

Extracción de DNA para análisis de paternidad en la centolla *Maja brachydactyla* Balss, 1922



Elba Rodríguez Pena

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biología



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Área de Genética

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, VEGETAL Y ECOLOGÍA

Área de Zoología

EXTRACCIÓN DE DNA PARA ANÁLISIS DE PATERNIDAD EN LA CENTOLLA
MAJA BRACHYDACTYLA BALSS, 1922

Elba Rodríguez Pena

2013



TRABAJO FIN DE GRADO

Dña. Ana M González Tizón y D. Luis Fernández Rodríguez autorizan la presentación del trabajo de fin de grado **“Extracción de DNA para análisis de paternidad en la centolla *Maja brachydactyla* Balss, 1922”** presentado por **Elba Rodríguez Pena** para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 14 Junio de 2013

Fdo.: Ana M. González Tizón

Luis Rodríguez Fernández

Contenidos

INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Toma de muestras.....	9
Extracción del DNA.....	9
Comprobación de la calidad del DNA.....	10
Análisis estadístico de los datos	11
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN.....	15
Establecimiento del método de extracción óptimo	15
Problemática de las muestras	15
Determinación del estado de desarrollo del huevo y del método de conservación de la puesta óptimos para la extracción de DNA.....	16
Problemas en la PCR y en la secuenciación.....	16
Conclusiones	17
AGRADECIMIENTOS.....	18
REFERENCIAS.....	19
APÉNDICE 1	21
APÉNDICE 2	22
APÉNDICE 3	23

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha producido en diferentes localizaciones de la geografía mundial un disminución del tamaño de las poblaciones de algunas especies marinas de interés comercial a pesar del intento de asegurar su sostenibilidad mediante el desarrollo de estudios de su biología, en particular estudios sobre la dinámica poblacional y la distribución espacial de los stocks explotables, y de la implementación de medidas de gestión de la pesca.

En Galicia, diferentes especies de interés pesquero y marisquero están sometidas a intensos niveles de explotación, en particular en el caso de los crustáceos. Dentro de este grupo, la centolla, *Maja brachydactyla* Balss, 1922, está sometida a una explotación pesquera considerable (Sotelo *et al.* 2008, Verísimo *et al.* 2011) por su alto valor económico, y por este motivo se han realizado numerosos estudios sobre diferentes aspectos de su biología de especial interés para la regulación de su pesquería. Se trata de un crustáceo decápodo marino de la familia Majidae (cangrejos araña), muy común en la costa atlántica europea de la que se ha obtenido gran cantidad de información biológica en diferentes localizaciones geográficas, tanto de Galicia, como a nivel nacional y europeo, y tanto en el Mar Mediterráneo como en el Océano Atlántico.

Maja brachydactyla se clasificaba inicialmente dentro de la especie *Maja squinado* (Herbst, 1788), pero en los últimos años se han identificado diferencias morfológicas entre las poblaciones del Atlántico y del Mediterráneo (Newman, 1998), y también a nivel molecular (Sotelo *et al.*, 2008). Por tanto, actualmente se considera que su distribución se circunscribe al Atlántico Noreste, desde las Islas Británicas a Senegal, incluyendo las Azores, Madeira, las Islas Canarias y Cabo Verde. Vive sobre fondos rocosos-arenosos, desde el submareal hasta profundidades de 50-100m (Corgos, 2004).

Los crustáceos decápodos en general, presentan ciclos vitales complejos, que comprenden en general fases larvarias planctónicas y fases postlarvarias bentónicas, lo que determina que su distribución y su dinámica de poblaciones estén estrechamente relacionadas tanto con procesos de dispersión larvaria, mediados por factores físicos, como de selección de hábitat, ligados a los movimientos y migraciones en estadios postlarvarios (Pardieck *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2001).

El ciclo vital de *M. Brachydactyla* consta de tres fases principales: fase larvaria, fase juvenil o de crecimiento y fase adulta o reproductiva. La fase larvaria planctónica dura unas 2 o 3 semanas y consiste en 2 estados zoea y un estado megalopa (Iglesias *et al.*, 2002). La fase juvenil empieza tras el asentamiento bentónico del primer estadio postlarvario, que tiene lugar desde finales de primavera hasta el otoño. Los juveniles habitan fondos someros (<15m) tanto rocosos como arenosos y realizan movimientos limitados (Bernárdez *et al.*, 2005; Hines *et al.*, 1995). Esta fase dura de 2 a 3 años (Le Foll, 1993). La fase adulta empieza cuando los juveniles alcanzan la madurez sexual tras la muda terminal, que tiene lugar en primavera y verano (Sampedro *et al.*, 2003). En esta muda se producen cambios en la morfología y tamaño de los quelípedos en machos y del abdomen en las hembras (Sampedro *et al.*, 1999). Los adultos pueden vivir de 2 a 3 años (Corgos, 2004).

La fecundación es interna, mediante cópula. Tanto machos como hembras se aparean con el caparazón duro (nunca se han observado apareamientos inmediatamente tras la muda). Las hembras con puesta pueden aparearse y no se produce cortejo previo a la cópula ni guarda pre- ni post-copulatoria (González-Gurriarán *et al.*, 1998). Las puestas se producen sobre todo de enero a noviembre, y la incubación dura entre 30 y 74 días dependiendo de la temperatura del agua (Brosnan, 1981; González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998; 2000; Iglesias *et al.*, 2002).

Según el estado de desarrollo embrionario en el que se encuentren los huevos, pueden clasificarse en 3 estados diferentes (González-Gurriarán *et al.*, 1993, 1998; Corgos, 2004) (Ver Figura 1):

- **Estado A** (0-40 días): huevos de coloración naranja recién puestos, sin pigmentación, en los que el vitelo ocupa casi todo su volumen.
- **Estado B** (41-50 días): huevos de coloración naranja oscuro a marrón con ligera pigmentación. Empieza a verse la mancha lateral pigmentada del ojo y aparecen las primeras células pigmentadas. El vitelo ocupa aproximadamente el 50% del volumen del huevo.
- **Estado C** (50-59 días): huevos de coloración gris oscuro, con pigmentación completa, próximos a la eclosión. Presencia de cromatóforos y ojos bien desarrollados. El embrión ocupa por completo el volumen del huevo.

Figura 1. De izquierda a derecha, huevo en estado de desarrollo A, huevo en estado de desarrollo B y huevo en estado de desarrollo C.



En Galicia, el número estimado de puestas que puede realizar una hembra en cada ciclo reproductivo anual es de tres, pudiendo llegar a los 500.000 huevos por puesta en las hembras de mayor tamaño.

Las centollas utilizan los estuarios como hábitat en su fase juvenil y emigran a zonas más profundas para aparearse cuando alcanzan la madurez (Corgos, 2004). En estos hábitats estuáricos, los juveniles se encuentran en grandes densidades, muestran un marcado comportamiento agregativo, sufren menores tasas de predación o presentan mayores tasas de crecimiento (Beck *et al.*, 2001). Por otra parte, factores como el grado de exposición al oleaje y el tipo de sustrato y la profundidad parecen determinar la selección de hábitat (Le Foll, 1993).

Entre finales de verano y principios de otoño (2-3 meses después de la muda), los adultos empiezan a migrar hacia aguas profundas (30-100m) en fondos blandos para aparearse (Freire

& González-Gurriarán, 1998). Los apareamientos empiezan durante el inicio de la migración, pero es en aguas profundas donde se produce la mayor parte de los mismos. El hecho de que los animales migradores almacenen reservas energéticas antes de iniciar la migración para llevarla a cabo con garantías de éxito está ampliamente documentado. En el caso de la centolla, la migración supone un enorme cambio de actividad (desplazamientos rápidos de más de 1-10 km en pocos días, Hines *et al.*, 1995) tras un período juvenil con movimientos exclusivamente de pequeña escala (cientos de metros, Hines *et al.*, 1995). Por otra parte, esta migración debe realizarse tras la muda terminal, un proceso fisiológica y energéticamente crítico. Por tanto, durante un período corto inmediatamente posterior a la muda y previo a la migración se debe producir la recuperación y el almacenamiento de energía preciso para la migración. Tras el apareamiento, las hembras retornan a aguas someras para la incubación de la primera puesta del ciclo anual.

Estos procesos de selección de hábitat y movimientos determinan la existencia de poblaciones de juveniles y adultos postpubertales en aguas someras, poblaciones de machos y hembras adultos en aguas profundas (las hembras sólo en otoño e invierno), y hembras adultas en aguas someras (en primavera y verano), que regresan probablemente para acelerar la incubación de las puestas (Corgos, 2004).

Cada hembra podrá fecundar varias puestas sucesivas sin necesidad de cópula gracias a que disponen de espermatecas donde almacenan el esperma que, en forma de espermátóforos, han podido recibir tras varias cópulas con uno o varios machos distintos. La capacidad de *Maja brachydactyla* para el almacenamiento a largo plazo de esperma en sus espermatecas conduce a la sospecha de que las hembras poseen el potencial de usar el esperma de múltiples machos al mismo tiempo, es decir, de la existencia de paternidad múltiple en esta especie (González-Gurriarán *et al.*, 1998). Sin embargo, a pesar de todos los estudios previos sobre diferentes aspectos de la biología de la centolla, y en particular sobre su biología reproductiva, se trata de una cuestión que no se ha resuelto todavía, y que debería abordarse debido a su relevancia en ciertas características poblacionales directamente relacionadas con la sostenibilidad de las poblaciones naturales, como es el caso del tamaño efectivo y, por tanto, el potencial reproductivo de las mismas.

El tamaño efectivo de las poblaciones depende tanto de la capacidad de las hembras para producir óvulos, como de la capacidad de los machos para fecundarlos. En este sentido, no es suficiente con conocer la proporción sexual de las poblaciones, y la distribución de tallas de cada sexo, sino que en función de ello, es necesario también, estimar la capacidad de los machos para fecundar las puestas de las hembras de la población a través de estudios de paternidad.

En relación con esto, el tamaño efectivo de las poblaciones naturales, aunque resulte paradójico, podría verse afectado por algunas medidas de regulación pesquera, ya que si bien intentan controlar el efecto de la explotación pesquera sobre el tamaño poblacional, podrían llegar a alterar la estructura de las poblaciones naturales, fundamentalmente en cuanto al sex-ratio y a la distribución de frecuencias de tallas. En Galicia la centolla, con un amplio periodo reproductivo anual y con porcentajes elevados de hembras ovadas (cuya captura está

prohibida) la pesquería se centra en los machos. Esto podría llevar a una situación de desequilibrio, a nivel de la proporción sexual y de la estructura de tallas de ambos sexos, que afecte al potencial reproductivo y tamaño de sus poblaciones naturales y, en definitiva, a la sostenibilidad de la pesca.



OBJETIVOS

Con el presente estudio se pretende dar un primer paso hacia la optimización de la metodología que permita realizar estudios posteriores de paternidad en la centolla *Maja brachydactyla*. Para ello se procederá a:

- La búsqueda de un método adecuado para la extracción de DNA de huevos de centolla.
- La comprobación de la calidad del DNA por cuantificación mediante espectrofotometría y amplificación de los genes mitocondriales COI y 16S.
- El establecimiento del estado de los huevos (A, B o C) más apropiado para conseguir la máxima cantidad de DNA posible en la extracción.
- La determinación del mejor método de conservación (congelación, liofilización o conservación en etanol) de las puestas para su posterior utilización en pruebas de paternidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Los huevos empleados para este estudio tienen 2 orígenes: hembras capturadas en el año 1998 en la ría de Arousa, a las que se les retiraron los huevos tras la captura, y hembras capturadas en el Golfo Ártabro en el año 2013 y mantenidas en cautividad de las que se extrajeron huevos en diferentes muestreos. De las puestas procedentes de hembras de la ría de Arousa se realizaron submuestras y se conservaron en etanol, liofilizadas y congeladas. A las hembras capturadas en el Golfo Ártabro sólo se les retiró parte de la puesta, con el fin de que los huevos restantes continuaran desarrollándose, y los huevos recogidos únicamente fueron congelados. No obstante, de algunas de estas muestras se tomaron huevos antes de su congelación (unas horas después de su recogida y mantenidas a 4°C) para la aplicación de métodos específicos para huevos frescos (choque hipotónico). La información sobre las muestras empleadas se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos de muestreo y conservación de las puestas de *Maja Brachydactyla* utilizadas en este estudio.

Hembra	Fecha	Localidad	Estado huevos	Método conservación
C21	09/06/1998	Ría de Arousa	A	Congelados, etanol y liofilo
C22	09/06/1998	Ría de Arousa	C	Congelados, etanol y liofilo
C24	09/06/1998	Ría de Arousa	B	Congelados, etanol y liofilo
C31	10/06/1998	Ría de Arousa	C	Congelados, etanol y liofilo
C34	10/06/1998	Ría de Arousa	A	Congelados, etanol y liofilo
C46	25/06/1998	Ría de Arousa	A	Congelados, etanol y liofilo
C50	25/06/1998	Ría de Arousa	B	Congelados, etanol y liofilo
MM1	30/04/2013	Golfo Ártabro	A y B *	Congelados
MM2	30/04/2013	Golfo Ártabro	A	Congelados
MM3	30/04/2013	Golfo Ártabro	A	Congelados

*A la hembra MM1 se le tomó una muestra de huevos en estado A y se permitió que el resto de la puesta siguiera su desarrollo. En un muestreo posterior, se recogieron huevos en estado B de esa misma hembra.

Extracción del DNA

La búsqueda de un método de extracción de DNA lo bastante sensible como para ser empleado en estudios de paternidad se realizó empleando huevos individuales. Las muestras de las que provienen estos huevos estaban conservadas en etanol, en refrigeración a 4°C o congeladas a -80°C. Se probaron diversos métodos que aparecen enumerados a continuación, así como múltiples combinaciones de los mismos.

1. Métodos mecánicos:
 - 1.1 Corte.
 - 1.2 Punción.
 - 1.3 Homogenización.

2. Incubación en lejía 10% (durante 15 y 30 minutos).
3. Choque térmico: congelación a -80°C , hervido durante 4 minutos y de nuevo congelación a -80°C .
4. NucleoSpin® Tissue XS kit (Macherey-Nagel). Protocolo para tejido humano o animal con diferentes tiempos de incubación en proteinasa K (1, 4, 6 y 24 horas) y diferentes tiempos y temperaturas de incubación final para eliminar el etanol residual (sin incubación, 8 minutos a 80°C y 8 minutos a 90°C).
5. Choque hipotónico: incubación en KCl 0,56% durante 0 minutos (control), 30 minutos o 2 horas; centrifugación de 10 minutos a 1500 rpm, retirada del KCl y resuspensión en agua.
6. Extracción con resina Chelex® 100 (Bio-Rad).
7. Precipitación del DNA con acetato sódico 3M y etanol 100%.
8. NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel). Protocolo estándar para tejido humano o animal y células en cultivo. La incubación en proteinasa K fue de 1 hora.

En el caso de las muestras conservadas en etanol, se realizaron además lavados con agua estéril a algunos de los huevos seleccionados con el fin de eliminar el etanol residual que pudiera interferir en los procesos de extracción, cuantificación y amplificación del DNA.

La extracción de DNA mediante un choque hipotónico sólo se empleó para muestras conservadas a 4°C y con menos de 24 horas desde su recolección, ya que son las únicas en las que todavía pueden funcionar los procesos de ósmosis.

Una vez escogido el método de extracción de DNA más efectivo, se aplicó sobre grupos de 20 huevos. Estos procedían de 6 hembras diferentes: 2 con los huevos en estado A (realmente 3. Se comentará en la discusión), 2 con los huevos en estado B y 2 con los huevos en estado C. De cada hembra se procesaron 6 muestras, en las que estaban representados los 3 métodos de conservación (2 por cada método). La finalidad de este proceso es determinar qué forma de conservación altera menos el DNA y cuál es el estado de desarrollo que permite obtener una mayor cantidad de DNA.

Comprobación de la calidad del DNA

Para comprobar la cantidad y calidad del DNA extraído, se cuantificaron las muestras mediante espectrofotometría con el NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y, a partir de ellas, se amplificaron los genes mitocondriales de la citocromo oxidasa I y del DNA ribosómico 16S. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de $25\mu\text{l}$ que contenía aproximadamente 25ng de DNA, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1,5mM MgCl_2 , $0,5\mu\text{M}$ de cada cebador, 200 μM y 1,25U de Taq polimerasa. Se realizó una PCR en gradiente con diferentes parejas de cebadores (LCO1490/ HCO2198, 16L29-F/16HLeu-R, COL6/COH6, secuencias en el apéndice 1) que consistió en una desnaturalización inicial 5min a 95°C seguido de 35 ciclos de 30s a 95°C , 30s a las temperaturas de hibridación del gradiente (43; 43,7; 45,1; 47; 49,6; 51,7; 53,1 y 54°C), y 45s a 72°C seguidos de una extensión final de 5min a 72°C .

Por otra parte, también se realizó un ensayo de una PCR *touchdown* en la que las condiciones de PCR fueron las señaladas en el párrafo anterior. En este caso el protocolo de la PCR es una

desnaturalización inicial de 5min a 94°C seguido de 5 ciclos de PCR de 30s a 94°C, 90s a 45°C y 60s a 72°C, 5 ciclos de PCR de 30s a 94°C, 90s a 65°C (disminución de un grado en cada repetición) y 60s a 72°C y, seguidamente, 30 ciclos de PCR de 30s a 94°C, 90s a 60°C y 60s a 72°C y, finalmente una extensión a 72°C 5min. Los cebadores utilizados en este caso fueron 16L29-FM13 y 16HLeu-RM13. Las secuencias de todos los cebadores utilizados se presentan en el Apéndice 1.

Para detectar si hubo amplificación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las muestras que mostraron amplificación fueron enviadas a los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) para su secuenciación. De este modo se puede corroborar que efectivamente se trata de los genes diana.

Análisis estadístico de los datos

Los datos de concentración de DNA obtenidos por espectrofotometría para las muestras de 20 huevos fueron sometidos a un análisis estadístico con el fin de establecer si existen diferencias de rendimiento al partir de huevos en distintos estados de desarrollo y distinto método de conservación. Para ello, se empleó un ANOVA con 2 factores de tratamiento, “Estado del huevo” y “Método de conservación”. A pesar de que no se pretende comprobar si existen diferencias entre hembras, se trata de un factor a tener en cuenta, puesto que podría haber diferencias debidas a la variabilidad entre individuos. Por esta razón, se ha incluido en el modelo el factor “Hembra” como un factor de bloqueo, aunque al no tener datos de los 3 estados de desarrollo dentro de la misma hembra, sino 2 hembras por cada estado de los huevos, “Hembra” será un factor de bloqueo anidado dentro del factor “Estado del huevo”.

RESULTADOS

Para los huevos procesados individualmente, la calidad se determinó amplificando fragmentos de los genes COI y 16S. Sólo para algunos de los métodos se obtuvo el producto de PCR buscado y para los que sí se obtuvo, en general, el porcentaje de éxito fue relativamente bajo. Los métodos basados en extracción de DNA mediante columnas con membrana de sílica (NucleoSpin® Tissue XS kit y NucleoSpin® Tissue kit) resultaron ser los más efectivos.

Por otra parte, con los cebadores empleados apenas se ha conseguido amplificar el gen COI (sólo una única muestra con los cebadores COL6/COH6), mientras que los resultados obtenidos para 16S fueron notablemente mejores. Las dos parejas de cebadores probadas para este gen, 16HLeu R/16L29 F y 16HLeu R M13/16L29 F M13, funcionaron. En el Apéndice 3 se incluye una tabla con los datos de extracción y amplificación de las muestras para las que se obtuvieron resultados positivos. En el Apéndice 2 se recogen datos sobre la extracción de DNA y la amplificación de los genes COI y 16S de parte de las muestras procesadas.

Los productos de PCR de las muestras en las que hubo amplificación, fueron enviadas a secuenciar, pero no se obtuvo ninguna lectura.

Una vez determinado el método más efectivo, la extracción mediante el NucleoSpin® Tissue kit, se procesaron con él los grupos de 20 huevos. Los valores obtenidos en la cuantificación de DNA se muestran en el Apéndice 3. Con el propósito de establecer posibles diferencias entre la cantidad de DNA obtenida entre huevos en diferentes estados de desarrollo y diferentes métodos de conservación, se planteó un modelo ANOVA en el que se incluyeron los efectos principales de “Estado del huevo”, “Método de conservación” y “Hembra”, pero sólo la interacción entre “Estado del huevo” y “Método de conservación” (no interesa saber cómo interacciona “Hembra” con el resto de los factores, puesto que se trata de un factor de bloqueo).

Los valores de la variable respuesta han sido transformados mediante la función logarítmica para que los datos se ajustasen a las hipótesis, concretamente a la de normalidad.

Tras la realización del análisis, se llega a la conclusión de que no existe interacción entre los 2 factores de tratamiento (p -valor=0,203). Esta falta de interacción permite estudiar los efectos principales de cada factor por separado, detectándose diferencias entre las concentraciones de DNA obtenidas a partir de huevos en diferentes estados de desarrollo (p -valor= 3.78×10^{-9}), así como de huevos conservados mediante diferentes métodos (p -valor=0,031) (Ver Tabla 2).

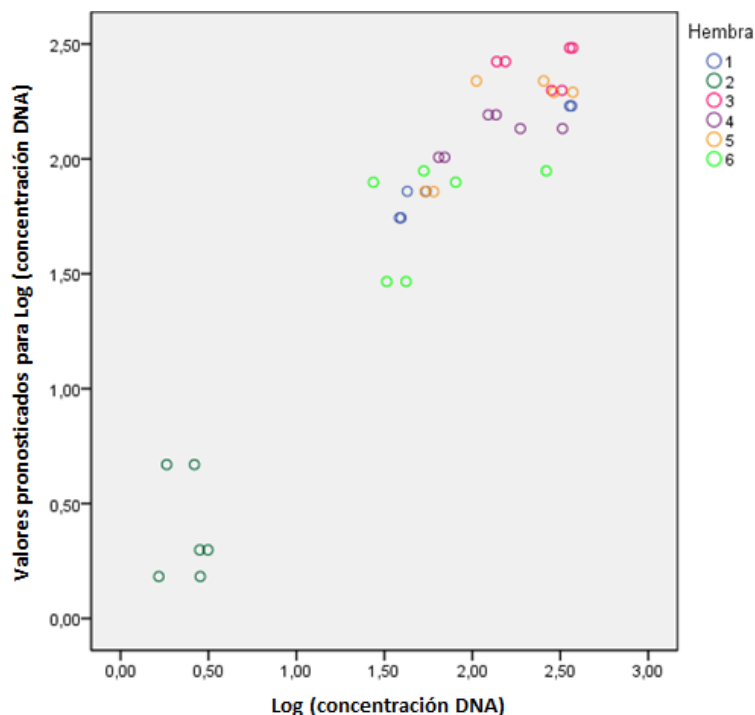
Tabla 2. Tabla ANOVA para 2 factores de tratamiento y un factor de bloqueo anidado.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Hembra(Estado)	8,023	3	2,674	33,688	0,000*
Estado	7,684	2	3,842	48,396	0,000*
Conservación	0,638	2	0,319	4,017	0,031
Estado-Conservación	0,513	4	0,128	1,616	0,203

*Los valores de significación no son exactamente 0, pero son inferiores a 0,001.

La capacidad predictiva del modelo planteado es bastante buena, puesto que $R^2=0,852$ y, al representar los valores observados frente a los pronosticados, la nube de puntos se ajusta bastante bien a una recta (Figura 2). Analizando los residuos tras el análisis con los datos transformados, se cumplen las hipótesis de normalidad (p -valor=0,770) y homocedasticidad (p -valor=0,521), aunque sigue habiendo problemas de dependencia de los datos. Sin embargo, esta relación puede deberse a la manera en que se han introducido los datos en el programa y, aparentemente, se trata de una dependencia debida al azar y no a factores que puedan estar actuando sobre la variable respuesta.

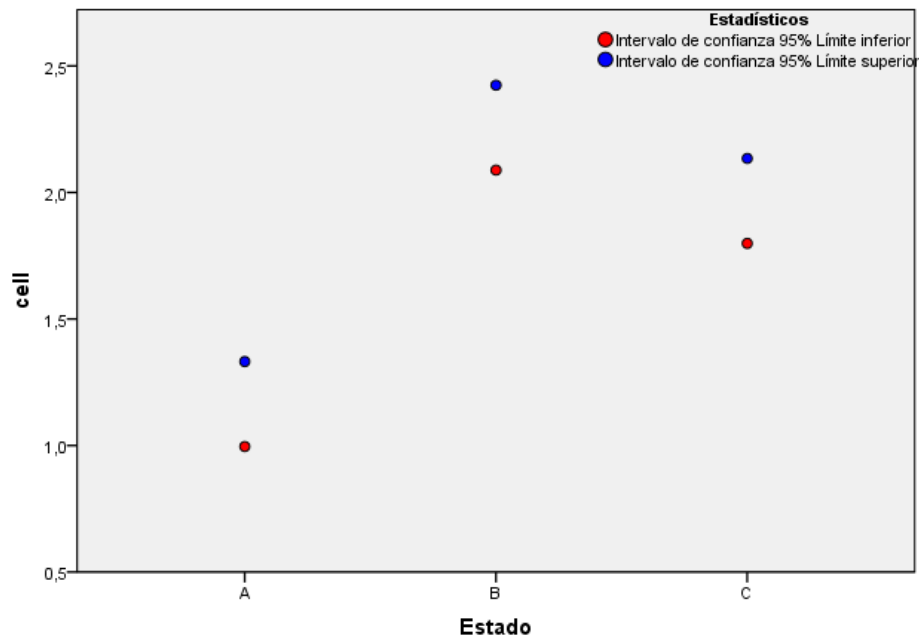
Figura 2. Representación de los valores pronosticados del logaritmo de la concentración de DNA frente a los observados. Los distintos colores hacen referencia a diferentes hembras. La hembra 2 presenta valores anormalmente bajos. La nube de dispersión se ajusta bastante bien a una recta, lo que indica que la capacidad predictiva del modelo planteado es bastante alta. 1: hembra C46; 2: hembra C21; 3: hembra C50; 4: hembra C24; 5: hembra C22; 6: hembra C31.



Una vez establecido que hay diferencias, se determinó entre qué estados de desarrollo y entre qué métodos de conservación existen. Para ello, se llevó a cabo el test de Tukey, ya que el modelo planteado presenta un diseño balanceado, y se representaron los intervalos de confianza para las medias correspondientes (Figuras 3 y 4).

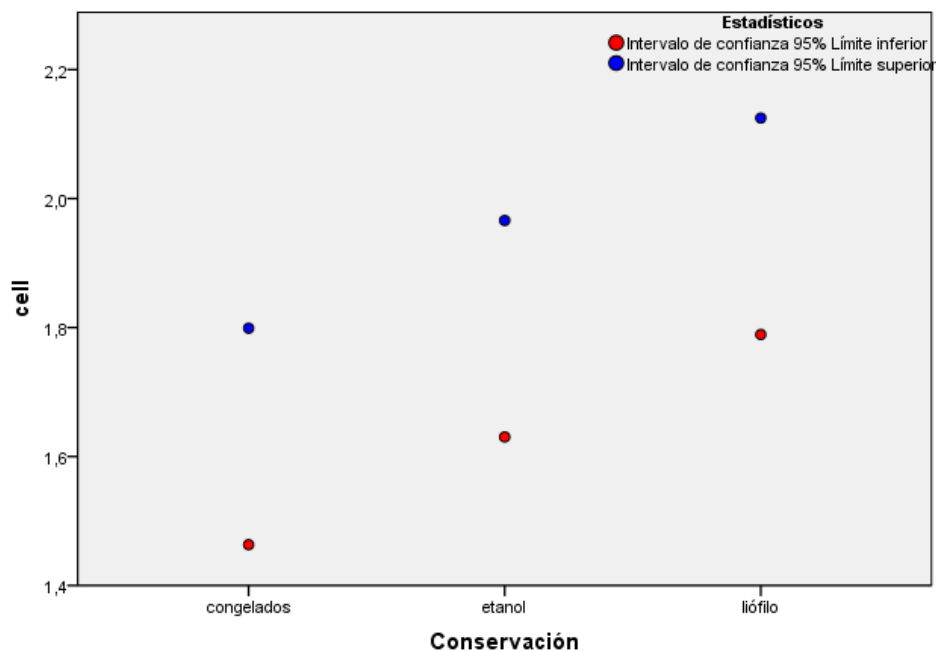
Partiendo de huevos en diferentes estados de desarrollo, se obtienen concentraciones de DNA distintas. B parece ser el mejor estado de desarrollo para llevar a cabo la extracción, mientras que A es claramente el peor de los 3 estados para la obtención de DNA.

Figura 3. Representación de los intervalos de confianza para las medias de log (concentración DNA) para los diferentes estados de desarrollo de los huevos. Cell: Log (concentración DNA).



Por otra parte, sólo se han detectado diferencias entre la cantidad de DNA obtenida a partir de huevos congelados y a partir de huevos liofilizados (a un nivel de significación del 5%, p-valor=0,024). No obstante, no existen diferencias significativas entre extraer DNA de huevos conservados en etanol o extraerlo a partir de huevos liofilizados o congelados.

Figura 4. Representación de los intervalos de confianza para las medias de log (concentración DNA) para los diferentes métodos de conservación. Cell: Log (concentración DNA).



DISCUSIÓN

Establecimiento del método de extracción óptimo

En el proceso de búsqueda del método más apropiado para la extracción de DNA de huevos de centolla, se comenzó por los métodos más económicos, para los que no era preciso el uso de reactivos específicos. Hubo amplificación de 16S en algunas de las muestras en las que se emplearon los métodos de homogenización y choque térmico, aunque la tasa de éxito fue bastante baja.

El choque hipotónico se aplicó sobre huevos refrigerados a 4°C pocas horas después de la toma de muestras, para garantizar que los procesos de ósmosis siguieran activos. Con este método se consiguió amplificar el gen 16S en varios huevos, aunque parece que las diferencias en el tiempo de incubación en KCl no afectan significativamente al rendimiento.

El tratamiento de los huevos con lejía 10% no proporcionó resultados. Probablemente se trate de un método demasiado agresivo que ha degradado el DNA del huevo.

Tampoco se obtuvieron resultados al hacer la precipitación del DNA con acetato sódico 3M y etanol 100%. A la hora de realizar la cuantificación, se observó que la muestra tenía una alta contaminación por proteínas y sales, lo que podría estar interfiriendo en la PCR. También es posible que hayan quedado en la muestra restos de etanol que estén afectando a los procesos de cuantificación y amplificación.

A pesar de que en otros estudios la resina Chelex[®] 100 ha resultado efectiva en la extracción de DNA de huevos de crustáceos decápodos (Estoup et al. 1996; McKeown & Shaw, 2008), en este caso no se han conseguido amplificar los genes a partir del extracto obtenido con este método.

Los métodos de extracción empleando kits de columnas con membrana de sílica, parecen los más sensibles. Éstos tienen, además, la ventaja de que el DNA obtenido puede ser cuantificado mediante espectrofotometría, lo que no permiten los otros sistemas debido a la alta contaminación por otras sustancias presentes en el huevo (proteínas, sales, etc.) que pueden interferir en el proceso de cuantificación. Esta mayor purificación del DNA conseguida con estos métodos puede ser la responsable del alto éxito a la hora de amplificar los genes diana.

Problemática de las muestras

Tras la cuantificación de DNA de las muestras de 20 huevos, se observó que 2 hembras con huevos en estado de desarrollo A, C21 y C34, daban valores de concentración anormalmente bajos (en el caso de C21, incluso valores negativos). Esta baja concentración podría deberse a diversos problemas como, por ejemplo, que la puesta no estuviese fecundada o bien que haya habido procesos de contaminación antes o durante el proceso de extracción de DNA. La hembra C21 fue excluida del análisis por falta de datos coherentes de concentración de DNA. Sin embargo, la hembra C34 se mantuvo dentro del conjunto de datos, puesto que al incluir las hembras como un factor de bloqueo en el modelo, ya se está considerando la posible variabilidad entre individuos. De no introducir el factor de bloqueo en el análisis, las

diferencias entre la cantidad de ADN obtenido a partir de huevos en estado A (caso de la puesta de la hembra C34) y el resto de estados se verían artificialmente acentuadas.

Determinación del estado de desarrollo del huevo y del método de conservación de la puesta óptimos para la extracción de DNA

Teniendo en cuenta los resultados del análisis estadístico para las muestras de 20 huevos, parece que el mejor sustrato para la obtención de DNA de huevos de centolla corresponde a puestas en estado de desarrollo B y conservadas en forma de liófilo. Sin embargo, las diferencias son mucho más acusadas en cuanto al desarrollo que en cuanto a la conservación (a un nivel de significación del 1%, no se podrían aceptar diferencias entre los diferentes métodos de conservación).

En un principio, cabría esperar que del estado del que se obtuviese más DNA fuera el C, en el que la larva ya está formada y hay un mayor número de células. El hecho de que se consiga extraer más DNA de huevos en estado B, podría deberse a la existencia de sustancias que interfieran en el proceso de extracción o cuantificación en huevos más desarrollados, o de estructuras que dificulten el acceso al DNA.

En cuanto al método de conservación, *a priori* puede parecer que la congelación sea el método menos agresivo con el DNA, pero los resultados obtenidos indican que la cantidad de DNA extraído es mayor para muestras liofilizadas. Una posible explicación es que se haya perdido parte del contenido de los huevos durante la manipulación de los huevos, ya que tras la descongelación éstos son incluso más delicados que los huevos frescos, mientras que los tratamientos de liofilización y conservación en etanol provocan un endurecimiento de los tejidos que facilita su manipulación. Esto supondría que, a pesar de que el DNA pudiera estar más alterado en los huevos conservados en etanol y en los liofilizados, sería más fácil obtener altas concentraciones de DNA realizando la extracción a partir de estos sustratos.

Problemas en la PCR y en la secuenciación

La calidad del DNA extraído se ha comprobado mediante amplificación de los genes 16S y COI, aunque para este último, sólo ha habido amplificación para una de las muestras. Las PCRs para el gen 16S, en cambio, han dado mejores resultados, tanto con los cebadores 16L29-F/16HLeu-R, como con otro par con colas M13 (Radulovici *et al*, 2009) diseñado a partir de estos (16L29-FM13/16HLeu-RM13). La amplificación del gen empleando estos cebadores con colas, tiene como finalidad facilitar la secuenciación. A pesar del uso de estos cebadores especiales y de la utilización de una PCR *touchdown*, que favorece la amplificación de productos específicos, no se obtuvieron resultados a la hora de secuenciar. Este hecho podría deberse a la existencia de alguna componente presente en los huevos que interfiera en el proceso de secuenciación. Otra posible explicación sería que mediante la PCR se hubiesen amplificado diferentes productos, teniendo como resultado una mezcla de secuencias, lo que impediría una lectura correcta. Estas otras regiones inespecíficas pueden proceder de organismos que se encuentren en la superficie del huevo, o incluso, de tejido de la propia hembra.

Conclusiones

Los resultados expuestos en el siguiente trabajo constituyen una herramienta de partida para la realización de estudios de paternidad en *Maja brachydactyla*.

Este trabajo pone de manifiesto la importancia de considerar el tratamiento de las muestras que se utilicen para estudios de paternidad, y en particular el método de conservación, si es el caso, así como el grado de desarrollo de los huevos. No obstante, se deben tener en cuenta otros aspectos, como el diseño de una estrategia para la toma de muestras de huevos en los pleópodos de las hembras para controlar la potencial influencia del proceso de adhesión de los huevos a las sedas de los mismos una vez que salen ya fecundados por los gonoporos femeninos. Asimismo, es conveniente extraer y cuantificar el DNA de las masas de esperma que puedan contener las espermatecas de las hembras.

Idealmente, además de los estudios de paternidad a partir de las puestas de las hembras fecundadas en el medio natural, se deberían realizar estudios de laboratorio para responder a preguntas de interés en la gestión pesquera por su importancia en aspectos clave en la sostenibilidad de poblaciones naturales, como es el caso de su tamaño eficiente. En relación con esto, el diseño de los estudios de laboratorio debería permitir responder si es posible que un único macho fecunde toda la puesta de una hembra, si esto depende del tamaño relativo de los individuos de cada sexo, o también conocer, en caso de que una hembra reciba esperma de varios machos, cómo influye el orden de cópula y la disposición de las masas de esperma en las espermatecas sobre la multipaternidad en una misma puesta.



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a la profesora Doña Graciela Estévez Pérez por su ayuda en el análisis estadístico de los datos, y a la empresa AIRMAR y a Patricia Verísimo por suministrar algunas de las muestras empleadas para este trabajo.

REFERENCIAS

- Bernárdez C, González-Gurriarán E, García-Calvo B, Corgos A, Freire J (2005). Movements of juvenile and adult spider crab (*Maja squinado*) in the Ría da Coruña (NW Spain). En, Aquatic telemetry: advances and applications. Proceedings of the Fifth Conference on Fish Telemetry held in Europe. Ustica, Italy, 9-13 June 2003. 133-139. Spedicato MT, Lembo G y Marmulla G (eds.), Rome: FAO/COISPA. 2005. 295 p.
- Beck MW, KL Heck, Able KW, DL Childers, *et al* (13 coautores) (2001) The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *BioScience* 51:633-641
- Brosnan DM (1981) Studies on the biology, ecology and fishery of the spider crab *Maia squinado* Herbst (1768) of the west coast of Ireland. Department of Zoology. University College Galway, Ireland: 133
- Corgos A (2004) Estrategia vital, estructura espacial y dinámica poblacional de la centolla, *Maja squinado* (Decapoda: Majidae). Tesis doctoral, Universidad de A Coruña
- Estoup A, Largiader CR, Perrot E, Chourrout D (1996) Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5:295–298
- Freire J, González-Gurriarán E (1998) New approaches to the behavioural ecology of decapod crustaceans using telemetry and electronic tags. *Hydrobiologia* 371/372: 123-132
- González-Gurriarán E, Fernández L, Freire J, Muiño R (1998). Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 220: 269–285.
- González-Gurriarán E, Fernández L, Freire J, Muiño R, Parapar J (1993) Reproduction of the spider crab *Maja squinado* (Brachyura: Majidae) in the southern Galician coast (NW Spain). ICES, Shellfish Committee. C.M. 1993/K:19: 15
- Hines, AH, Wolcott TG, González-Gurriarán E, González-Escalante JL, Freire J (1995) Movement patterns and migrations in crabs: telemetry of juvenile and adult behaviour in *Callinectes sapidus* and *Maja squinado*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 75: 27–42
- Iglesias J, Sánchez F, Moxica C, Fuentes L, Otero JJ, Pérez JL (2002) Datos preliminares sobre el cultivo de larvas y juveniles de centolla *Maja squinado* Herbst, 1788 en el Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía. *Boletín*. Instituto Español de Oceanografía 18: 25-30
- Le Foll D (1993) Biologie et exploitation de l'araignée de mer *Maja squinado* Herbst en Manche Ouest. Tesis doctoral, Université de Bretagne Occidentale. IFREMER, RI DRV 93–030: 524

- McKeown NJ, Shaw PW (2008) Single paternity within broods of the brown crab *Cancer pagurus*: A highly fecund species with long-term sperm storage. *Marine Ecology Progress Series* 368:209–215
- Neumann, V (1998) A review of the *Maja squinado* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) species-complex with a key to the eastern Atlantic and Mediterranean species of the genus. *Journal of Natural History* 32: 1667–1684
- Pardieck RA, Orth RJ, Diaz RJ, RN Lipcius (1999) Ontogenetic changes in hábitat use by postlarvae and young juveniles of the blue crab. *Marine Ecology Progress Series* 186: 227–238
- Pascual MS, EA Zampatti, Iribarne OO (2001) Population structure and demography of the puelche oyster (*Ostrea puelchana*, d'Orbigny, 1841) grounds in northern Patagonia, Argentina. *Journal of Shellfish Research* 20: 1003-1010
- Radulovici AE, Sainte-Marie B, Dufresne F. (2009) DNA barcoding of marine crustaceans from the Estuary and Gulf of St Lawrence: a regional-scale approach. *Molecular Ecology Resources* 9: 181–187
- Sampedro MP, Gurriarán EG, Freire J, Muiño R (1999) Morphometry and sexual maturity in the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in Galicia, Spain. *Journal of Crustacean Biology* 19: 578-592
- Sampedro MP, González-Gurriarán E, Freire J (2003) Moulting cycle and growth of *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) in coastal habitats of Galicia, north-west Spain. *Journal of The marine Biological Association of the United Kingdom* 83: 995-1005
- Sotelo G, Morán P, Fernández L, Posada D (2008) Genetic variation of the spiny spider crab *Maja brachydactyla* in the northeastern Atlantic. *Marine Ecology Progress Series* 362:211–223
- Verísimo P, Bernárdez C, González-Gurriarán E, Freire J, Muiño R, Fernández L (2011) Changes between consecutive broods in the fecundity of the spider crab, *Maja brachydactyla*. *ICES Journal Marine Science* 68: 472–478

APÉNDICE 1**Tabla A1.** Secuencias de los cebadores empleados para la amplificación de los genes mitocondriales COI y 16S.

Nombre	Secuencia
LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
COH6	5' – TAD ACT TCD GGR TGD CCA AAR AAY CA – 3'
16L29-F	5' - YGC CTG TTT ATC AAA AAC A – 3'
16HLeu-R	5' - CAT ATT ATC TGC CAA AAT AG – 3'
COL6	5' – ACA AAT CAT AAA GAT ATY GG – 3'
COH6	5' – TAD ACT TCD GGR TGD CCA AAR AAY CA – 3'
16L29-FM13	5' – GTA AAA CGA CGG CCA GTY GCC TGT TTA TCA AAA AC – 3'
16HLeu-RM13	5' – CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATA TTA TCT GCC AAA AT – 3'

APÉNDICE 2

Tabla A2. Datos de algunas de las muestras en las que hubo amplificación y de las PCRs correspondientes. Sólo se pudo cuantificar el DNA extraído con los kits de columnas (DNA poco contaminado). Estos datos no sirven para determinar qué método de extracción es el más efectivo, ya que no se ha procesado el mismo número de huevos con cada uno de ellos, pero sirven para ver los que funcionaron a la hora de amplificar COI y 16S. 1.3: homogenización; 3: choque térmico; 4: NucleoSpin® Tissue XS kit (entre paréntesis se indica el tiempo de incubación en proteínaasa K y, a continuación, el tiempo y temperatura de incubación final); 5: choque hipotónico (entre paréntesis se indica el tiempo de incubación en KCl); 8: NucleoSpin® Tissue kit (con 1h de incubación en proteínaasa K). La numeración se corresponde con la empleada en el apartado “Materiales y métodos”. “Gradiente maja” y “TD maja 16s M13” hacen referencia a los programas de PCR en gradiente y de la PCR touchdown, respectivamente. La columna “Temperatura” hace referencia a la temperatura de hibridación del gradiente.

Hembra	Estado huevos	Conservación	Método extracción	[DNA] (ng/μl)	Cebadores	Programa PCR	Temperatura (°C)
C46	B (marrón)	Etanol	1.3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	45,1
C46	B (marrón)	Etanol	1.3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	51,7
C46	B (marrón)	Etanol	1.3 y 3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	53,1
C46	B (marrón)	Etanol	1.3 y 3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	49,6
C51	C (negro)	Etanol	1.3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	53,1
C34	A (naranja)	Etanol	1.3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	53,1
C50	B (marrón)	Etanol	1.3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	53,1
R53	C (negro)	Etanol	1.3 y 3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	53,1
C22	C (negro)	Etanol	1.3 y 3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	53,1
C34	A (naranja)	Etanol	1.3 y 3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	53,1
C34	A (naranja)	Etanol	1.3 y 3	-	16HLeu-R/16L29-F	Gradiente maja	51,7
C46	A (naranja)	Etanol	4 (2h)(90°C 8min)	10,04	COI6/COH6	Gradiente maja	55,5
C50	C (marrón)	Etanol	3 y 4 (4h)(80°C 8min)	3,86	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
C50	C (marrón)	Etanol	3, 1.3 y 4 (4h)(80°C 8min)	14,21	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
C50	C (marrón)	Etanol	1.3 y 3	-	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
C46	A (naranja)	Etanol	3 y 4 (4h)(80°C 8min)	2,27	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
C46	A (naranja)	Etanol	3, 1.3 y 4 (4h)(80°C 8min)	2,53	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
C46	A (naranja)	Etanol	1.3 y 3	-	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
MM3	A (naranja)	Congelados	1.3, 3 y 4 (1h)(90°C 8min)	17,12	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
MM3	A (naranja)	Congelados	3 y 4 (24h)(80°C 8min)	1,53	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
MM3	A (naranja)	Congelados	3, 1.3 y 4 (24h)(80°C 8min)	11,31	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
MM1	A (naranja)	Conservados a 4°C	5 (0min), 1.3 y 4 (6h)(80°C 8min)	41,74	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
MM1	A (naranja)	Conservados a 4°C	5 (30min), 1.3 y 4 (6h)(80°C 8min)	25,19	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
MM1	A (naranja)	Conservados a 4°C	5 (2h), 1.3 y 4 (6h)(80°C 8min)	24,81	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM12	-
MM2	A (naranja)	Conservados a 4°C	5 (2h), 1.3 y 4 (6h)(80°C 8min)	9,82	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM13	-
MM1	A (naranja)	Congelados	8	17,99	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM15	-
MM1	C (marrón)	Congelados	8	24,25	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM16	-
C46	A (naranja)	Congelados	8	41,94	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM17	-
C50	B (marrón)	Congelados	8	44,63	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM18	-
C22	C (negro)	Congelados	8	64,58	16HLeu-RM13/16L29-FM13	TD maja 16sM19	-

APÉNDICE 3
Tabla A3. Valores obtenidos en la cuantificación de DNA para las muestras de 20 huevos.

Muestra	Estado	Conservación	[DNA] (ng/ μ l)
C46 KG1	A	congelados	42,69
C46 KG2	A	congelados	54,53
C46 KL1	A	liófilo	357,73
C46 KL2	A	liófilo	366,55
C46 KE1	A	etanol	38,54
C46 KE2	A	etanol	39,34
C34 C1	A	congelados	3,14
C34 C2	A	congelados	2,82
C34 L1	A	liófilo	2,63
C34 L2	A	liófilo	1,83
C34 E1	A	etanol	2,84
C34 E2	A	etanol	1,65
C50 KG1	B	congelados	323,39
C50 KG2	B	congelados	282,24
C50 KL1	B	liófilo	154,02
C50 KL2	B	liófilo	137,55
C50 KE1	B	etanol	357,87
C50 KE2	B	etanol	371,94
C24 C1	B	congelados	69,54
C24 C2	B	congelados	64,36
C24 L1	B	liófilo	187,32
C24 L2	B	liófilo	325,66
C24 E1	B	etanol	136,45
C24 E2	B	etanol	123,18
C22 KG1	C	congelados	60,26
C22 KG2	C	congelados	53,77
C22 KL1	C	liófilo	105,56
C22 KL2	C	liófilo	254,46
C22 KE1	C	etanol	372,77
C22 KE2	C	etanol	290,09
C31 C1	C	congelados	42
C31 C2	C	congelados	32,64
C31 L1	C	liófilo	52,97
C31 L2	C	liófilo	263,22
C31 E1	C	etanol	80,48
C31 E2	C	etanol	27,38