

## RESUMEN DE TESIS DOCTORAL

### **Análisis genético poblacional y caracterización de regiones génicas nucleares y mitogenomas en cuatro especies europeas del género *Donax***

**Jenyfer Fernández Pérez**

Directora:

Dra. Josefina Méndez Felpeto

Defendida el 21 de septiembre de 2018 en la Universidade da Coruña (UDC)

Realizada en la Facultade de Ciencias y Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidade da Coruña (España), y en el Centro Interdisciplinar de Investigaçãõ Marinha e Ambiental (CIIMAR) de la Universidade do Porto (Portugal).

Mención internacional y *cum laude*

### **Resumen**

En el campo de la acuicultura marina, los moluscos bivalvos constituyen uno de los grupos más importantes, tanto desde un punto de vista productivo como económico. En la Península Ibérica su importancia económica y social es evidente al emplear de forma directa a miles de personas. Sin embargo, la FAO estima que hasta 2030 habrá un estancamiento en la extracción de los bancos marinos mundiales (FAO, 2002). Por este motivo, los estudios encaminados a mejorar el manejo, conservación y explotación de estos recursos naturales, junto con el desarrollo y optimización de prácticas de acuicultura para nuevas especies, o especies ya explotadas, son extraordinariamente beneficiosos. Estos estudios pasan necesariamente por incrementar el conocimiento que se tiene de la biología de las especies y, en este sentido, el estudio de la diversidad y diferenciación genética juega un papel clave para lograr una gestión adecuada. No obstante, y a pesar de su gran interés comercial, los estudios genéticos en muchas especies de bivalvos son escasos, como es el caso de la coquina.

En Europa, se han identificado diferentes especies de coquina pertenecientes al género *Donax*, y algunas de ellas son explotadas comercialmente en varios países como España, Francia, Italia, Portugal y Turquía. En la Península Ibérica, la especie *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) presenta un elevado índice de cotización en lonja, llegando a generar ingresos más altos que otras especies consideradas como principales. Atendiendo a las estadísticas de la Plataforma Tecnológica de la Pesca de la Xunta de Galicia (Consellería do Mar, Xunta de Galicia), en el año 2018 fue el bivalvo que alcanzó un mayor precio medio (43,02 €/kg), muy superior al cotizado en otras regiones de España y del sur de Portugal. No obstante, los bancos de la costa gallega están en regresión, debido a un posible agotamiento de este recurso marisquero. Esto se pone de manifiesto en el escaso número de lonjas que comercializan esta especie que, en la actualidad, son únicamente las lonjas de Cedeira (A Coruña) y Arousa (Pontevedra). Esta situación conlleva a que exista gran interés en la realización de estudios que permitan su recuperación y, en el

futuro, la gestión sostenible de este bivalvo. Sin embargo, es conocido que las técnicas de repoblación pueden tener efectos deletéreos en la composición genética de las poblaciones naturales, como la pérdida de adaptación a condiciones locales o la pérdida de variabilidad. En consecuencia, para desarrollar una acuicultura sostenible y programas de repoblación adecuados, debe evaluarse tanto la estructura como la variación genética de los bancos naturales. Asimismo, es necesario conocer las diferentes especies de un mismo género que coexisten en la misma región geográfica. Entre las diferentes especies de coquina pertenecientes al género *Donax*, cinco de ellas se encuentran a lo largo del litoral europeo: *D. trunculus*, *D. semistriatus*, *D. variegatus*, *D. venustus*, y *D. vittatus*. Este hecho plantea la necesidad de realizar un estudio exhaustivo de su presencia en el resto de los bancos naturales de las costas de nuestra península y desarrollar estudios genéticos similares a los realizados para *D. trunculus*. Los estudios genéticos realizados en este trabajo, contribuirán a mejorar los programas de gestión y conservación de especies del género *Donax* en esta región.

El objetivo global de esta tesis ha sido conocer los genomas de estos bivalvos para que, posteriormente, se pueda aplicar el conocimiento de sus características genéticas a programas de explotación adecuados. Los datos obtenidos en este trabajo han permitido caracterizar diferentes regiones mitocondriales y nucleares de las cuatro especies de coquina presentes en Europa, identificar marcadores moleculares que permiten diferenciarlas, y evaluar la variabilidad genética y diferenciación poblacional para el apoyo de estrategias de conservación de los bancos naturales.

En primer lugar, se estudió la variación genética de los marcadores mitocondriales 16S y Cytb en individuos *D. trunculus* procedentes de 18 localidades de la Península Ibérica (prestando especial atención al área noroccidental donde las poblaciones naturales han disminuido drásticamente) para comprobar si los patrones de diversidad genética, estructura poblacional e inferencia demográfica deducidos previamente con microsatélites (Marie *et al.*, 2016; Nantón *et al.*, 2017) eran compatibles con los inferidos por estos nuevos marcadores. Además, dado que *D. trunculus* muestra herencia doblemente uniparental (DUI) (Theologidis *et al.*, 2008), se analizaron ambos tipos de ADNmt (F y M). Los resultados mostraron un alto nivel de diversidad genética y estructura genética significativa a lo largo de la Península Ibérica, revelando tres grupos genéticamente divergentes (Océano Atlántico, Mar de Alborán y Mar Mediterráneo). Esta diferenciación debe tenerse en cuenta en las estrategias de repoblación para evitar poner en riesgo la diversidad genética de la especie. En esta parte de la tesis se proponen también varias estrategias para la conservación y manejo de este bivalvo con alta importancia ecológica y comercial.

En segundo lugar, se analizó la diversidad genética y la estructura poblacional de *D. vittatus* a lo largo de toda la costa atlántica de la Península Ibérica. Para ello, se utilizaron cuatro genes mitocondriales (COI, Cytb, 16S F y M) y tres nucleares (H3, 18S y 28S). Estos mismos marcadores moleculares se secuenciaron en *D. semistriatus* y *D. variegatus* para abordar las relaciones filogenéticas de las especies del género *Donax* comunes a lo largo de las costas europeas. Los resultados mostraron una expansión poblacional reciente en las localidades de *D. vittatus* analizadas y los análisis de diferenciación poblacional, realizados con el marcador mitocondrial COI, indicaron ausencia de estructura genética significativa. Sugerimos que *D. vittatus* podría ser un recurso alternativo potencialmente explotable como complemento de *D. trunculus*, cuyas reservas naturales han disminuido drásticamente en algunas áreas. Además, se presentó, por primera vez, la evidencia de DUI en las especies *D. vittatus* y *D. semistriatus*.

Por otra parte, se desarrollaron 15 *loci* microsatélite para *D. vittatus* mediante *Next Generation Sequencing*, con el fin de revelar su estructura poblacional con un mayor número de marcadores y dilucidar las unidades de manejo apropiadas a lo largo de la costa atlántica de la Península Ibérica. Todos los *loci* resultaron polimórficos y las localidades mostraron valores similares de riqueza alélica y de heterocigosidad observada y esperada. Además, se detectó un déficit significativo de heterocigotos para todas las localidades, siendo los alelos nulos el factor más probable a contribuir en estos déficits. En cuanto a los análisis de diferenciación poblacional, indicaron ausencia de estructura genética en la región estudiada, confirmando los resultados basados en el gen COI. Estos datos son útiles para ayudar al desarrollo de la pesquería y los planes de conservación de esta especie. Además, los nuevos marcadores microsatélite desarrollados permitirán llevar a cabo otros estudios genético-poblacionales a lo largo de la distribución geográfica de la especie, así como análisis genéticos necesarios para las actividades de acuicultura.

También se analizaron las unidades de repetición completas del ADN<sub>r</sub> 5S y del espaciador transcrito interno (ITS) en las cuatro especies del género *Donax* presentes en Europa (*D. semistriatus*, *D. trunculus*, *D. variegatus* y *D. vittatus*). Tras amplificar, clonar y secuenciar varias unidades 5S e ITS, se describieron sus características básicas y su variación genética. Éste no sólo resultó ser un trabajo de investigación básica, donde se aportaron nuevos datos y conocimientos acerca de las especies *Donax*, de las que no hay mucha información genética, sino que también ofreció una aplicación viable en acuicultura. Pues a partir de estos resultados, se desarrolló una PCR *multiplex* para identificar estas cuatro especies de coquina. Los perfiles electroforéticos especie-específicos permitieron su identificación de una manera rápida, simple, eficiente y de bajo coste, ofreciendo una aplicación factible tanto en laboratorios no especializados, como en laboratorios de inspección alimentaria, particularmente cuando se analiza un elevado número de muestras.

Finalmente, se secuenciaron y caracterizaron los genomas mitocondriales completos de las cuatro especies, siendo los primeros representantes de la familia Donacidae analizados al respecto. Los cuatro mitogenomas varían en tamaño, desde 17.044 pb (*D. semistriatus*) hasta 17.365 pb (*D. trunculus*), y en contenido A+T, desde 58,9% (*D. trunculus*) a 63,5% (*D. vittatus*). Las diferencias de longitud se deben principalmente a la variación de tamaño de la región no codificante más larga (NCR), la cual se identificó en cada una de las cuatro especies *Donax* entre los genes *cob* y *cox2*, y que posiblemente se trate de la Región de Control. Además, se encontró el gen *atp8* en ocho especies del orden Veneroida, mejorando los estudios previos en los que se indicaba su ausencia. Con este trabajo, no sólo se ha incrementado el número de secuencias de mitogenomas dentro del orden Veneroida, sino que también se han ilustrado las relaciones filogenéticas entre las especies *Donax* y su posición dentro de este orden. Los resultados demuestran que la secuenciación de los mitogenomas completos proporciona información muy valiosa para el análisis filogenético en bivalvos. Asimismo, se proporciona información básica y de gran interés para la comunidad científica que puede utilizarse para su aplicación en acuicultura. De hecho, las secuencias de ADN<sub>mt</sub> aportadas añaden marcadores genéticos significativamente útiles para i) ayudar a diferenciar estas especies comerciales, ii) detectar y evitar el fraude, iii) proteger los derechos del consumidor y lograr otros objetivos de calidad, como el certificado de origen, y iv) utilizar en estudios de genética de poblaciones para la gestión sostenible de estas especies.

*Palabras clave:* autenticación de especies, coquina, género *Donax*, marcadores moleculares, recursos pesqueros.

---

## Publicaciones de la Tesis

---

Enlace al documento completo: <http://hdl.handle.net/2183/21065>

- Fernández-Pérez, J., Nantón, A., Arias-Pérez, A., Insua, A., Méndez, J. (2018). Fifteen novel microsatellite loci, developed using next-generation sequencing, reveal the lack of genetic structure in *Donax vittatus* from Iberian Peninsula. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 217(1): 218-225. DOI:10.1016/j.ecss.2018.11.011
- Fernández-Pérez, J., Nantón, A., Méndez, J. (2018). Sequence characterization of the 5S ribosomal DNA and the internal transcribed spacer (ITS) region in four European *Donax* species (Bivalvia: Donacidae). *BMC Genetics*, 19(1): 97. DOI: 10.1186/s12863-018-0684-x
- Fernández-Pérez, J., Nantón, A., Méndez, J. (2018). An alternative method for rapid and specific authentication of four European *Donax* species, including *D. trunculus*, a commercially-important bivalve. *European Food Research and Technology*, 244(10): 1815-1820. DOI: 10.1007/s00217-018-3093-5
- Fernández-Pérez, J., Nantón, A., Arias-Pérez, A., Martínez-Patiño, D., Méndez, J. (2018). Mitochondrial DNA analyses of *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia) population structure in the Iberian Peninsula, a bivalve with high commercial importance. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(5): 1139-1152. DOI: 10.1002/aqc.2929
- Fernández-Pérez, J., Nantón, A., Ruiz-Ruano, F. J., Camacho, J. P. M., Méndez, J. (2017). First complete female mitochondrial genome in four bivalve species genus *Donax* and their relationship within the Veneroida order. *PLoS ONE*, 12(9): e0184464. DOI: 10.1371/journal.pone.0184464
- Fernández-Pérez, J., Froufe, E., Nantón, A., Gaspar, M. B., Méndez, J. (2017). Genetic diversity and population genetic analysis of *Donax vittatus* (Mollusca: Bivalvia) and phylogeny of the genus with mitochondrial and nuclear markers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 197: 126-135. DOI: 10.1016/j.ecss.2017.08.032

---

## Bibliografía citada

---

1. Consellería do Mar, Xunta de Galicia (2019). En: Pesca de Galicia - Plataforma tecnológica da pesca. <http://www.pescadegalicia.gal/estadisticas/> Última fecha de acceso 16-06-2019.
2. FAO (2002). Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2002, Roma. En: <http://www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300s00.htm>.
3. Marie, A. D., Lejeusne, C., Karapatsiou, E., Cuesta, J. A., Drake, P., Macpherson, E., Bernatchez, L., Rico, C. (2016). Implications for management and conservation of the population genetic structure of the wedge clam *Donax trunculus* across two biogeographic boundaries. *Scientific Reports*, 6: 39152.
4. Nantón, A., Arias-Pérez, A., Freire, R., Fernández-Pérez, J., Nóvoa, S., Méndez, J. (2017). Microsatellite variation in *Donax trunculus* from the Iberian Peninsula, with particular attention to Galician estuaries (NW Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 197: 27-34.
5. Theologidis, I., Fodelianakis, S., Gaspar, M. B., Zouros, E. (2008). Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution*, 62: 959-70.