. *Scientific American*, Jan 1999, 94-99.

Moyle PB y Cech JJ Jr. 1996. *Fishes: an introduction to ichthyology*. 3rd ed., Prentice Hall.

Naruse K, Tanaka M, Mita K, Shima A, Postlethwait J y Mitani H.2004 A medaka gene map: the trace of ancestral vertebrate proto-chromosomes revealed by comparative gene mapping.*Genome Res* 14:820–828.

Navajas-Pérez R, Robles F, Molina-Luzón MJ, de la Herrán R, Álvarez-Dios JA, Pardo BG, Vera M, Bouza C y Martínez P. "Exploitation of a turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immune-related expressed sequence tag (EST) database for microsatellite screening and validation" *Molecular Ecology Resources*, doi:10.5061/dryad.q2c86hb2.

Nelson JS.2006. *Fishes of the World*. 4th ed. Wiley, New York, 601 pp.

Nonneman D y Waldbieser GC. 2005. Isolation and enrichment of abundant microsatellites from a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) brain cDNA library. *Anim. Biotechnol.* 2: 203-116.

O'connell M Y Wringht J.M.1997. Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 7, 331±363.

Olmedo M, Peleteiro JB, Cal R, Linares F. 2003. Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) en Galicia. *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, pp. 383– 385.

Ott J.1999. *Analysis of human Gentic Linkage*. (3ª ed.) Johns Hopkins Press, Baltimore, MD.

Paglia GP, Olivieri AM y Morgante M. 1998. Towards second-generation STS (sequence-tagged sites) linkage maps in conifers: a genetic map of Norway spruce (*Picea abies* K.). *Mol. Gen. Genet.* 258: 466-478.

Pardo GB y col., 2005. Phylogenetic análisis of flatish (Order Pleuronectiformes) based on mitochondrial 16s rDNA sequences.*CSIMAR.* 69(4): 531:543.

Pardo GB, Casas L, Fortes GG, Bouza C, Martínez P, Clark MS and Sanchez L. 2005.New microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*) derived from an enriched genomic library and sequence databases. *Molecular Ecology Notes* 5, 62–64.

Pardo BG., Fernández C., Hermida M. y col. 2007. Development and characterization of 248 novel microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genome* 50, 329-32.

Pardo BG, Fernández C, Millán A, Bouza C, Vázquez-López A, Vera M, Álvarez-Dios JA, Calaza M, Gómez-Tato A, Vázquez M, Cabaleiro S, Magariños B, Lemos ML, Leiro JM,

- Martínez P. 2008. Expressed sequence tags (ESTs) from immune tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) challenged with pathogens. *BMC* 4:37.
- Pérez F, Ortiz J, Zhinaula M, Gonzabay C, Calderón J, Volckaert FAMJ. 2005. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus biridy*. *Mar. Biotechnol.* 7, 554–569.
- Person-Le Ruyet J, Lahaye J, Deniel C, Metailler R, Devauchelle N, Menu B, Noel T, Baudin-Laurencin F. 1989. El cultivo de peces planos: lenguado y rodaballo. *Acuicultura*. Barnabé G (Ed.), Ed Omega, pp. 613-653.
- Piferrer F, Cal RM, Gómez C, Alvarez-Blázquez B y col. 2004. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture* 238: 403–419.
- Piferrer F, Felip A y Cal R.M<sup>a</sup>. 2009. Genética y Genómica en Acuicultura. Cap.10. Editores Martínez P y Figueras A. 1<sup>a</sup> Edic. Publicaciones científicas y tecnológicas de la fundación observatorio español de Acuicultura. Madrid.
- Pinera JA, Bernardo D, Blanco G, Vázquez E y Sánchez JA. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Ecol. Notes*, 6.
- Plomion C, Bahrman N, Durel C.E. y O'Malley D.M. 1995. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity* 74: 661-668.
- Ponce M, Salas-Leiton E, Garcia-Cegarra A, Boglino A, Coste O, Infante C, Gisbert E, Rebordinos L, Manchado M. 2011. Genomic characterization, phylogeny and gene regulation of g-type lysozyme in sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol.* 31(6):925-37.
- Porta J y Alvarez C. 2004. Development and characterization of microsatellites from Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Molecular Ecology* 4:277-279.
- Porta, J, Porta JM, Martínez-Rodríguez G, Alvarez MC. 2006a. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* 251, 46–55.
- Porta J y col., 2006b. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* 256.159–166.
- Postlethwait J, Johnson SL, Midson CN, Talbot WS, Gates M y col. 1994. A genetic linkage map for the zebrafish. *Science* 264: 699-703.
- Prat F. 2003. *Pleurogene: El Primer Proyecto de Genómica de Peces en España*. Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
- Purdom C.E. 1976. Genetic techniques in flatfishes culture. *J. Fish. Res. Board. Can.* 33: 1088-1093.

- Rajapakse S, Byrne DH, Zhang L, Anderson N, Arumuganathan K y Ballard RE. 2001. Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 575-583.
- Reid DP, Szanto A, Glebe B, Danzmann RG, Ferguson MM. 2005 QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Heredity*, 94:166-172.
- Reid DP, Smith CA, Rommens M y col. 2007. A genetic map of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) *Genetics* 107,753-74.
- Rexroad CE, Rodriguez MF, Coulibaly I, Gharbi K, Danzmann RG, Dekoning J, Phillips R, Palti Y. 2005. Comparative mapping of expressed sequence tags containing microsatellites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 6, 54.
- Rexroad CE, Palti Y, Gahr SA, Vallejo RL. 2008. A second generation genetic map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genet.* 2008 Nov 19; 9: 74.
- Ribeiro L, Sarasquete C, y Dinis M.T. 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, 171, 293-308.
- Rico C, Rico I y Hewitt G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263, pp. 549–557.
- Rodríguez RB. 1984. Biología y cultivo de *Solea senegalensis* Kaup 1858 en Golfo de Cadiz. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, España.
- Rodríguez JP, Perdigón C y col. 1995. Estrategias de cultivo de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) en estanques de la bahía de Cádiz. Datos preliminares. In: Actas V Congreso Nacional de Acuicultura. Sant Carles de la Ràpita, 10-13 May. Universitat de Barcelona, Barcelona, pp. 874-878.
- Rodríguez JL, Souto BF. 2003. Engorde del lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) en Galicia con temperatura controlada. Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, pp. 407– 409.
- Rodríguez-Ramilo ST, Toro MA, Bouza C, Hermida M, Pardo BG, Cabaleiro S, Martínez P, Fernández J. 2011. QTL detection for *Aeromonas salmonicida* resistance related traits in turbot (*Scophthalmus maximus*) *BMC Genomics*.12:541.
- Rozen S y Skaletsky HJ. 1998. Primer3. Code available at [http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3_www.cgi).
- Ruan X, Wang W, Kong J, Yu F y Huang X. 2010. Genetic linkage mapping of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using microsatellite markers and its application in QTL analysis. *Aquaculture* 308, 89-100.
- Ruan X, Wang W, Kong J. y Hu J. 2011. Isolation and analysis of microsatellites in the genome of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (4), pp. 507-518, 24.

- Saal B y Wricke G. 2002. Clustering of amplified length polymorphism markers in a linkage map of rye. *Plant breeding* 121: 117-123.
- Sáenz de Rodrigáñez M y col. 2005. Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 21 (1-4). 2005: 95-104.
- Saito R y Tomita M. 1999. On negative selection against ATG triplets near start codons in eukaryotic and prokaryotic genomes. *J. Mol.Evol.* 48: 213-217.
- Sakamoto T, Danzmann RG, Gharbi K, Howard P y col. 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rate. *Genetics* 155: 1331-1345.
- Salas-Leiton E, Anguis V, Manchado M y Cañavate JP. 2008. Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. *Aquaculture* 285, 84-89.
- Samadi S, Artiguebielle E, Estoup A, Pointier JP, Silvain JF, Heller J, Cariou ML, Jame P. 1998. Density and variability of dinucleotide microsatellites in the parthenogenetic polyploid snail *Melanoides tuberculata*. *Mol. Ecol.* 7(9): 1233-1236.
- Sambrook J y Russel DW. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* 1th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5467.
- Sarropoulou E, Nousdili D, Magoulas A, Kotoulas G. 2008. Linking the genomes of nonmodel teleosts through comparative genomics. *Mar. Biotechnol. (NY)* 10, 227–233.
- Schoen DJ. 2000. Comparative genomics, marker density and statistical analysis of chromosomal rearrangements. *Genetics* 154:943-952.
- Sekino M y Hara M. 2000. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Mol. Ecol.*, 9: 2200- 2202.
- Senger F, Priat C, Hitte C, Sarropoulou E, Franch R y col. 2006. The first radiation hybrid map of a perch-like fish: the gilthead seabream (*Sparus aurata* L) *Genomics* 87: 793–800.
- Sewell MM, Sherman BK y Neale DB. 1999. A consensus map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Construction and integration of individual linkage maps from two outbred three-generation pedigrees. *Genetics* 151:321-330.
- Sha Z, Wang S, Zhuang Z, Wang Q, Li P, Ding H, Wang N, Liu Z, Chen S. 2010. Generation and analysis of 10 000 ESTs from the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* and identification of microsatellite and SNP markers. *Journal of Fish Biology* 76, 1190-1204.
- Shimoda N, Knapik EW, Ziniti J, Sim C, Yamada E y col. 1999. Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics* 58: 219-232.

- Singer A, Perlman H, Yan Y, Walker C, Corley-Smith G y col. 2002. Sexspecific recombination rates in zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics* 160: 649-657.
- Slettan A, Olsaker I y Lie O. 1993. Isolation and characterization of variable (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Animal Genetics* 533-542. 24, 195-197.
- Slettan A, Olsaker I y Lie O. 1997. Segregation studies and linkage analysis of Atlantic salmo microsatellites using haploid genetics. *Heredity* 78: 620- 627.
- Soares F, Engrola S, Dinis MT. 2001. Anomalías en la pigmentación de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*). *Bol Inst Esp Oceanogr* 18: 405-408.
- Spruell P, Pilgrim KL, Greene BA, Habicht C, Knudsen KL, Lindner KR, Olsen JB, Sage GK, Seeb JE, and Allendorf FW. 1999. Inheritance of nuclear DNA markers in gynogenetic haploid pink salmon. *J Hered* 90:289–296.
- Stam P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JOINMAP. *Plant J.* 3: 739-744.
- Stam P y van Ooijen JW. 1995. JOINMAP version 2.0: software for the calculation of genetic linkage maps. DLO-Center for Plant Breeding and Reproduction Research, Wageningen, The Netherlands.
- Strachan T y Read A. 1999. *Human Molecular Genetics*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- T**abata K y Gorie S. 1991. Induction of gynogenetic diploids in *Paralichthys olivaceus* by suppression of the 1st cleavage with special reference to their survival and growth. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54 11, pp. 1867–1872.
- Tautz D y M Renz. 1984. Simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers, *Nucleic Acid Res.* 17: 6463-6471.
- Thorgaard GH, Allendorf FW y Knudsen KL. 1983. Gene-centromere mapping in rainbow trout: high interference over long map distances. *Genetics* 103: 771-783.
- Thorgaard GH, Scheerer PD, Parsons JE. 1985. Residual paternal inheritance in gynogenetic rainbow trout: implications for gene transfer. *Theor. Appl. Genet.*, 71: 119 -121.
- Tóth G, Gáspáry Z y Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967-981.
- Tvedt HB, BenéfytJ, Martin-Robichaud DJ, McGowanC, y Reith M. 2006. Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 252: 573–583.

- Vallejos CE, Sakiyama NS y Chase C. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131: 733-740.
- Van Ooijen JW y Voorrips RE. 2001. JoinMap® version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen: Plant Research International.
- Vázquez R. y col., 1995. Puesta natural y cría larvaria de *Solea senegalensis* Kaup 1958 en las instalaciones del C.I.C.E.M. “El Toruño” (Cádiz). *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*: 443-448.
- Vega L, Díaz E, Cross I y Reborditos L. 2002. Caracterizaciones citogenética e isoenzimática del lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4): 245-250.
- Venkatesh B y Brenner S, 1997. Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of teleost growth hormone genes. *Gene* 187, 211–215.
- Vera M, Alvarez-Dios JA, Millán A, Pardo BG, Bouza C, Hermida M, Fernández C, de la Herrán R, Molina-Luzón MJ, Martínez P: Validation of single nucleotide polymorphism (SNP) markers from an immune Expressed Sequence Tag (EST) turbot, *Scophthalmus maximus*, database. *Aquaculture* 2011, 313:31-41.
- Vernau O, Moreau C, Catzefflis FM y Renaud F. 1994. Phylogeny of flatfishes (Pleuronectiformes): comparisons and contradictions of molecular and morpho-anatomical data. *J Fish Biol*, 45, 685–696.
- Villalta M, Estévez A y Bransden M. 2005. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 245:193-209.
- Voorrips RE. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered*, 3:77-78.
- Wang XB, Kakoulidou M, Giscombe R, Qiu Q, Huang D, Pirskanen R y Lefvert AK. 2002. Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with Myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. *J. Neuroimmunol.* 130, 224–232.
- Wang CM, Loong C Lo, Ze Y Zhu y Gen HYue. 2006. A genome scan for quantitative trait loci affecting growth-related traits in an F1 family of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *BMC Genomics* 7:274.
- Wang CM, Zhy ZY, Lo LC, Feng F, Lin G y col. 2007. A microsatellite linkage map of barramundi, *Lates calcarifer*. *Genetics* 175: 907-915.
- Wang H, Yin Q, Feng Z, Li D, Sun X y Li C. 2008. Construction Fractional Genomic Libraries and Screening Microsatellites DNA of *Esox reieheri* Dybowski. *Zoological Research* 3, 245-252.
- Wang CM, Zhi Yi Bai, Xiao Ping He, Grace Lin, Jun Hong Xia, Fei Sun, Loong Chueng Lo, Felicia Feng, Ze Yuan Zhu and Gen Hua Yue. 2011 A high-resolution linkage map for

comparative genome analysis and QTL fine mapping in Asian seabass, *Lates calcarifer* BMC Genomics, 12:174.

Weber JL y May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal Human Genetics 44: 388-396.

Weber JL. 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphism. Genomics 7: 524-530.

Williams CG. 1998. QTL mapping in outbreed pedigrees. In: Molecular Dissection of Complex Traits, Paterson, A. H. (ed). USA, CRC Press, New York, pp: 81-95.

Wren JD, Forgac E y Fondon JW. 2000. Repeat polymorphism within gene regions: phenotypic and evolutionary implications. Am. J. Hum. Genet. 67, 345–356.

Yamamoto E. 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture* 173, pp. 235–246.

Young WP, Wheeler PA, Coryellc VH, Keim P y col. 1998. A Detailed Linkage Map of Rainbow Trout Produced Using Doubled Haploids. *Genetics*, Vol. 148, 839-850.

Zane L, Bargelloni L y Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

Zimmerman AM, Wheeler PA, Ristow S and Thorgaard GH. 2004. Composite interval mapping reveals three QTL associated with pyloric caeca number in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 247:85-95.

Zimmerman, AM, Evenhuis JP, Thorgaard GH y Ristow SS. 2004. A single major chromosomal region controls natural killer cell-like activity in rainbow trout. *Immunogenetics* 55: 825-835.

Zorrilla I, Arijo S, Chabrilón M, Díaz P, Martínez-Manzanares E, Balebona MC y Moriño MA. 2003. *Vibrio* species isolated from diseased farm sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *J. Fish Dis.*, 26: 103-108.

## **VIII. ANEXOS**

---

## ANEXO I

### Extracción de ADN de sangre

El método de extracción se realizó siguiendo el protocolo, que recomienda la casa comercial Macherey-Nagel para el kit Nucleo Spin Blood ®, con los siguientes pasos:

1. A un volumen de 50 µl de sangre se le añaden 25 µl de proteinasa K, 125 µl de PBS y 200 µl de tampón B3.
2. Mezclamos por vórtex durante 10-20 s.
3. Incubamos durante 10-15 min a una temperatura de 70°C.
4. Añadimos 210 µl de etanol y mezclamos bien por vórtex.
5. Ponemos la muestra en una columna y centrifugamos a 14000 rpm durante 1 min. El ADN quedará atrapado en la membrana de sílice.
6. Pasamos la columna a un tubo colector limpio y añadimos 500 µl de tampón BW. De nuevo centrifugamos a 14000 rpm durante 1 min.
7. Descartamos el tubo colector y lo ponemos en otro limpio. A la muestra le añadimos 600 µl de tampón B5 y centrifugamos a 14000 rpm durante 1 min.
8. Pasamos la columna a un tubo de 1.5 ml y le añadimos 100 µl de tampón BE previamente calentado a 70°C. Incubamos 1 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugamos a 14000 rpm durante 1 min. Las muestras se resuspendieron con 50 µL de agua ultrapura y se guardan a -20°C.

## ANEXO II

### Obtención de genoteca enriquecidas con microsatélites en *Solea senegalensis*

#### 1. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Se llevaron a cabo digestiones de ADN genómico de *S. senegalensis* con las enzimas de restricción *RsaI* y *HaeIII*.

Se digirieron 2 µg de ADN total con 20 unidades de enzima en el tampón recomendado por el fabricante (Biolabs). Se añadieron 100 ng de ARNasa y se ajustó el volumen a 50µl con agua destilada. Se dejaron incubando durante toda la noche en una estufa a 37°C.

#### 2. Inactivación de las enzimas de restricción

Para inactivar las enzimas de restricción, a cada una de las digestiones se le aplicó un tratamiento térmico a 80°C durante 20 min.

#### 3. Secado de las muestras por vacío

Las muestras se secaron durante 2 horas a 60°C utilizando un evaporador con bomba de vacío.

#### 4. Preparación de los adaptadores AP11/123. Ligación de los adaptadores al ADN

Se realizó una mezcla equimolar de:  
 AP 11 5'-CTCTTGCTTAGATCTGGACTA-3'  
 AP 12 5'-pTAGTCCAGATCTAAGCAAGAG-3'

Se desnaturalizó a 94°C durante 10 min y se dejó enfriar durante toda la noche a 25°C. La concentración de AP11/12 es de 50 ng/μl.

Resuspendemos los fragmentos generados por digestión en un volumen final de 30 μl de ligación conteniendo:

100 ng de AP11/12  
 2000 unidades de T4 ligasa  
 Tampón 10X ligasa  
 Agua destilada

Incubamos durante 16 horas a 14°C.

### 5. Preamplificación

La reacción de preamplificación se realizó en un volumen final de 50 μl que contenían: 2 μl de la reacción de ligación; 10 mM Tris-ClH pH=8.3; 5 mM NH<sub>4</sub>C; 50 mM KCl; 2 μl de Cl<sub>2</sub>Mg 50 mM; 0.2 mM de cada dNTP; 0.2 μM del cebador AP11 y 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa.

La preamplificación se llevó a cabo durante 10 ciclos y los parámetros de cada ciclo fueron: 30 s a 94°C, 15 s a 55°C y 1 min a 72°C.

### 6. Hibridación y enriquecimiento de STRs

Se realizó una mezcla con 100 ng del producto preamplificado; 200 ng de cada oligo biotinilado, ajustando el volumen a 100 μl con 6XSSC + 0.1% SDS.

Los oligos que se utilizaron fueron b(ACA)<sub>15</sub>, b(ATT)<sub>15</sub>, b(CT)<sub>30</sub> de forma individual y dos combinaciones, una formada por b(AGA)<sub>10</sub>, b(GCC)<sub>10</sub>, b(GT)<sub>30</sub> y otra por b(GCC)<sub>10</sub>, b(ACA)<sub>15</sub>, b(GA)<sub>30</sub>.

Desnaturalizamos las mezclas durante 5 min a 94°C y posteriormente se dejaron hibridando 1 hora a 60°C.

Añadimos 200 μg (20 μl) de bolitas de estreptavidina frescas equilibradas con 6XSSC e incubamos durante 15 min a 60°C con agitación suave (750 rpm).

Eliminamos el sobrenadante en un soporte magnético. Realizamos dos lavados con 300 μl de 6XSSC+0.1% SDS e incubamos 15 min a 25°C con agitación suave (500 rpm).

Volvemos a descartar el sobrenadante en el soporte magnético y lavamos dos veces con 300 μl de 6XSSC+0.1% SDS durante 15 min a 60°C sin agitación.

Por último lavamos dos veces con 300 μl de 6XSSC durante 5 min a 25 °C sin agitación.

### 7. Elución de STRs

Añadimos 50 μl de 0.1 M NaOH incubando la muestra a 85°C durante 5 min.

Pasamos el sobrenadante a un microtubo limpio y añadimos 50 μl de Tris-pH 7.5 1M.

Purificamos el ADN mediante el Kit Núcleo Fast ® 96 PCR Plates en las condiciones que recomienda el fabricante (Macherey-Nagel).

Diluimos el ADN en 40 μl de TE.

## 8. Amplificación mediante PCR

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l que contenían: 5  $\mu$ l de ADN purificado; 10 mM Tris-ClH pH=8.3; 5 mM  $\text{NH}_4\text{C}$ ; 50 mM KCl; 2  $\mu$ l de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  50 mM; 0.2 mM de cada dNTP; 0.2  $\mu$ M del cebador AP11 y 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa.

La amplificación se llevó a cabo durante 30 ciclos y los parámetros de cada ciclo fueron: 30 s a 94°C, 15 s a 55°C y 1 min y 30 s a 72°C.

El producto de amplificación se purificó de la misma forma que hemos descrita anteriormente.

## 9. Clonación

Ligamos 4  $\mu$ l del ADN purificado al vector de clonación TOPO TA (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen).

Dejamos en incubación 30 min a temperatura ambiente

La mezcla de ligación se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli*, cepa DH5 $\alpha$  (Invitrogen) de la siguiente forma:

Añadimos 2  $\mu$ l de la mezcla de ligación a 40  $\mu$ l de la solución de bacterias y mantenemos en hielo 20 min.

Se da un choque térmico en baño M<sup>a</sup> a 42° C durante 30seg. Pasar a hielo inmediatamente durante 2 min.

Añadir 250  $\mu$ l de medio SOC a temperatura ambiente y dejamos en incubación 1 hora a 37°C.

Los clones recombinantes se detectaron en placas con medio LB (Peptona: Extracto de Levadura: CINa en una relación w/w 2:1:1 y agar al 15%) conteniendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml), IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactósido) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido), (Sambrook y Russel, 2001).

## 10. Screening de mutantes

Tras seleccionar las colonias recombinantes mediante reacción colorimétrica, inoculamos cada una de las colonias en 20  $\mu$ l de agua destilada.

Desnaturalizamos a 94°C durante 1 min y utilizamos 1  $\mu$ l para comprobar el tamaño del inserto mediante PCR.

Las condiciones fueron las siguientes: en un volumen final de 25  $\mu$ l mezclamos 1  $\mu$ l de plásmido recombinante; 10 mM Tris-ClH pH=8.3; 5 mM  $\text{NH}_4\text{C}$ ; 50 mM KCl; 0.2 mM de cada dNTP; 5  $\mu$ M del cebador T3 y T7 respectivamente y 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa.

La amplificación se llevó a cabo durante 30 ciclos y los parámetros de cada ciclo fueron: 30 s a 94°C, 15 s a 52°C y 2 min a 72°C.

El resultado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE.

## ANEXO III

### a) Reacción de secuenciación BigDye terminador v3.1 Cycle Sequencing

A la mezcla de reacción del kit (3  $\mu$ L), que incluye los dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos y Taq ADN polimerasa se le añade:

1. 3 pmol de cebador correspondiente( el directo o el reverso utilizado en la amplificación)
2. 5% de DMSO
3. Buffer 1x
4. 500 ng de ADN
5. Llevar a un volumen final de 20  $\mu$ L con agua ultrapura.

Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 3 min a 94° C, 25 ciclos de 96° C durante 10 s, 50° C durante 5 s y 60° C durante 4 min;

#### **b) Precipitación del ADN secuenciado**

Tras la reacción de secuenciación el ADN fue precipitado para eliminar restos de reactivos y dNTPs marcados que podrían interferir en la lectura de la secuencia.

1. Para ello a cada tubo se le añade:
  - 3  $\mu$ L acetato de sodio 3M pH 4.6
  - 62.5  $\mu$ L etanol 95%
  - 14.5  $\mu$ L agua ultrapura
2. Mezclar por vortéx e incubar durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 min a 4° C. Eliminar el sobrenadante.
4. Añadir 250  $\mu$  L de etanol 70%.
5. Centrifugar a 14.000 rpm durante 15 min a 4° C. Eliminar el sobrenadante con una pipeta y dejar secar.

#### **c) Reacción de amplificación PCR para la puesta a punto de microsatélites**

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 15  $\mu$ L conteniendo:

- 25 ng de ADN genómico, 0,2  $\mu$ M de cada cebador.
- 0,1 mM de cada dNTPs.
- 0,5-1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>.
- 0,2  $\mu$ M de cada primer.
- 1U de Taq polimerasa. (Biotools) y tampón 1x.

La programación del termociclador fue: 5 min a 94°C para la desnaturalización, 35 ciclos de 1 min a 94° C, 45s a la temperatura de aneling y 45s, finalmente la extensión fue durante 10 min a 72° C.

## **ANEXO IV**

### **a) Extracción de ADN de individuos adultos de lenguado y larvas ginogenéticas diploides**

1. El material se introduce en un tubo estéril de 1,5 ml de capacidad y se le añade 900  $\mu$ L de tampón de extracción (10 mM de Tris-HCl y 100 mM de EDTA, ambos a pH 8.0), 45  $\mu$ L de SDS 20 % y 4'5  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL) e incubar los tubos se mantienen a 56° C durante toda la noche.
2. A continuación se añade 2 $\mu$ L de ARNasa libre de DNAsa (10mg/mL, Roche Diagnostics) y mantenemos a 37°C en un baño con agitación suave durante 1 hora.
3. Purificamos el ADN añadiendo un volumen de fenol y centrifugando durante 15 min. a 4° C. Pasamos la primera fase a otro tubo y añadimos 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isamílico (24:24:1) centrifugando otros 15 min. a 4° C.
4. Para la precipitación del ADN, pasamos la primera fase a otro tubo y añadimos 1 volumen de isopropanol, mantenemos en refrigeración durante toda la noche. Se centrifuga a 4° C durante 10 min. y se elimina el sobrenadante; a continuación se añade 50  $\mu$ L de etanol al 70% y se centrifuga de nuevo 5 min.
5. Por último, se elimina el etanol por decantación y dejamos secar para eliminar los restos de alcohol durante 15 min. El ADN libre de alcohol se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua ultrapura.

#### **b) Extracción de ADN de larvas ginogenéticas haploides**

1. La larva se introduce en un microtubo de 0,2 mL de volumen, a continuación se le añade 9  $\mu$ L de tampón de muestra.
2. Se desnaturaliza el ADN a 95° C durante 3 minutos.
3. La muestra de pasa a hielo y a continuación se añade 9  $\mu$ L de tampón de reacción y 1  $\mu$ L de enzima incubándose a 30° C durante toda la noche.
4. Finalmente se somete la muestra a 65° C durante 10 minutos.

## **ANEXO V**

### **Protocolo para la obtención del cariotipo**

1. Se escogieron muestras de ginogenéticos tanto haploides como diploides y se mantuvieron durante 4-6 horas en agua salina con colchicina al 0.01-0.02% y aireación.
2. A continuación, son dispuestas en CIK 0,4% durante 45-60 minutos. Tras este choque hipotónico, se fijan en Carnoy (metanol: ácido acético en proporciones 3:1) durante 30 minutos a 4° C.
3. Transcurrido este tiempo, se elimina totalmente el fijador y se sitúan en un tubo cónico con 15  $\mu$ l de ácido acético al 70%. Con una micropipeta se agita el material hasta formar una suspensión celular.
4. Se deposita una gota sobre un portaobjetos previamente calentado a 60° C, recogiendo la gota nuevamente de forma rápida quedando en el portaobjetos las células extendidas. Estas preparaciones cromosómicas fueron posteriormente teñidas con giemsa y observadas a microscopio óptico.

## **ANEXO VI**

**MICROSATELITES DESCRITOS EN *Solea Senegalensis* POR OTROS AUTORES**

Microsatélite	Forward / Reverse (5'→3')	Motivo repetido	Nº acceso
Sol A	GATCCCGACTCACAACG CACCTCAGTGAAATTGCC	(TA) <sub>32</sub> (AC) <sub>16</sub>	AY426692
Sol 9A	TCTCGTCGAGTCAAATGTCC CTCAGAATAAAGCTCGTTAGC	(CA) <sub>9</sub> (GA) <sub>9</sub>	AF441389
Sol CA13	AAGGCAGATGTCGATCACTGC TGAACAACGCCTAGAATTAGC	(GAA) <sub>10</sub>	AF441390
Sol 13D	GATCATTAGAGAGGTCACACGAGC CATGACATCATCGCAGACC	(GT) <sub>12</sub>	AF441385
Sol 19A	GATCCTCTGTGCCACGACGTTGG GATCTGGCCGAGAGCAGATGC	(GT) <sub>12</sub>	AF441387
Sol GA12	GATCCGCTTGGGGTGAGG TGCCATACTCACTTGTTTCG	(GA) <sub>19</sub>	AF441391
Sol M II	TTCAAAGCAGTCGTCCTCAGG ACGAGGTAGGTGGAAAGCTGC	(CTG) <sub>10</sub>	AY426693
Sol M IJ	TCCTTTCTTTAAGCCCCTCTGG CATCCAAGGATACTCAGACTGC	(CA) <sub>15</sub>	AF441392
Sol 14	GATCCTGTGACATTTGAC GTTTCTGTTTATTCTGG	(TAA) <sub>4</sub> (TAA) <sub>7</sub>	AF441386
F1318/4/7*	GGCTGCAGAACGATCTTTAC GCAACCTTGAGCTGTGACC	(TG) <sub>8</sub> (GT) <sub>4</sub> (GA) <sub>7</sub>	AF173852

*Secuencias de los cebadores y motivo de repetición de los microsatélites publicados en S. senegalensis por Porta y col., 2004 (\*Descrito también en S. solea por Iyengar y col., 2000).*

Microsatélite	Forward / Reverse (5'→3')	Motivo repetido	Nº acceso
CA39	TCTCTTATCTTCCAGCGCGGTGCTTA CGCTGAGACGGATGTTAGGAGGGAAAT	(CA) <sub>13</sub>	AB177541
CA47	CTTGTTATGTAAGTCAAGGTCCAGTGTGCGAGT AAAATTCAAATGGACGGCAAGATGATAAAGC	(CA) <sub>12</sub> (CA) <sub>4</sub>	AB177539
GATA9	GGTCAAACATTTACCCTTAACCCTTAGAACA CCATTCTGGGGGAGACACTACATTTCAAAG	(GATA) <sub>3</sub> (GATA) <sub>3</sub> (GATA) <sub>4</sub>	AB177535
GATA23	CACCTATTGACTTGGCATGACAGGGTTCTT TATGGGTGCATTCACACCAGCTCCTTCT	(GATA) <sub>4</sub> (GATA) <sub>3</sub> (GACA) <sub>3</sub> (GATA) <sub>3</sub>	AB177542
GATA26	GTGTTAGACAGACAGATAGATAGCTGTTAGCA TGTAATGTAAATCTCTCTGACTGTAGTTTAC	(GATA) <sub>12</sub>	AB177537
GATA67	GGGGAAGGTGGGATAAATGGATGATTGA GCTGATTACAAACACCGCCCTGGAAAG	(GATA) <sub>17</sub>	AB177536
GATA3	GGACCCTAATCTCCTGTCTGTCACTTGTGCG CTGGCTGTGGCTGGACGTAACAAGG	(GGTT) <sub>4</sub> (GGTA) <sub>5</sub> (GATA) <sub>6</sub> (GATA) <sub>2</sub>	AB177533
CA28	AGAGACGAGTACACAGGAGGGAAGTGCAG TTTAGAATCCCTGGTGTTACCTCA	(CA) <sub>17</sub>	AB177540
GATA21	GAAAAGCCAAAACCATCAGTTGATCCCAAAG GTAAATATAATGGGCTCCCAACGGAATTTCA	(GATA) <sub>16</sub> (GATA) <sub>4</sub>	AB177538
GATA38	ATATCATCAGGCAGTAAAACGGTTCGCAAATG GCAATCTGCAAACCTGACCACTAGATGCCAGT	(GATA) <sub>38</sub>	AB177534

*Secuencias de los cebadores y motivo de repetición de los microsatélites publicados en S. senegalensis por Funes y col., 2004.*

## ANEXO VII

## MICROSATÉLITES PROCEDENTES DE RODABALLO

Microsatélite	Primer directo y reverso (5'→3')	Motivo repetido	Nº acceso
Smax-02	GGAGGATGTATTGAAAGTGT AGAGCAGGTCATTATACAGC	(TG) <sub>16</sub>	Z78101
Sma-E44	CGAGAAATACTACACCCGGC CACCTCGGGAACGTAGTTGT	(GA) <sub>5</sub>	HS029792
Sma-E50	CACATCGTTGGGACAATCAG AGCAGTGAGCCTCTTTGGAC	(GT) <sub>9</sub> (GA) <sub>16</sub>	FE944549
Sma-E55	GCGTCCGCAAAGTCTATCTT GAGTCAGTCGCACAGTCAGC	(AGC) <sub>4</sub>	EY455436
Sma-E71	CAGATCGTCTTCTCGCTCCT TGAGAGGAGTCACTTGTCGG	(GCT) <sub>8</sub>	EY456073
Sma-E84	TGCATCTATTCTGTGGTGA TGTTGGTTCATAACTGAGCGAC	(GT) <sub>19</sub>	FE946202
Sma-E91	GACGGACGATACCTGCTGAT ACACTCGCCTCGTTTCTCAT	(TG) <sub>5</sub>	EY455139
Sma-E96	TCTGCTGGCTCACCTAACA ATAGGGTCTGCACTCATGGC	(ACC) <sub>8</sub>	HS029712
Sma-E113	CACACATCCACAGACTCGCT AAACATTCTCTCAGTGCCG	(TA) <sub>25</sub>	HS030462
Sma-E118	TATTATGGAGGGATCGGCTG TCAACGTGATGTTTGCCCTC	(TG) <sub>21</sub>	HS030934
Sma-E122	GACGGGACCTTCCACAAGTA ATCGCTCTCGTTCGTCATCT	(GAC) <sub>4</sub>	HS031620
Sma-E148	GCCATGATGAGCACGATCTA TCAAATACATGGGCCAGACA	(AGG) <sub>6</sub>	FE944634
Sma-E193	CTGGCCTAATGGCTCAGATG TCAGGTCAGTCTGGTTGGTG	(GCA) <sub>6</sub>	FE951765.1
Sma-E209	CTCTGGTGGTCCTTTGGTGT TCCGTCTCCTTCGATTTCAC	(AG) <sub>11</sub>	HS029487
Sma-E212	CCCAGAAACTCACACCCT AAGCGCCTGTTGTACTGGAT	(AGG) <sub>14</sub>	HS029977
Sma-E220	CAGGATTGAGGAGGAGCTTG ACCACAGACTTGGACCTTGG	(AC) <sub>20</sub>	HS032420
Sma-E273	TGGTGGTCCTCTGGTGTGTA ACCTCCTGTCTCCGTCTCCT	(AG) <sub>11</sub>	HS031951
Sma-E288	CTCCACCTTCCAGCAGATGT AGGTCAGACGCCAAACTGTC	(GAA) <sub>6</sub>	FE945200.1

*Microsatélites diseñados en rodaballo y seleccionados de Coughlan y col., 1996 y Navajas-Perez y col., 2012.*

**MICROSATÉLITES PROCEDENTES DE PLATIJA**

<b>Microsatélite</b>	<b>Primer directo y reverso (5'→3')</b>	<b>Motivo repetido</b>	<b>Nº acceso</b>
Poli 163TUF	ATGGCCTTGTGTTTGTCTGTTT ATCCACATCCCCTTAGGCTAGTCC	(CA) <sub>16</sub>	AB459435
Poli 129TUF	ACAGCTGCTCTGTGTGTATGTTTGC TTGCTGACTTCCTCTGTTTACTCCC	(CA) <sub>37</sub>	AB459406
Poli 200TUF	ACAGCTGCTCTGTGTGTATGTTTGC CTTGCTGACTTCCTCTGTTTACTCCC	(CA) <sub>3</sub>	AB086616
Poli 107 TUF	TGGAAGAGATGTGCACTTGACTGTC AACTGTACCTCTGAGTGGAC CG	(CA) <sub>27</sub>	AB037990
Poli 116 TUF	CAAATCTGGCAAATTTAGGAATAGTGG GATCCTGGTGATACAGGTGAACACG	(CA) <sub>15</sub>	AB037991
Poli 117 TUF	CAGTGATGAATGCACCCAGTCATAC TCTGTACCGAAGAAGTGAGGGTGTCT	(CA) <sub>10</sub>	AB037992
Poli 18-42 TUF	CAGATAACATGCAGGTCACATCTGG GATCTCTGGAGGAGGAGGACGAC	(GT) <sub>12</sub>	AB459373
Poli 121 TUF	ACTGCATGCATAACCAACAGTGTGT GGCTGAATTATTTGGAGCAGAAGGT	(CA) <sub>10</sub>	AB037993
Poli 180 TUF	TCTGCCTTTGTCTCTTTATCCAACG AGAAAGACTAGGAAAGTCAGGACCTGG	(GT) <sub>29</sub>	AB459451
Poli 16-76TUF	TATAAGGTGGGAGAGAGGAAGGTGG GCAGTGAGTGGACTTCAGGTGCTAT	(CA) <sub>29</sub>	AB459367

*Microsatélites diseñados en platija y seleccionados de Coimbra y col., 2001,2003; Castaño-Sánchez y col., 2010.*

**MICROSATÉLITES PROCEDENTES DE HALIBUT**

<b>Microsatélite</b>	<b>Primer directo y reverso (5'→3')</b>	<b>Motivo repetido</b>	<b>Nº acceso</b>
Hhi 3IMB	CGTGGAACCATCACAACCTTG GGGATCCGACCCATCTGT	(CA) <sub>48</sub>	EF569049
Hhi 25 IMB	GGAAACCCATAATAGGCCCA GCTTGATGGAGAGGACATGC	(CA) <sub>72</sub>	EF569067
Hhi71IMB	CCAGTGCCTGTGGATAGCAT CAAGCATCGTAGAATTCCTCC	(GT) <sub>50</sub>	EF569104

*Microsatélites diseñados en el halibut y seleccionados de Reid y col., 2007.*

## ANEXO VIII

## MICROSATÉLITES PROCEDENTES DE LIBRERÍAS GENÓMICAS

Microsatélite	Primer directo y reverso (5'→3')	Motivo repetido	T <sup>a</sup> (°C)/ CIMg(mM)
Mss 1	TGTCATTGAAGGGTGCCTAA AAACAACCTTTGCACGGTGA	(TG) <sub>16</sub> CC(TG) <sub>2</sub>	58/1
Mss 2*	CGGACGACTTGTGGACTC GGACAGGTCGACTTTCTCCA	(CCG) <sub>3</sub>	64/1
Mss 3	ATTCTGTCCCAATTCACCA AATTGTGGTCCGGGTTGTT	(CA) <sub>9</sub>	64/1
Mss 4*	AGCCGCGTTACACAAACT CCTCAGTCCATCAGCAGCTT	(GA) <sub>6</sub>	64/1
Mss 5	AACTCCCAGCAGCTCCTACA CTCCCCATGAGGTTCAATGT	(CA) <sub>16</sub> (CA) <sub>6</sub> imperfecto	59/1
Mss 6*	TCTGAGAGTCGAGTGGCATC TTTGATAGGACGCAGTGGTG	(TTA) <sub>4</sub> imperfecto	64/1
Mss 7	GAGATGAGGGCTGAGACAGG ACCTGTGGAGACAGGCGTAG	(CTAT) <sub>4</sub> (CTAT) <sub>9</sub> imperfecto	64/1
Mss 11	CATTAGGACGGGTCCATGTT TCATGTGGACTGGACCAGAA	(CT) <sub>6</sub> (CA) <sub>10</sub> imperfecto	58/1
Mss 13	CCAAGTGAATCAAACTCAGTGG CGTCCAGATGTCCCAATGTA	(AAT) <sub>5</sub> imperfecto	65/1
Mss 14	ACGTGAGAGGAAGTGGTGT CGCTCCAATGTCAGATTTT	(GA) <sub>17</sub> imperfecto	60/1
Mss 15*	ACGCAACCAAAAGAAAGTGC TCCGTTCAAAGAGACACGAA	(GA) <sub>3</sub> imperfecto	52/0.5
Mss 16*	CCAGCCAAAGGTTTTCTTGA CCACAGCTCCTGAAAATAATCC	(GA) <sub>3</sub> (CA) <sub>4</sub> imperfecto	52/1
Mss 20	GCCGCATTCTAACAGGTG CGGGTCTGTCAATCAAAGGT	(CA) <sub>15</sub> imperfecto	64/1
Mss 22	CGCCAGGTTGTTCAAACACT TTTGTCTCAGTCGTCCTCCAGA	(CCT) <sub>12</sub> (TGC) <sub>8</sub> imperfecto	60/1
Mss 23*	CAGGTAAGTGAGGGATTACATG CGTGGGACTAAAGCAACACA	(CT) <sub>7</sub> imperfecto	58/1
Mss 24	GGCTTCTGCTGCGTCTACTT CCCTGCTTTAGGGTGACAGA	(CA) <sub>16</sub> (TA) <sub>2</sub> imperfecto	63/0.5
Mss 25	GAGTGACTTCAACTTCGACCAA ACGGACACCAGGTTTGACTC	(TTA) <sub>7</sub> (TTG) <sub>5</sub> imperfecto	63/0.5
Mss 26*	CCTGCCATTACAATAGCATCG TGATGACGGAATCCATGAAA	(TTA) <sub>3</sub> imperfecto	63/0.5
Mss 27	CTCATCCTCCATTGCTCCTC ACTACCGTGGCGAGGTCAT	(CT) <sub>36</sub> imperfecto	63/0.5
Mss 28	TGCCCTGAACGATGACTGTA GAAATTTCTCAGTAACCAAGAGG	(GA) <sub>8</sub> (CA) <sub>13</sub> imperfecto	63/0.5
Mss 29	TGGGAATAATGACAATGCAAA TTCCCTCACAGCATCATGTC	(GA) <sub>22</sub> imperfecto	60/0.5
Mss 30	GAACATGACGGAATCATGACA TCCCTGCCTTAATGACAGATAA	(ATG) <sub>8</sub> imperfecto	63/1
Mss 31*	GGAAACAAGCCATGTGACCT AGGAGCAGCTGCATCAGG	(CT) <sub>18</sub> imperfecto	53/1
Mss 32	GGCACCAGCACTTTGATGTA GCCTGGGAATTATGACAACG	(AGG) <sub>7</sub> imperfecto	62/1
Mss 35	TTGATTTCCCTCTTCCTCA TCAGACTGTGAAAGGTTGAAGG	(GTT) <sub>18</sub> imperfecto	57/1
Mss 37	AAAGGCTGAATTAGCTTTGAACA	(GT) <sub>10</sub> imperfecto	61/1

	GCATGACTCTGCCGTGACT		
Mss 39*	TTTGAGGACCAAACAGAATGT AAACGAATTCGCCCTTCTCT	(TCAC) <sub>7</sub> (CA) <sub>18</sub> imperfecto	56/1
Mss 42	CCGAGTCCAGTTTATCACTGC TAGGCTGTCCACATGAATGG	(CA) <sub>30</sub>	63/1
Mss 43	AAATGGGCTTCGCTGCTTA TCGGAGGTGGGATTAACAAG	(GTT) <sub>7</sub> imperfecto	60/0.5
Mss 44	TTGGCATGATTGGCAGTT CAGTTGGGCAACCTATTATTGA	(CT) <sub>15</sub> imperfecto	62/0.5
Mss 45	TGCAATGGTAGTTATTTAACATTTA TCCTTGCTCCCTTATTGCAT	(TG) <sub>11</sub> imperfecto	48/0.5
Mss 46	TGCAGCTATGCAGATGTTGTT CTAGAGCCGCAGTTTCAG	(CA) <sub>40</sub> imperfecto	57/1
Mss 47	TTCTTGTCAATTACAGAGGCAT CAATGTTAATGCACTGAGAAAGTT	(CA) <sub>26</sub> imperfecto	60/1
Mss 49*	TTCTTGTCACTCCCTGAG TGCTGTTCCCTGTAAATTTCAA	(GA) <sub>8</sub> (CA) <sub>14</sub> imperfecto	55/1
Mss 50	GCTGGGTTTCGAGTTACAAGC GACTTGCTTATCCTTACATTCA	(GA) <sub>6</sub> (CA) <sub>20</sub> imperfecto	59/0.5
Mss 52	GCCTGGTATTTGGGTGAGTG GTGATGTTTCGGCATCTCCTT	(CA) <sub>11</sub> imperfecto	57/0.5
Mss 53	CCCTGGGCTACAGACAATC GCTCCAGGGCTGCTATTGT	(GTT) <sub>7</sub>	57/0.5
Mss 54	GACCCTCGTAAGTGGGAGAA AGATTCCGCTGCAGTCCTT	(AG) <sub>16</sub>	57/0.5
Mss 55	TTTCAGATGACGAAGCAAACA CAAGGTGAGCAAACATGGA	(CTT) <sub>11</sub>	57/0.5
Mss 56	GCTCAGCTGCATGTGCTTT TGGTCACTTCAGAACTCCACTC	(TG) <sub>11</sub> imperfecto	57/1
Mss 57	ATTTGCCAGGAACACGAATC AGGAGAACCTGAATCCACA	(GTTT) <sub>7</sub> imperfecto	57/1
Mss 58	TGTAGTGCTCCCATTTCTG GCGTCCCTTACTTCCTACCG	(GT) <sub>11</sub> imperfecto	59/1
Mss 59	ATTGTATTCTGGTTAGGTTTATAGCTG CAGCCGTGAATACACTCCTCA	(CT) <sub>6</sub> (GT) <sub>10</sub> imperfecto	59/1
Mss 61	CAGTGGAAACAATAACGTGTGG GGAGCGGTTATGAACTGACC	(GT) <sub>3</sub> (CAG) <sub>6</sub> imperfecto	63/0.5
Mss 62	ATTCATGCCGACGACCTACT CGGAGACCATGAGCTGAAAT	(CT) <sub>7</sub> (CA) <sub>8</sub> imperfecto	63/0.5
Mss 63	ACATTTCAATTTGCTGCTGCCACA GGGACATGTTGGCTGATTCT	(CTAT) <sub>20</sub> imperfecto	61/0.5
Mss 64	CCTCGTCACTTTCACAGG GAAACACCAGTGAGCAGCAA	(GAA) <sub>17</sub> imperfecto	61/0.5
Mss 65	TGGGATCAAATGAAGTCAGAAA TTGTGCAATATCACGAATGGA	(CAA) <sub>10</sub> imperfecto	57/0.5
Mss 66	ACTCTTTAACAAGTAAACCTGCATTA CATTTAACATGGATGAAACAGCA	(AGAT) <sub>12</sub> imperfecto	54/0.5
Mss 67	CGGGTTCTGGTCTCATGTTT TCGTCTTCTGCTTCGACAAA	(GA) <sub>12</sub>	63/0.5
Mss 70	TGGTTAAGGTCAGAGATGATGTTT GTCTGCAGAACAGCCAGCAG	(GT) <sub>10</sub> imperfecto	57/1
Mss 74	CAGCAGTCAGTGTCCGTGTT GTTTGGTGAAAGTGTACTTGGAG	(TGC) <sub>7</sub> imperfecto	60/1
Mss 75	CAGGTCAGCGTCTGTTTGGAG TGCAGTGGGGCTTCTCTTT	(CTAAT) <sub>5</sub> imperfecto	52/1
Mss 77	GGGTGTAAGATACAACCTCCACGA CCCTCGCCTTTACATAGCAA	(CA) <sub>7</sub> (CT) <sub>4</sub> imperfecto	57/1
Mss 78	CAGAATCGACGCCACTCTTT CTGGAGTCGGTTGGCATAGT	(CT) <sub>8</sub> imperfecto	57/1

Mss 79	GGTATCCAGGTGGAAGGTCA GTGCCTGAAAATGACAGTGA	(CA) <sub>13</sub> (GA) <sub>9</sub> imperfecto	57/1
Mss 80	GCTCGCTCTAAATGGCTTTC TCATTTGACAGAGTGAACCTGG	(GAA) <sub>10</sub>	58/1
Mss 81	GCTGGTCTATTTGGAGGGAAG CTCATTAGCGCATCACAGGA	(GTT) <sub>7</sub>	58/1
Mss 82	TGTAAATTGTGTCAAATGATGGAA CCCTCAGTTATCTGGGTCTCC	(CTT) <sub>13</sub> imperfecto	58/0.5
Mss 84	GCTGTCTGGAAGTGCCTCAT GACCTTGCTGAACATCTCC	(CGG) <sub>6</sub>	58/0.5
Mss 85	GGAGGGCATCCAACACTACT GGATCAGTCACATCCAAGGAG	(CA) <sub>12</sub>	54/0.5
Mss 86	AGTGAACAGCCTCGCTTCAT CAGTGCCAGCACTTTGTGAC	(CA) <sub>22</sub>	54/0.5
Mss 87	TAATAGCATGGGAACAAAGTGTG AAGGTGTCTGCAAGTTCAAGG	(CT) <sub>8</sub> (CA) <sub>8</sub> imperfecto	58/0.5
Mss 91	GAGTATTTTGAACCTGACCAAACCTC CCAACAGAACACGAAGCAAA	(CT) <sub>20</sub> (CA) <sub>11</sub> imperfecto	56/0.5
Mss 96	TGACTCCGAAGTGTGCTTTG CACTGAATCAAGGTGCATCG	(GA) <sub>10</sub>	52/0.5
Mss 99	GCAACCCAAGCAATCAGACT CATGCATAGCTGCATCACAG	(CT) <sub>20</sub> imperfecto	52/0.5
Mss 100	ATAACACCGAGGCACAAACC CGGTGCATGCACATTCTTTA	(GA) <sub>9</sub>	54/0.5
Mss 101	GCCGGACCAATTACCATA CGGCATGGTAACACACCTTC	(CT) <sub>19</sub> imperfecto	54/0.5
Mss 102	AAAGGGCTCATAAAGGAAATG CTACCGAGGACGAGGAGATG	(CAA) <sub>5</sub> imperfecto	55/0.5
Mss 103*	ATGATCCGGCTGTTTACGAC AATGGTGGCTCCAGAAAGC	(CA) <sub>12</sub>	53/0.5
Mss 105	TCAGACATGACCTGACTAAGATCC CGCTCTGACCTTGTCTATCAG	(GTT) <sub>7</sub> imperfecto	52/1
Mss 106	GCGGGAGAGCTGCTTGAGTTT TGCTTTGAAGAGCCAACACA	(CA) <sub>22</sub> (TA) <sub>3</sub>	51/1
Mss 108	TTGAACCCTGTTCTCGAGGT GACGCAACAAACCAAAGATG	(TG) <sub>19</sub>	58/1
Mss 110	TCTAATTCACCGTGCAAACCTG TGAAATAGAAGCAGCCGTGA	(GT) <sub>8</sub>	54/1
Mss 111	TCGACCTCTTATGGCTGACTG CGGTGAAAGCAGAGGGAAAG	(CA) <sub>11</sub>	60/1
Mss 116*	GAACAAATCCGGAACAGGAA ACGAGCGCACCCAAATAA	(GA) <sub>9</sub> imperfecto	55/1
Mss 117	TTCCGATATCAACTTCCCAA GATCAGCTCATTCACTCACAGG	(GA) <sub>18</sub>	57/1
Mss 119	CATCGCCAGGCTACTGACTGA GGTAGAGATGCTTTGGAAGTGG	(CT) <sub>4</sub> (CA) <sub>27</sub> imperfecto	57/1
Mss 120	CTCACTCAAACCTCTGCAACC TGAGTTAGGCAGAACTATGGTG	(GT) <sub>6</sub>	53/1
Mss 121	AGTGGCTCAGAAGAAACCACA CTTCCACGGAGAAGTCGGTA	(CAA) <sub>6</sub> imperfecto	53/1
Mss 123*	TTCCCTGGATCTGTTTGAGC CTATAAACACAGATGGCACAGC	(GA) <sub>7</sub> imperfecto	55/1
Mss 124*	AGCTTTGATTCTCACCTTTG CCCCTCCTCCCTAGAGTCC	(TC) <sub>7</sub> imperfecto	53/1
Mss 125	GCATAGTGCAGTCAGCATCG GATTAAGAAAGTAAGATGACGGTGA	(TG) <sub>4</sub> (CA) <sub>15</sub> imperfecto	54/1
Mss 126	TAGATCTGGACTAACT GCACATTCCCGAAACAGTA	(CTT) <sub>9</sub> imperfecto	48/1
Mss 127*	ACACGAGTCGGAACCATAACC	(TG) <sub>24</sub> (TC) <sub>5</sub> imperfecto	55/1

	AACAGTCCCGAAAGGGTCTT		
Mss 128	TGTAGTTTGGGAAGTTGTAAGATTG CAAACAAATGAATAAACATTCGAGA	(GTT) <sub>8</sub>	52/1
Mss 129	TTGGCAGACATGAACCAAAA CCCCAAAGCCACAGAGTCTA	(GT) <sub>15</sub>	57/0.5
Mss 130	CAGTGCATCATTATGGGGTTT AGAGGCACGCAATTCTCTGT	(GT) <sub>13</sub>	54/0.5
Mss 131	AAAAGTTCGCCGTAGGGTTT GAACGCTGACTTTTGCATCA	(TG) <sub>12</sub>	56/0.5
Mss 132*	AGATCTGGACTAACTA CTGAGGTCGGATTTCCAAAG	(CTT) <sub>8</sub>	50/0.5
Mss 133*	AAGCCTCTGAAGAGCATTGTG ATTTCTGCATCCTCTGCAC	(CT) <sub>5</sub>	55/0.5
Mss 134	ACCGGTGTGAAGAGCTCAAT TATGAAGGATGTCGGCACAA	(CTT) <sub>13</sub>	55/0.5
Mss 135*	GCTGAGAGACATGTATTCAAACG TAACAAGCAGCGTGTGCAG	(CAA) <sub>4</sub>	54/0.5
Mss 136	GTTGCACAATTTTGCCTTT GTTCTGGCTGGTCCTTACA	(GTT) <sub>8</sub>	52/0.5
Mss 137	TCATCCATTCAGTTTCCCATT GGCGTGTGTGTCTGTATGC	(CA) <sub>10</sub> i imperfecto	58/1
Mss 140	CCTGGGGTCAACTCTGACAT GGCTTTGGACTTTGGTCCTT	(GA) <sub>12</sub> imperfecto	56/1
Mss 141*	TCTGGACTACCTCTGAACTGAGC CACAGAGTTGGGAGGAGGAA	(GT) <sub>19</sub> imperfecto	56/1
Mss 143	AGCTCTGTAACCACGGCAAC GCCAGATATGTTTTATCTAAGCTTCT	(TGA) <sub>5</sub> imperfecto	56/1
Mss 144	GCTGCAGGAAACACACAGAA ACGGTGGCAATAATCCGTAG	(CT) <sub>25</sub> imperfecto	55/1
Mss 147*	AGATAGGAAGGACCGGAGCA GCAGCGTCACTTTCTCTA	(CTG) <sub>6</sub> (TCC) <sub>6</sub> imperfecto	57/1
Mss 148*	AAAAGGTGTGGTTGGGAATG ATCAGAGGCAGACCAAGCAG	(GTT) <sub>17</sub>	52/1
Mss 149	TCAGTGACTGCTTGGTCTGC CTCTCTCCTCGTCTTTCTTCC	(GA) <sub>11</sub> (GT) <sub>3</sub> (GA) <sub>8</sub> imper	55/1
Mss 150	GCACAGTCGCAGTTTATCCA GGATCCCTGTAACGCTGTGT	(CCT) <sub>3</sub> (CTT) <sub>10</sub> imperfecto	55/0.5
Mss 151	ATCAATCTGCCTCCAACCAG CTCTGCATCTATGCCCCACT	(CA) <sub>7</sub>	55/0.5
Mss 152	CAGTGAGGGTGTGACGATG CTGTCTGCCGTGCTAAATCA	(CCG) <sub>5</sub>	55/1
Mss 154	CAGCCACACTAAGCCACAGA TGCAAAGAGACGGTAAAAA	(GA) <sub>16</sub> (GAAA) <sub>7</sub> imperfecto	55/1
Mss 155	GCAAACACTGAGATGCGAAAA GGGATATTGGAGGGGAGGTA	(CA) <sub>12</sub>	55/0.5
Mss 156*	CACAGCATCCGCAGACTAAA AGGAAGAAAGCGTGAACGTG	(CT) <sub>4</sub> (GCA) <sub>4</sub> imperfecto	55/0.5
Mss 157	TTTGTTCAAACCGACTGTGC GGTGCGTTATCCTCTCCTCA	(GAA) <sub>3</sub> (TG) <sub>12</sub> (GA) <sub>7</sub> imp	55/0.5
Mss 158*	CAGCCGCACATAATTCAGC TAAATTCGGCTTCTGTGTC	(TG) <sub>4</sub>	55/1
Mss 159	ATTTGGCTTCGGGAAACTCT GCTTGAGGCTGCGATGTAGT	(CT) <sub>5</sub>	55/0.5
Mss 160*	ACATAGACCGGAAGCTCCAA CCAGAGCAACAATGCAACAC	(CGCT) <sub>2</sub> (GT) <sub>4</sub> imperfecto	55/0.5
Mss 162	AGTGACGCAGCGGTAATAGC ACGCACTGTGACCTCAACCT	(CCACT) <sub>4</sub>	55/0.5
Mss 163	TCTGGACTACCAGTGGCTCA CAGGGCTTTGCTCATGTTTT	(TTA) <sub>14</sub> imperfecto	59/0.5

Mss 164	TACGATTGAACAGCGATTGG GGATCTCGCAGAACTCGTC	(CA) <sub>4</sub>	48/0.5
Mss 165*	GTCCTGCAGGTTTGACGAAT CCCTGGTGTGGACAGTCTT	(CA) <sub>7</sub>	45/0.5
Mss 166*	CACACCCATTGTCCTTCT TACAAGGAGTGGGGTTGGAC	(CT) <sub>4</sub> (CA) <sub>8</sub> imperfecto	48/0.5
Mss 167	GCCAAAAGTGGTGGTGTGCAT GTGCAGTTCAATGGCACAGT	(CT) <sub>6</sub>	57/0.5

*Nomenclatura, secuencias de los cebadores, motivo de repetición, T<sup>a</sup> de amplificación y concentración de CIMg de los 118 microsatélites diseñados a partir de las genotecas enriquecidas de S. senegalensis. Con asterisco, los que resultaron monomórficos en el análisis de variabilidad.*

## ANEXO IX

### MICROSATÉLITES PROCEDENTES DE LA BASE DE DATOS DE ESTs

Microsatélite	Primer directo y reverso (5'→3')	Motivo repetido	T <sup>a</sup> (°C)/ CIMg(mM)
CSse1I17	AAGAATAGCTGCCCAAACC TGTTTTCAATTTAGTTGTATATGTGAGA	(TG) <sub>20</sub> (CG) <sub>8</sub>	55/1
CSse16C12	CATAATAATCGGGGGATTCT CCGACTCATGTTGCTTTGTT	(CA) <sub>41</sub> (CG) <sub>8</sub>	59/1
CSse2H15	ACCAAAGTAGCGCAGATTCC CTTCATCAGCAGCCAAACTG	(TG) <sub>23</sub>	59/1
CSse1N07	TGCACATCAGTGAGTTAATATT T TGTGATGGCGTGAAAAGTTC	(GT) <sub>9</sub> imperfecto	55/1
CSse3H07	CCCAATTACAATAGTGGCCTGT CCTTCAATGCTTCAGCTGTCT	(TG) <sub>15</sub> imperfecto	58/1.5
CSse2G14	ACCAAAGTAGCGCAGATTCC CGAGAGCTTAACACCACAGC	(TG) <sub>19</sub> imperfecto	59/1.5
CSse3A04	AAATACGAGGGTCGTCACAAA GGATTACAGCAAAGTGGAGTGA	(CGT) <sub>11</sub> (GT) <sub>26</sub> imperfecto	62/1.5
CSse6A20	TGGGAGAGGTAGAAGCATGG CTCAAGTGGACATGCCAAGA	(TAAA) <sub>5</sub> (CAAA) <sub>5</sub> imperfecto	60/1.5
CSse5N15	AACCTCCCAAAGGATCAAT GGATTTCGAACCTTCTTGCTG	(TA) <sub>5</sub> (CA) <sub>3</sub> imperfecto	62/1
Csse 22E12	GCTGGAAGCTGCACACG GACGAAAGCGTTTTGTCAG	(CCT) <sub>3</sub> (CTT) <sub>6</sub>	63/1
Csse 1P20	GAAAGGACGGCGTTGCAC CAAGAATGTATATTGGATGAAAGACA	(GT) <sub>23</sub> imperfecto	57/1
Csse 27G19	CACACTGTCAGGAACACTACAGAGG GGAGAAATGAAATTGGATTTTAA	(TA) <sub>16</sub> (CA) <sub>27</sub> imperfecto	56/1.5
Csse 7D10	CCTCTTTAAATATGATTCTTTACATG AGCATCAGTGACAATGTTGTTTC	(CT) <sub>12</sub> imperfecto	57/1
Csse 8D21*	GGACCTTAATGCTGGACCTT CAACATAATGCTGCCACTG	(TACA) <sub>4</sub>	62/1.5
Csse 2M07*	CATCTATCGAGCTGTT AGTCACCGCAGCCCC	(CTT) <sub>8</sub> (GT) <sub>3</sub> imperfecto	61/1
Csse 11G02*	CCTCGTGAAGAGGTCTTGA GAGGAAGAGCTCAAAACAAA	(TAAA) <sub>8</sub> imperfecto	61/1.5
Csse 21P06*	TGTCTGCAGATGAGCCAGAT GAGTGACGATGAGGGAGAGG	(CTT) <sub>13</sub> imperfecto	53/1

Est-2	CCAATGTTTTTGCTGTTTGG TGAAACAAGCTTGAGGCAAA	(CA) <sub>7</sub>	55/1
Est-4*	GGTGGGGATGTTGACATAGG AAAAGACGTGGGAGAAGCTG	(CA) <sub>6</sub> imperfecto	52/1
Est-5	ATGCCAATAAACCTGGCACT GAACCGATCCCAACTGTGTT	(TGGACA) <sub>7</sub>	55/1.5
Est-6*	AACCAGATAAAAGACCCATTGAGA TGCACTTATATTCAATATTTGTCTTG	(GCA) <sub>3</sub> (TAA) <sub>5</sub> imperfecto	55/1.5
Est-7	ATGTGACAACGGACTTGGTG TCCAGTGCAACCATTTCATGT	(CCG) <sub>7</sub>	57/1.5
Est-8	TCATGGTAAGCAAGGTGCAA ATATGCACCAGATGCTGGAC	(TG) <sub>14</sub> CG (TG) <sub>3</sub>	57/1.5
Est-9	GAAGTTGGGTGCGTTTTCTT CGGCACTGTCAACATCTAGG	(TG) <sub>6</sub>	57/1.5
Est-10	CGGAGTCAAACATTCCTCAAA GTGGTCGACGGAATCAAAC	(GGA) <sub>10</sub> imperfecto	55/1.5
Est-11	TCGAGTGGACAACACTACGC GGGTGAAACTTCCCCATTCT	(GT) <sub>9</sub> imperfecto	55/1
Est-12	AAGATAACCCCGTGTGTG GACCGTTAAAACCTCCACAT	(CA) <sub>11</sub> imperfecto	55/1
Est-13	ATCTGACCTTCCCCTCCATC TTTTCCAACCTGGTGCTTTTT	(GGA) <sub>8</sub>	55/1
Est-14	AAATAATACAGAAAGATGCCTCAA AGCAGCCTGAAGCAGGACTA	(CA) <sub>8</sub>	55/1
Est-15	TGCAAAAAGTTGAGGCTCATAA TCTGGACTGTTTTCACTTTG	(ACTC) <sub>8</sub>	55/1.5
Est-16	CAGAGGAACCGTCGACACTC TTGTGTTGCAGTTTCTGTCG	(TG) <sub>14</sub>	50/1.5
Est-17	CCAGAGGAACAGTCGACACTC CAGTTGTGTTGCAGCTTCTG	(GT) <sub>9</sub>	50/1.5
Est-18	AAACTCTGCCGTGTGATGTG TCCACTCGTGCAAGCTAAGA	(CA) <sub>10</sub>	55/1.5
Est-19*	TTGGGAGGGGGTTCACAG AGCTGCTCAAAGACGGAGAC	(GGA) <sub>11</sub>	58/1.5
Est-20*	TGATGAGGAATATCCATTAGGATG GAGGACGGATGCTGGTACAT	(GA) <sub>6</sub>	55/1.5
Est-21*	CAGCAGCATTACACCTCCAA TCTGGCTCAAGCCAAACATT	(CT) <sub>5</sub>	50/1.5
Est-22	CCCATCGTTGTGGTTCTTCT CTCCTGTATTCCCAGGTCCA	(TG) <sub>13</sub>	55/1.5
Est-23	CTCAGCCTCTCCTTCATTCC CAGTTTGCCTGACAACATAA	(CA) <sub>8</sub>	55/1.5
Est-26	TCCACTTGTCTTTATTGAACACATT AAATCAAAGCAGGGCATCAT	(CA) <sub>15</sub> imperfecto	55/1.5
Est-25*	CGAATGACGCCAAACTACAC CTCGCATCTAGACACGGAGA	(TTTA) <sub>4</sub>	55/1
Est-27	CGATGAAGTCGTCTGTGCTG CAGCGAACATGAAGGAGGAC	(GCT) <sub>7</sub>	53/1
Est-28	TTTAAAACATTTATTCCAGGCTGA GAAGAAGCTCTGCTTATGTTGGA	(CA) <sub>7</sub>	55/1
Est-29	TGCTTTGGCTCAAATCACAT TTCACCCATGCTTTATTATTGATG	(CAA) <sub>3</sub> (CAT) <sub>6</sub>	55/1
Est-30*	TTTCTGAGCTGCAAATAATACATTC TGTGCCCATCCACATGTTAG	(GA) <sub>11</sub> imperfecto	55/1
Est-31	ACGCCTCCAGAGTTAAACC CCCTCTGCTCACCTGAAAAC	(CAT) <sub>6</sub>	55/1
Est-32	TCTGAAAACCTGAGGTGACG TTTCTCCCGTGCTAAGATGG	(CA) <sub>15</sub>	55/1
Est-33	GCTTCAGCAAACAACAGCAA	(GAA) <sub>9</sub>	55/1

	TGCTTTTCATGTTTCAAACCTCC		
Est-34	ATCGGTCAAACGCAGAAGAG TGGACATATGGCACCCCTAAA	(CA) <sub>5</sub>	55/1
Est-35*	CATGCAGCAGTACTGATTATTCC GCTGAGACAAAATGGTGCAA	(CT) <sub>6</sub>	55/1.5
Est-36	GTGTTTAGAAAAACACAACTTATCAA CCTGTCAGTGTTTGTGTTGAAGG	(TA) <sub>8</sub>	55/1.5
Est-37	TGGTCGTTTTTCATTCCGATA AACAATGGCTAGCCTGAGATG	(TTA) <sub>8</sub>	55/1.5
Est-38	GCAGTTTTTATTGGTGTGTTT TTCTGAAATCAAAGCAAGGAA	(CA) <sub>5</sub> (TG) <sub>3</sub> imperfecto	55/1.5
Est-39	GGGAGAGTGCAGAACTCCAG TCCCCGCTATTGAGATGTTT	(AAT) <sub>7</sub>	53
Est-40	CAATGAGGATCCCTCTGGAA CTGCAGCTCTGCCAATG	(CAG) <sub>6</sub>	53/1.5
Est-42	CACCACAAACACGGCAAGT CCCAGATACATTGTTAATGAAATGA	(CAG) <sub>7</sub>	52/1.5
Est-43	CAAAAACAAAATCAACAGTGCAA TTCCGTCCATCTTTTCACCT	(GA) <sub>8</sub>	55/1.5
Est-45*	CGGCACGAGGAGTTTAAAAG TGTGGAGAAAAGGAGGGTTG	(GA) <sub>15</sub>	60/1
Est-46*	GGTACGTCGTCATCCTCCTC AGCGCCACCTATAGGAATGA	(GA) <sub>15</sub>	52/1
Est-47	TGGGAGAGGTCAGGAGTACG AGACTTCACACCGGGATCAG	(GT) <sub>11</sub>	55/1
Est-48	AGTCTCTGCCAGCCAAAT AGCTGTAGGCCCAACC	(GT) <sub>13</sub>	55/1
Est-50	CAAAGACGAGGACGATGTCA AAACCACCACAGGAAAGACG	(CGT) <sub>9</sub> imperfecto	55/1
Est-51*	TGGAAGAACTTGAGCGGTTT GATCGGCAGGGCAGTG	(CTT) <sub>4</sub>	48/1
Est-52*	TGTGGTCACGCTGTGTCCT GACTCAGTCCGTGATCTCTGC	(TG) <sub>6</sub>	55/1
Est-53*	TGAGATGTGAACGAGACAAAGG TGGACAGATGTGTCTCCACCT	(ATGA) <sub>4</sub>	55/1
Est-54	ACGCAAAGGATGATGGGTAG GTACGTCCACGGAGGAAGAG	(GT) <sub>7</sub>	55/1
Est-56*	GGAATTTAAAGAACAGAAAAGAGACA GATCGAGGGTACACCATT	(CTG) <sub>10</sub>	50/1
Est-57	TGGGCCTTAAAGGTTTCAGAG TGTCAGTGCCGTAGTCTTG	(CA) <sub>3</sub> (CG) <sub>4</sub> (CA) <sub>6</sub> imperfecto	55/1
Est-58*	GTACGGATCAGCACTGTGGA TGCATTCCCTGCATTTG	(GA) <sub>9</sub>	55/1
Est-59*	GAGTGCATGGAGGTGGAGAT GCCACGAAGTTTGGCTCTAC	(GTT) <sub>6</sub>	55/1
Est-60	AAGCAAACATTCATCCGTCA ATTGATTTACCCAACAGCGTCT	(GT) <sub>15</sub>	55/1
Est-61	ACGAAGGCTCTTCACAGCTC TCATATCAAACGGAGCAAAGG	(CAT) <sub>6</sub>	55/1
Est-62	CAGCTGCTGAAGTCCATGT GGCAAAGTCAACACTGAA	(CGT) <sub>6</sub> (CAT) <sub>21</sub> imperfecto	52/1
Est-63*	GGTTTTAATGGCGCTGAATG TCCTCAACCACCAGTTATGG	(CTG) <sub>7</sub> imperfecto	53/1.5
Est-64*	AGCTGAAAAGGCTGTTGGAA GTGGGAACAGTGGACCAATC	(CTG) <sub>7</sub> imperfecto	52/1.5
Est-65	AGGGTCAGGCTGCTTACTTG TCATTCTGTGCTTCTGTGCTG	(CA) <sub>34</sub> imperfecto	53/1.5
Est-66*	GCCAGGACTGATATCGCATT GTGTTGGTTGCCTCCTGTTT	(CA) <sub>11</sub> imperfecto	57/1.5

*Nomenclatura, secuencias de los cebadores, motivo de repetición, T<sup>a</sup> de amplificación y concentración de CIMg de los 76 microsatélites procedentes de la base de datos de ESTs de S. senegalensis. Con asterisco, los que resultaron monomórficos en el análisis de variabilidad.*

## ANEXO X

### MICROSATÉLITES DE OTROS PECES PLANOS

Rodaballo	T <sup>a</sup> (°C)/ CIMg (mM)	Platija	T <sup>a</sup> (°C)/ CIMg(mM)	Halibut	T <sup>a</sup> (°C)/ CIMg(mM)
Smax-02	61/1.5	Poli 163TUF	51/1.5	Hhi 25 IMB*	54/1
Sma-E44*	58/1.5	Poli 129TUF	57/1	-	-
Sma-E50	52/1	Poli 200TUF	53/1.5	-	-
Sma-E91*	58/1	Poli 107 TUF*	46/1	-	-
Sma-E118*	60/1.5	Poli 18-42 TUF*	60/1.5	-	-
Sma-E148*	58/1.5	Poli 16-76TUF	52/1.5	-	-
Sma-E220*	57/1	-	-	-	-
Sma-E273	54/1	-	-	-	-
Sma-E288*	50/1.5	-	-	-	-

*Temperatura y concentración de CIMg para la amplificación en lenguado de los microsatélites diseñados en rodaballo, platija y halibut y seleccionados de (Coughlan y col., 1996; Navajas-Perez 2012), (Coimbra y col., 2001,2003; Castaño-Sanchez y col., 2010) y (Reid y col., 2007) respectivamente. Con asterisco, los que resultaron ser monomórficos en el análisis de variabilidad.*

## ANEXO XI

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS MCROSATÉLITES  
POLIMÓRFICOS DISPONIBLES

Microsatélite	N	Rango (pb)	Nº alelos	Ho	He	P-value (HWE)	Frecuencia alelos nulos	PIC	Nº acceso
Mss1	28	188-216	11	0.7143	0.8481	0.0105	+ 0.0786	0.8150	HE601639
Mss3	26	171-192	7	0.3462	0.7157	0.0033	+ <b>0.3483</b>	0.6681	HE601641
Mss5	30	186-218	8	0.6667	0.6599	0.5825	-0.0003	0.6020	HE601643
Mss7	24	122-212	19	0.8333	0.9193	0.0447	+0.0417	0.8926	HE601645
Mss11	29	206-222	9	0.8276	0.8826	0.4124	+0.0232	0.8531	HE601646
Mss13	22	245-247	2	0.4545	0.4059	1.000	-0.0680	0.3180	HE610600
Mss14	31	183-207	11	0.6774	0.8646	0.0227	+ <b>0.1181</b>	0.8343	HE601648
Mss20	30	174-204	4	0.4333	0.5774	0.6137	+ <b>0.1143</b>	0.4875	HE601651
Mss22	23	165-174	4	0.5217	0.5729	0.8183	+0.0358	0.4631	HE601652
Mss24	19	156-182	8	0.7368	0.7425	0.6600	-0.0051	0.6887	HE601654
Mss25	31	156-181	7	0.6129	0.7435	0.1714	+0.0973	0.6974	HE601655
Mss27	24	160-196	8	0.4583	0.4282	0.3433	-0.0498	0.3987	HE601657
Mss28	29	239-267	9	0.6897	0.6400	0.8697	-0.0777	0.6096	HE601658
Mss29	20	201-219	9	0.6000	0.8654	0.0010	+ <b>0.1701</b>	0.8248	HE601659
Mss30	20	169-187	6	0.6500	0.6667	0.6780	+0.0002	0.5858	HE601660
Mss32	23	122-168	4	0.5217	0.5382	1.000	-0.0014	0.4277	HE601661
Mss35	24	129-191	11	0.7917	0.8014	0.7054	-0.0024	0.7639	HE601662
Mss37	24	172-192	5	0.4167	0.5895	0.1592	+ <b>0.1727</b>	0.4868	HE601663
Mss42	25	102-170	15	0.6800	0.6841	0.5716	-0.0011	0.6601	HE601665
Mss43	21	150-186	9	0.4762	0.7863	0.0015	+ <b>0.2439</b>	0.7353	HE610601
Mss44	29	226-248	10	0.7931	0.7834	0.4989	-0.0304	0.7518	HE601666
Mss45	35	150-408	17	0.8571	0.8393	0.6895	-0.0221	0.8109	HE601667
Mss46	25	224-298	17	0.8000	0.9298	0.2802	+0.0656	0.9046	HE601668
Mss47	26	120-295	17	0.7692	0.9027	0.2933	+0.0741	0.8753	HE601669
Mss50	24	133-158	6	0.5833	0.6011	0.1850	-0.0050	0.4986	HE601670
Mss52	23	122-164	8	0.6522	0.8029	0.0329	+0.0855	0.7538	HE610602
Mss53	18	145-149	2	0.1111	0.1079	1.000	-0.0194	0.0994	HE601640
Mss54	23	166-168	2	0.4783	0.5072	1.000	+0.0184	0.3731	HE601642
Mss55	19	109-119	4	0.3158	0.4054	0.2037	+ <b>0.1320</b>	0.4175	HE601644
Mss56	26	155-159	3	0.3462	0.6086	0.0806	+ <b>0.2657</b>	0.5263	HE610603
Mss57	38	218-232	3	0.1053	0.1021	1.000	-0.0176	0.0977	HE610604
Mss58	22	153-173	10	0.8636	0.8605	0.5996	-0.0174	0.8221	HE601648
Mss59	23	115-127	4	0.6087	0.6367	0.8183	+0.0038	0.5617	HE610605
Mss61	23	120-134	4	0.7391	0.6947	0.9868	-0.0397	0.6196	HE610606
Mss62	24	238-252	8	0.7083	0.7004	0.7930	-0.0134	0.6386	HE610607
Mss63	22	112-206	16	0.9545	0.9366	0.8979	-0.0202	0.9068	HE610608
Mss64	18	87-105	5	0.5000	0.4794	1.000	-0.0590	0.3542	HE601650
Mss65	38	137-140	2	0.0526	0.0519	1.000	-0.0055	0.0499	HE601671
Mss66	23	106-178	13	0.8696	0.8097	0.6901	-0.0615	0.7682	HE601672
Mss67	26	107-155	11	0.8846	0.8296	0.3894	-0.0441	0.7922	HE601673

Mss70	29	148-151	2	0.3103	0.3128	1.000	-0.0048	0.2601	HE610599
Mss74	18	157-170	5	0.1667	0.3063	0.0164	<b>+0.3298</b>	0.2871	HE610609
Mss75	25	106-126	5	0.4800	0.4629	0.8369	-0.0625	0.4242	HE610610
Mss77	22	194-296	7	0.8182	0.7315	0.8478	-0.0692	0.6682	HE610611
Mss78	23	160-162	2	0.2174	0.1981	1.000	-0.0516	0.1850	HE610612
Mss79	20	107-258	10	0.7500	0.8513	0.0442	+0.0512	0.8088	HE610613
Mss80	36	164-185	6	0.5000	0.4664	0.5861	-0.0471	0.4403	HE610614
Mss81	36	118-133	4	0.4828	0.5330	0.0037	+0.0735	0.4284	HE610615
Mss82	31	208-230	8	0.8387	0.7916	0.0946	-0.3700	0.7916	HE610616
Mss84	31	120-128	4	0.5806	0.5420	0.5714	-0.0634	0.5806	HE610617
Mss85	31	118-134	7	0.5484	0.7070	0.0727	<b>+0.1325</b>	0.6594	HE610618
Mss86	30	135-167	12	0.9000	0.8605	0.5979	-0.0342	0.8307	HE610619
Mss87	30	114-124	6	0.8000	0.7548	0.8091	-0.0342	0.7083	HE610620
Mss91	29	169-233	12	0.7241	0.7907	0.5290	0.0403	0.7504	HE610621
Mss96	31	137-165	11	0.7742	0.8858	0.2867	+0.0596	0.8583	HE610622
Mss99	30	152-168	6	0.7667	0.6429	0.0668	-0.1117	0.5666	HE610623
Mss100	31	141-147	3	0.3226	0.3622	0.6760	+0.0452	0.3034	HE610624
Mss101	26	244-256	6	0.4231	0.6968	0.0112	<b>+0.2492</b>	0.6357	HE610625
Mss102	31	96-99	2	0.3226	0.4442	0.2060	<b>+0.1507</b>	0.3415	HE610626
Mss105	30	129-152	7	0.6667	0.7158	0.6798	+0.0223	0.6566	HE610627
Mss106	23	128-130	2	0.0870	0.2937	0.0049	<b>+0.5333</b>	0.2461	HE610628
Mss108	31	93-128	12	0.8710	0.8964	0.6185	+0.0080	0.8705	HE610629
Mss110	31	124-130	4	0.4516	0.6023	0.1499	<b>+0.1375</b>	0.5116	HE610630
Mss111	29	189-209	11	0.7241	0.8167	0.0404	+0.0517	0.7849	HE610631
Mss117	31	179-201	9	0.7097	0.6922	0.8258	-0.0236	0.6345	HE610632
Mss119	31	144-186	9	0.7742	0.7382	0.8729	-0.0301	0.6952	HE610633
Mss120	30	157-163	2	0.6667	0.5062	0.1358	-0.1450	0.3739	HE610634
Mss121	27	106-112	3	0.2963	0.2655	1.0000	-0.0739	0.2407	HE610635
Mss125	30	80-98	6	0.7667	0.7808	0.3244	+0.0016	0.7308	HE610636
Mss126	27	186-189	2	0.2963	0.5087	0.0545	<b>+0.2552</b>	0.3747	HE610637
Mss128	30	142-158	6	0.7000	0.6379	0.8937	-0.0517	0.8937	HE610638
Mss129	31	137-171	12	0.8387	0.8355	0.2158	-0.0071	0.8021	HE610639
Mss130	29	157-198	9	0.7586	0.8421	0.3286	+0.0426	0.8058	HE610640
Mss131	30	111-135	11	0.8333	0.8350	0.7852	-0.0110	0.8010	HE610641
Mss134	31	181-217	9	0.9355	0.8213	0.8408	-0.0752	0.7841	HE610642
Mss136	30	141-206	11	0.7667	0.8119	0.2764	+0.0199	0.7771	HE610643
Mss137	31	111-121	5	0.8065	0.7382	0.6808	-0.0573	0.6832	HE610644
Mss140	29	218-232	7	0.3448	0.3418	0.5913	-0.0077	0.3261	HE610645
Mss143	30	167-303	5	0.6000	0.6282	0.8336	+0.0098	0.8336	HE610646
Mss144	31	170-208	9	0.7097	0.6579	0.8729	-0.0403	0.6145	HE610647
Mss149	29	164-170	3	0.1724	0.2194	0.3269	<b>+0.1070</b>	0.1988	HE610648
Mss150	25	159-265	8	0.9200	0.8229	0.2439	-0.0711	0.7804	HE610649
Mss151	25	227-231	3	0.4800	0.6441	0.9199	<b>+0.1075</b>	0.5587	HE610651
Mss152	25	139-145	2	0.1667	0.2096	0.3263	<b>+0.1058</b>	0.1849	HE610652
Mss154	26	189-217	11	1.0000	0.8763	0.0872	-0.0782	0.8438	HE610653
Mss155	27	173-185	5	0.5556	0.6219	0.6964	+0.0530	0.5353	HE610654
Mss157	27	196-216	9	0.6296	0.7666	0.0132	+0.0945	0.7216	HE610655
Mss159	25	178-180	2	0.4400	0.3502	0.2991	-0.1226	0.2843	HE610656
Mss162	25	203-208	2	0.6000	0.4286	0.0594	-0.1762	0.3318	HE610657

Mss163	22	99-120	6	0.6364	0.7622	0.0279	+0.0615	0.7038	HE610658
Mss164	28	181-189	2	0.4286	0.4442	1.0000	+0.0088	0.3411	HE610651
Mss167	20	237-241	3	0.5000	0.5282	0.1927	-0.0103	0.4604	HE610659
<b>EST</b>									
CSse1I17	26	83-125	13	0.8462	0.9087	0.0216	+0.0231	0.8812	HE600105
CSse16C12	23	74-258	14	0.3913	0.8831	0.0000	<b>+0.3811</b>	0.8513	HE600106
CSse2H15	24	103-157	12	0.7917	0.7624	0.7930	-0.0253	0.7274	HE600107
CSse1N07	19	125-133	3	0.1053	0.1991	0.0534	<b>+0.2879</b>	0.1853	HE600108
CSse3H07	27	88-107	8	0.7407	0.6778	0.8111	-0.0550	0.6372	HE600109
CSse2G14	20	79-132	11	0.8000	0.7423	0.3611	-0.0511	0.6991	HE600110
CSse3A04	26	161-199	15	0.9231	0.8401	0.9072	-0.0749	0.8112	HE600111
CSse6A20	25	82-94	4	0.4000	0.5853	0.0103	<b>+0.2073</b>	0.5243	HE600112
CSse5N15	25	175-192	5	0.5600	0.6702	0.9199	+0.0671	0.5993	HE603854
Csse 22E12	25	103-111	4	0.5200	0.6433	0.1101	<b>+0.1032</b>	0.5732	HE600113
Csse 1P20	24	110-133	11	0.9167	0.8794	0.9214	-0.0314	0.8462	HE600114
Csse27G19	25	138-173	10	0.9200	0.8237	0.7368	-0.0699	0.7882	HE600115
Csse 7D10	27	100-117	6	0.5556	0.6660	0.8318	+0.0534	0.6091	HE600116
EST-2	23	178-182	3	0.6087	0.5440	0.8312	-0.0681	0.4296	HE600122
EST-5	24	162-174	3	0.5830	0.5503	0.1621	-0.0689	0.4800	HE600077
EST-7	21	243-261	5	0.6190	0.5958	0.6437	-0.0213	0.5200	HE603841
EST-8	25	154-168	8	0.8400	0.7890	0.6645	-0.0410	0.7430	HE600073
EST-9	22	191-195	3	0.4545	0.4789	0.6692	-0.0005	0.4050	HE603842
EST-10	25	186-207	6	0.8000	0.7730	0.9808	-0.0319	0.717	HE600075
EST-11	25	149-153	3	0.6400	0.6360	0.4813	-0.0014	0.5520	HE600076
EST-12	25	182-196	6	0.7200	0.8070	0.0323	+0.0536	0.7610	HE600078
EST-13	25	144-159	6	0.9212	0.7771	0.2790	-0.1023	0.7260	HE600079
EST-14	25	146-152	4	0.4803	0.4532	0.2304	-0.0192	0.4053	HE600080
EST-15	25	208-216	3	0.4093	0.3821	0.7345	-0.0296	0.3375	HE600081
EST-16	25	90-118	11	0.6801	0.8846	0.0069	<b>+0.1210</b>	0.8532	HE600082
EST-17	25	93-121	12	0.7201	0.8732	0.0946	+0.0895	0.8412	HE600083
EST-18	25	195-207	8	0.6801	0.8302	0.0000	+0.0874	0.7932	HE600083
EST-22	23	142-162	6	0.7832	0.7612	0.3257	-0.0289	0.7086	HE600085
EST-23	22	124-134	6	0.7731	0.7562	0.7583	-0.0292	0.7034	HE600086
EST-26	25	152-158	4	0.7601	0.7012	0.4702	-0.0446	0.6321	HE600088
EST-28	21	175-193	4	0.5714	0.4692	0.8611	-0.1480	0.4252	HE603843
EST-29	25	138-158	7	0.7200	0.7624	0.0962	+0.0225	0.7087	HE603844
EST-31	25	184-190	3	0.2800	0.2550	1.0000	-0.0683	0.2356	HE603845
EST-32	25	227-247	11	0.9201	0.8602	0.1270	-0.0487	0.8273	HE600090
EST-33	25	142-157	6	1.0000	0.7443	0.0003	-0.1820	0.6911	HE600091
EST-34	25	204-226	2	0.2400	0.2155	1.0000	-0.0588	0.1889	HE603846
EST-36	20	98-102	3	0.4502	0.5503	0.1573	+0.0658	0.4770	HE600092
EST-37	24	194-197	2	0.4173	0.4543	1.0000	+0.0323	0.3462	HE600093
EST-38	25	121-123	2	0.4400	0.3502	0.2991	-0.1226	0.2843	HE603847
EST-39	25	119-219	7	0.5200	0.5167	0.8487	-0.0298	0.4772	HE603848
EST-40	25	231-237	3	0.1200	0.1167	1.0000	-0.0215	0.1109	HE603849
EST-42	22	657-678	8	0.5455	0.8245	0.0003	<b>+0.1921</b>	0.7781	HE603850
EST-43	25	172-182	5	0.3602	0.4105	0.0464	<b>+0.1146</b>	0.3773	HE600094
EST-47	24	461-497	11	0.9583	0.9143	0.0786	-0.0349	0.8863	HE600096
EST-48	25	156-178	5	0.7602	0.7246	0.3541	-0.0401	0.6621	HE600097

EST-50	25	153-156	2	0.2000	0.4972	0.0036	<b>+0.4179</b>	0.3692	HE600098
EST-54	25	242-244	2	0.4400	0.4580	1.0000	+0.0099	0.3481	HE603851
EST-57	23	196-202	4	0.2609	0.5295	0.0116	<b>+0.3429</b>	0.4229	HE603852
EST-60	25	134-148	7	0.8001	0.8192	0.5057	-0.0036	0.7761	HE600102
EST-61	25	86-95	3	0.4000	0.3886	1.0000	-0.0372	0.3326	HE603853
EST-62	20	205-217	5	0.7506	0.7812	0.9282	+0.0147	0.7241	HE600103
EST-65	25	181-309	15	0.4005	0.9172	0.0001	<b>+0.3867</b>	0.8902	HE600074
<b>RODABALLO</b>									
Smax-02	21	78-117	9	0.7727	0.8467	0.3704	+0.0383	0.8022	Z78101
Sma-E50	27	224-226	2	0.2222	0.2013	1.000	-0.0532	0.1780	FE944549
Sma-E273	30	632-648	9	0.8333	0.8237	0.2161	-0.0266	0.7899	HS031951
<b>PLATIJA</b>									
Poli163TUF	27	99-103	3	0.3333	0.2928	1.000	-0.0851	0.2621	AB459435
Poli 129TUF	24	65-77	4	0.8750	0.6534	0.1002	-0.1649	0.5753	AB459406
Poli 200TUF	27	66-93	8	0.7778	0.6841	0.1985	-0.0917	0.6140	AB086616
Poli16-76TUF	22	120-132	7	0.5455	0.5761	0.2902	+0.0113	0.5365	AB459367

*Características de la variabilidad que presentan los microsatélites en una población adulta diploide de Solea senegalensis. Para cada uno, se indica el número de individuos analizados por loci (N), el rango alélico en pares de bases (pb), el n° de alelos, heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), significación del test de ajuste al equilibrio Hardy-Weinberg (p-valueHWE), la frecuencia de alelos nulos, el valor PIC y su número de acceso. En negrita, los valores de la frecuencia de alelos nulos  $>0.1$ .*

## ANEXO XII

## ANOTACIÓN DE LAS SECUENCIAS ANÓNIMAS Y ESTs

Microsatélite	Anotación BLASTx	e-value	Número acceso
Mss32	<i>Danio rerio semaphorin 6E</i>	4e-13	TRE3W9A6
Mss44	<i>collagenase 3 [Danio rerio]</i>	5e-11	SPQ6NWC6-2
CSse2H15	<i>Salmo salar casein kinase II subunit alpha</i>	3e-42	NP001133529
CSse3H07	<i>Salmo salar interferon-related developmental regulator 2</i>	2e-36	TRC0HBB1
CSse2G14	<i>Salmo salar casein kinase II subunit alpha</i>	3e-42	TRB5X285
CSse3A04	<i>Tirosina fosfatasa Osmerus mordax, Danio rerio, Salmo salar, Tetraodon</i>	6e-70	ACO093201.1
Csse 22E12	<i>Cell death protein 4-like [Oreochromis niloticus]</i>	1e-4	AAH94294.1
Csse2M07	<i>Protein FAM193A, partial [Danio rerio]</i>	2e-9	TRQ4SFX9
EST-2	<i>Oreochromis niloticus creatine kinase M-type-like</i>	3e-132	XP003449849
EST-5	<i>complement C1q-like protein 2-like Danio rerio</i>	2e-04	XP002660918.2
EST-7	<i>Solea senegalensis type II keratin</i>	0	BAH56637.1
EST-8	<i>Salmo salar tropomyosin-1 alpha chain</i>	2e-15	ACI34179.1
EST-9	<i>Oreochromis niloticus hymosin beta-4-like</i>	1e-16	XP003458139
EST-10	<i>Osmerus mordax creatine kinase, testis isozyme</i>	5e-34	ACO08899.1
EST-11	<i>Esox lucius trafficking protein particle complex subunit 2-like</i>	9e-82	ACO13683.1
EST-13	<i>Pennahia argentata myosin light chain 1</i>	8e-84	BAA95129.1
EST-14	<i>Lateolabrax japonicus fructose-1,6-bisphosphatase</i>	0.0	JN897396.1
EST-15	<i>Danio rerio cornifelin homolog</i>	8e-18	NP001004663
EST-16	<i>Scophthalmus maximus 40S ribosomal protein S27</i>	3e-48	ABJ98653.1
EST-22	<i>Danio rerio proton-cuopled amino acid transporter 1</i>	5 e-7	XP687732.4
EST-23	<i>Danio rerio cleavage and specific factor 6</i>	1e-5	TR:Q1L8Q2
EST-26	<i>Epinephelus coioides 14 kDa apolipoprotein</i>	5e-46	ACM41842.1
EST-31	<i>Hippoglossus hippoglossus alpha actin</i>	5e-60	ABU98961.1
EST-32	<i>Epinephelus coioides malate dehydrogenase 1b</i>	1e-89	ACL98112.1
EST-33	<i>Cyprinus carpio S31 protein</i>	8e-42	CAA76640.1
EST-47	<i>myosin-Ic [Danio rerio]</i>	5e-17	XP003448261
EST-50	<i>Osmerus mordax PHS1</i>	2e-97	ACO09320.1
EST-60	<i>Oreochromis niloticus trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial-like</i>	1e-30	XM003442897.1
EST-62	<i>Solea senegalensis calsequestrin 2</i>	1e-107	BAG49513.1

Resultados de la anotación encontrada con proteínas de las secuencias de lenguado. Se indica el valor de e-value ( $< 10^{-3}$ ) para cada una y el número de acceso de la secuencia homóloga.

## ANEXO XIII

## RELACIÓN DEL N° DE REPETICIONES, ZONA DE LOCALIZACIÓN Y TERMINOS “GO” DE LOS MICROSATÉLITES

Micro-satélite	Motivo repetido	Localización	Término GO		
			Proceso biológico	Función molecular	Componente celular
2H15	Di-	5'-UTR	Fosforilación	Transporte membrana	
3H07	Di-	5'-UTR		Transporte membrana	
2G14	Di-	5'-UTR	Fosforilación	Transporte membrana	
3A04	Di-	5'-UTR	Biosíntesis lípidos	Actividad Ligasa	Membrana, R.E
22E12	Di-	5'-UTR		Transporte membrana	
2M07	Tri-	3'-UTR	-	-	-
EST-5	Hexa-	Zona traducida	-	-	-
EST-8	Di-	5'-UTR	-	-	-
EST-10	Tri-	5'-UTR	Fosforilación	Transporte membrana	
EST-11	Di-	5'-UTR	Traducción	Estructura ribosomas	Ribonucleo-proteína Intracelular ribosómica
EST-13	Tri-	5'-UTR		Calcio binding	
EST-14	Di-	5'-UTR	-	-	-
EST-15	Tetra-	5'-UTR	-	-	-
EST-16	Di-	3'-UTR	Traducción	Estructura ribosomas	Ribonucleo-proteína Intracelular ribosómica
EST-22	Di-	5'-UTR	Transporte	-	Membrana
EST-23	Di-	3'-UTR	Transporte	-	Membrana
EST-26	Di-	5'-UTR	-	-	-
EST-32	Di-	5'-UTR	oxidación reducción	Actividad oxido reductasa	-
EST-33	Tri-	3'-UTR	Transporte	-	R.E(Golgi) y membrana
EST-47	Di-	5'-UTR	-	ATP, nucleótidos cubierta,	Citoplasma, membrana
EST-50	Tri-	5'-UTR	Biosíntesis lípidos	Ligasa	R.E. y membrana
EST-60	Di-	5'-UTR	oxidación-reducción,	Actividad oxidoreductasa,	Mitocondrias, nucleolos
EST-62	Tri-	5'-UTR	-	Calcio binding	-
EST-2	Di-	5'-UTR	-	-	-
EST-7	Tri-	5'-UTR	-	-	-
EST-9	Di-	5'-UTR	cytoskeletoorganizatic	actin binding	Citoplasma
EST-31	Tri-	5'-UTR	-	ATP binding	Citoplasma
M-32	Tri-	Zona traducida	Oxidación reducción	Oxido reductasa catalítica	Mitocondrias, nucleolos
M-44	Di-	5'-UTR	Regulación transcripci.	Ácidos nucleicos, ion zinc binding	Núcleo

*Relación entre el número de repeticiones, zona de localización –Zonas UTRs y términos GO de algunos microsátélites anónimos y ESTs de lenguaje.*

## **IX. ABREVIATURAS**

---

---

<b>ADNc:</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
<b>AFLPs:</b>	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados
<b>ARNm:</b>	Ácido Ribonucleico Mensajero
<b>CIESM:</b>	Comisión Internacional para la Exploración Científica del mar Mediterráneo
<b>cM:</b>	Unidad de mapa o Centimorgan
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ESTs:</b>	Etiqueta de Secuencias Expresdas
<b>FAM-6:</b>	Fluorocromo azul
<b>FAN:</b>	Frecuencia de alelos nulos
<b>GO:</b>	Gene Ontology
<b>He:</b>	Heterocigosis esperada
<b>HEX:</b>	Fluorocromo amarillo
<b>Ho:</b>	Heterocigosis observada
<b>HWE:</b>	Equilibrio Hardy-Weinberg
<b><i>i:</i></b>	Interferencia
<b>IFAPA:</b>	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
<b>LG:</b>	Grupos de ligamiento
<b>LOD:</b>	Logaritmo de <i>odds</i>
<b>MAS:</b>	Selección Asistida por Marcadores
<b>mM:</b>	Milimolar ( $10^{-3}$ molar)
<b>Mpb:</b>	Megabases
<b>NED:</b>	Fluorocromo rojo
<b><i>P:</i></b>	Nivel de significación observado en el test
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>PIC:</b>	Indicador de polimorfismo
<b>QTLs:</b>	Loci de caracteres cuantitativos
<b><i>r:</i></b>	Frecuencia de recombinación
<b>RAPDs:</b>	Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar
<b>RFLPs:</b>	Polimorfismos de longitud de Fragmentos de Restricción
<b>SNPs:</b>	Polimorfismos de Nucleótidos Simples
<b>SSRs:</b>	Repeticiones de Secuencias Simples
<b>TBE:</b>	Disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA
<b>VIC:</b>	Fluorocromo verde
<b><i>y:</i></b>	Proporción de heterocigotos