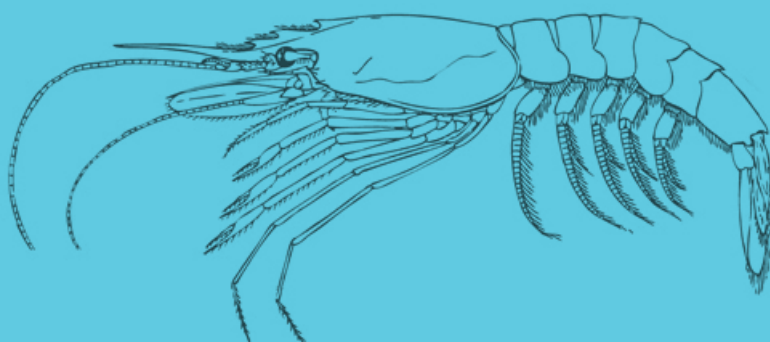


**BECA COOPERATIVA LA EQUITATIVA 2013-2014**



**La gamba de Palamós:  
noves eines genètiques  
per a la sostenibilitat  
del recurs pesquer  
a la Confraria de Palamós**

AUTORES

María Inés Roldán, Laia Planella,  
Sandra Heras i Ilaria Caldarazzo

Aquest document és un resum del projecte guanyador de la setena edició de la Beca Cooperativa La Equitativa.  
El projecte original el podeu consultar a la seu del Servei d'Arxiu Municipal de Palamós.



**AJUNTAMENT DE PALAMÓS**  
Àrea de Cultura i Patrimoni

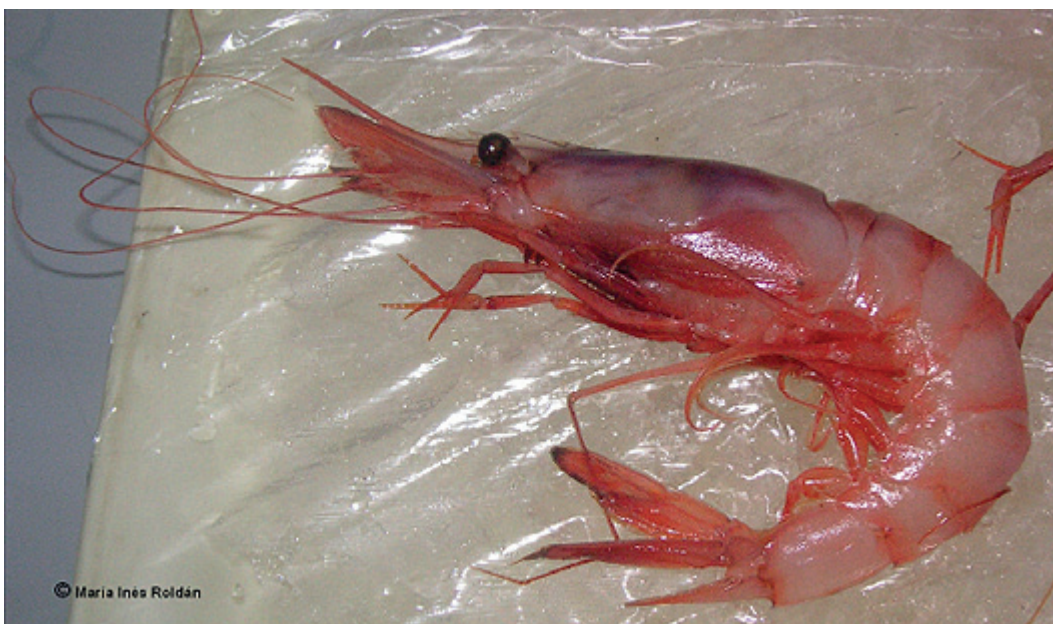


Servei d'Arxiu Municipal de Palamós

## INTRODUCCIÓ

### La gamba de Palamós

La gamba de Palamós, coneguda també com a gamba rosada o gamba vermella, és un crustaci decàpode descrit per primera vegada pel naturalista francès Giuseppe Antonio Risso l'any 1816 amb el nom científic d'*Aristeus antennatus*. Giuseppe A. Risso realitzà la descripció en individus del mar Lígur a Itàlia, on l'espècie era abundant, però posteriorment es va descobrir que la distribució geogràfica de la gamba rosada és molt més àmplia.



**Individu fresc de gamba rosada, *Aristeus antennatus*.**

Foto: María Inés Roldán

Actualment, se sap que habita al llarg del mar Mediterrani, majoritàriament al Mediterrani occidental on és molt abundant. També se la troba a les aigües atlàntiques adjacents a l'estret de Gibraltar fins a Lisboa i a les aigües occidentals de l'oceà Índic, principalment al canal de Moçambic.

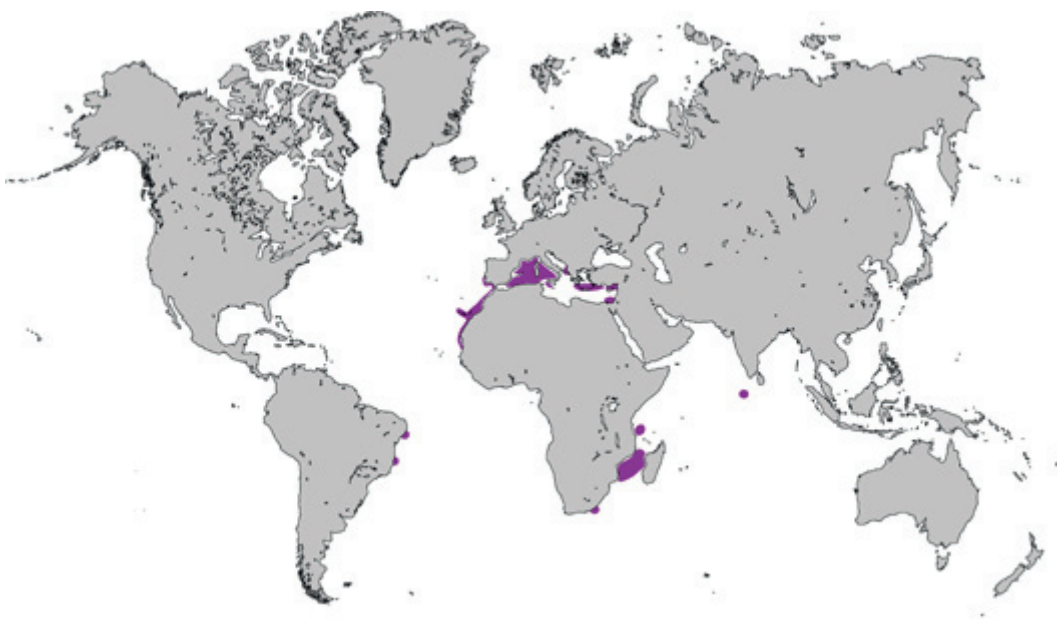


Figura 1. Distribució geogràfica a escala mundial (assenyalat en morat) de la gamba rosada, *Aristeus antennatus*.

Font: M.V. Fernández, 2012

La gamba rosada és una de les espècies marines més preuades de l'àmbit culinari al Mediterrani occidental, per la textura i el sabor de la seva carn. Aquest fet va propiciar la seva comercialització a partir dels anys 40 i des d'aleshores, el nombre de captures anuals totals ha anat en augment oscil·lant entre les 2.000 i 3.000 tones durant l'última dècada.

### Global Capture Production for species (tonnes)

Source: FAO FishStat

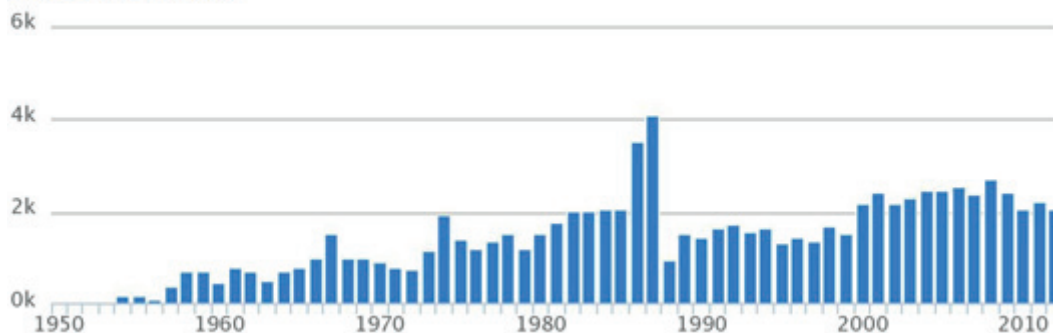


Figura 2. Histograma de l'evolució de les captures a escala mundial de la gamba rosada, *Aristeus antennatus*, durant el període 1954 - 2012. 2k = 2.000 tones.

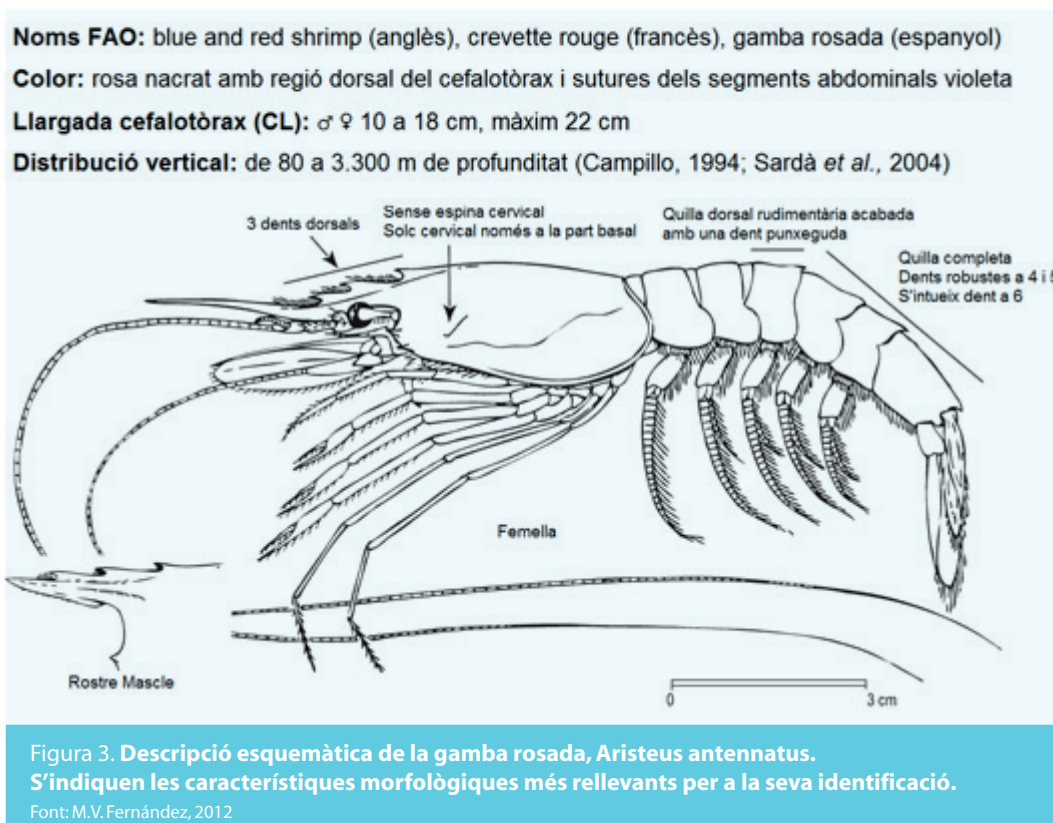
Font: FAO, 2014

A Catalunya és pescada pels vaixells d'arrossegament especialment entre Roses (província de Girona) i Vilanova i la Geltrú (província de Barcelona) on les captures tenen lloc prop de la costa, a la plataforma continental, o al talús superior i les embarcacions tornen a port el mateix dia.

A nivell taxonòmic, aquest crustaci decàpode es classifica biològicament dins el subordre *Dendrobranchiata* i la Família *Aristeidae*, tal com detalla la classificació taxonòmica de De Grave i Fransen de 2011:

- Fílum *Arthropoda*
- Subfílum *Crustacea*
- Classe *Malacostraca*
- Subclasse *Eumalacostraca*
- Superordre *Eucarida*
- Ordre *Decapoda*
- Subordre *Dendrobranchiata*
- Superfamília *Penaeoidea*
- Família *Aristeidae*
- Gènere *Aristeus*
- Aristeus antennatus* (Risso, 1816)

En la figura 3 es detallen les principals característiques morfològiques diferencials que defineixen la seva classificació biològica.



Com la majoria de decàpodes marins, presenta sexes separats i fecundació externa. L'espermatòfor és l'estructura quitinosa que el mascle transfereix a la femella i que conté els espermatozoides. La femella emmagatzema i transfereix aquest espermatòfor mitjançant la seva estructura sexual femenina denominada *telicum*. L'aparellament es dona de gener a maig, i culmina amb la posta dels ous durant els mesos d'estiu. El cicle de vida presenta diferents estadis i comença amb els estadis larvaris denominats *naupli*, *zoea*, *mysis* i postlarva en què els tres primers són de vida pelàgica i tenen lloc a la franja d'aigua més superficial. El temps que les larves viuen a la franja superficial de l'aigua es desconeix, però a partir de l'estadi de postlarva la gamba rosada habita a major profunditat. A més a més, és l'espècie marina mediterrània amb el rang de distribució batimètric més ampli, que va des dels 80 metres als 2.800 metres de profunditat, amb una màxima abundància d'individus als 800 metres dependent de l'àrea de pesca. La distribució al llarg de la columna d'aigua no és uniforme, així entre els 80 metres i 1.000 metres hi ha la major densitat d'individus, i és fonamentalment a la franja entre 700 metres i 800 metres on es concentren les femelles adultes i també els mascles durant l'època de reproducció. A profunditats més grans de 1.000 metres la densitat d'individus disminueix, i és on abunden majoritàriament els juvenils i els mascles adults.

**D'ON VENIM** Durant els darrers 20 anys al Mediterrani nord-occidental, atès l'important valor comercial de la gamba rosada, s'han realitzat nombrosos estudis sobre la biologia, la reproducció i l'ecologia. Dins d'aquests estudis, destaquen principalment els treballs dins l'àmbit de la biologia pesquera que han estat realitzats fonamentalment per investigadors de l'Institut de Ciències del Mar de Barcelona i del *Centro Oceanográfico de Baleares del Instituto Español de Oceanografía*.

Malgrat això, els primers estudis en el camp de la genètica, en particular la genètica de poblacions, s'han dut a terme dins del nostre grup de recerca, el Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona. Aquests estudis han permès conèixer l'estructura poblacional de l'espècie a gran escala geogràfica mitjançant el desenvolupament de marcadors moleculars de dos tipus. Els marcadors proteics, els al·lozims, i els marcadors de DNA mitocondrial específics per a la gamba rosada. Així, s'ha estudiat la variabilitat genètica de diverses poblacions que ha permès diferenciar les conques occidental, oriental dins el mar Mediterrani i d'aquelles poblacions de les aigües atlàntiques adjacents a l'estret de Gibraltar. També i durant la realització de la tesi doctoral de M.V. Fernández defensada el 2012, s'ha realitzat la filogeografia a escala mundial de dues gambes vermelles, la gamba rosada i el *xoriço*. Aquests estudis ens han permès conèixer els processos històrics que han donat lloc a la distribució actual de les dues espècies a la llum de les línies genealògiques dels gens mitocondrials i nuclears. A més, i en col·laboració amb investigadors de l'Institut de Ciències del Mar de Barcelona, s'ha estudiat la variabilitat genètica seguint el gradient de distribució vertical d'una única localitat i s'ha caracteritzat genèticament aquest gradient utilitzant un marcador de DNA mitocondrial, el gen 16S rDNA.

## PER QUÈ ALS GENETISTES ENS INTERESSA

**LA GAMBA DE PALAMÓS?** Així mateix, la gamba rosada és l'espècie marina explotada més important de la costa catalana, gràcies a la seva elevada repercussió econòmica tant en el sector pesquer com en el de la restauració a les comarques del litoral, principalment a les comarques gironines. Durant l'any 2012 els pescadors de la Confraria de Palamós van pescar 74 tones de gamba rosada amb un valor total a subhasta de 2,1 milions d'euros. Atesa l'elevada demanda i les fluctuacions que durant els darrers anys han presentat les captures d'aquest decàpode, la Confraria de Palamós ha implantat una veda de pesca de 60 dies l'any (BOE, 2013) per tal de garantir la sostenibilitat del recurs pesquer a llarg termini. Aquesta mesura, que té caràcter preventiu, és pionera a Catalunya i servirà d'exemple a d'altres confraries gironines, catalanes i d'altres costes, per a afavorir que la majoria dels individus arribin a les mides reglamentàries. En aquests moments, la Generalitat de Catalunya planeja posar en marxa un pla de gestió integral de la gamba rosada al litoral català, amb la participació de totes les institucions implicades en la seva explotació. Per tal d'implementar un pla de gestió integral, s'han de tenir en compte, a l'hora de redactar-lo, els aspectes fonamentals, tals com els aspectes biològics, econòmics i sociològics de l'espècie.

No obstant això, el principal problema biològic en la gestió integral d'una pesqueria és la identificació d'unitats de gestió, anomenades estocs genètics. Així doncs, per a identificar els estocs genètics de la gamba rosada és imprescindible conèixer el grau d'aïllament genètic o connectivitat entre els estocs explotats. El transport i la dispersió larvària causada pels sistemes de corrents és un factor determinant per a la connectivitat poblacional de moltes espècies marines. Des d'un punt de vista oceanogràfic, tota la costa del Mediterrani nord-occidental, des del golf de Lleó fins al golf de València, està influenciada pel Corrent del Nord o Corrent Liguprovençal, que circula en direcció nord - sud. No obstant això, fins a dia d'avui, es desconeix la connectivitat entre els caladors gironins pròxims com són el del Port de la Selva, Palamós i Blanes. Si les gambes durant les primeres fases del desenvolupament (larves) poden ésser arrossegades pels corrents en direcció nord - sud, és útil fer la veda a Palamós si les gambes migren fins a Blanes i allà es desenvolupen fins a la talla adulta? O els adults que es pesquen a Palamós són les gambes que han nascut al Port de la Selva? Dissenyar un pla de gestió acurat i complet amb la finalitat de conservar la gamba de Palamós a casa nostra haurà de tenir en compte aquests possibles escenaris i només les eines genètiques podran donar resposta a aquestes preguntes. Per això és necessària l'aplicació de noves tècniques genètiques de DNA, no disponibles fins al moment, com són els marcadors microsatèl·lits, els quals han demostrat ser de gran utilitat en la identificació d'estocs en crustacis marins d'arreu del món.

**ELS MICROSATÈL·LITS** Els marcadors microsatèl·lits, també anomenats SSR (*short sequence repeat*), són seqüències de DNA que es troben en el genoma de tots els organismes eucariotes, formades per un motiu de repetició d'entre 2 i 6 bases nitrogenades (nucleòtids de DNA), el qual està repetit en tàndem de 5 a 50 vegades. Aquests marcadors presenten dues característiques importants, són codominants, la qual cosa vol dir que s'expressen per igual

els 2 al·lels de l'individu i són altament polimòrfics, que implica la presència de més d'un al·lel per *locus*. També tenen una elevada taxa de mutació que s'estima en  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  per *locus* per generació, a causa de l'acumulació d'errors produïts durant la replicació del DNA, que originen els múltiples al·lels diferents d'un *locus*. Cadascun d'aquests al·lels es caracteritza per presentar un nombre determinat de repeticions del motiu bàsic, així doncs, els al·lels difereixen en longitud.

No obstant això, errors diversos durant la polimerització donen lloc a situacions particulars: a) microsatèl·lit imperfecte: es dona per una mutació a l'atzar d'una base del motiu de repetició, b) microsatèl·lit interromput: es dona per addició o pèrdua d'una base dins el motiu de repetició i c) microsatèl·lit compost: són aquells microsatèl·lits que presenten més d'un motiu diferent de repetició. Dependent de la llargada del motiu de repetició, que pot ser de 2 a 6 nucleòtids, els microsatèl·lits es classifiquen en: dinucleòtids (motiu de repetició format per dues bases nitrogenades), trinucleòtids (motiu de repetició format per tres bases nitrogenades), tetranucleòtids (motiu de repetició format per quatre bases nitrogenades), pentanucleòtids (motiu de repetició format per cinc bases nitrogenades) i hexanucleòtids (motiu de repetició format per sis bases nitrogenades).

L'origen de l'elevada taxa de mutació d'aquests marcadors moleculars és causada per un fenomen anomenat aparellament desigual de les cadenes, en què per error durant la síntesi, la cadena de DNA motlle se separa de la cadena de DNA que s'està formant de nou. Aquesta separació pot comportar un mal aparellament de bases entre les dues cadenes de DNA al reiniciar-se la replicació. Si la cadena de DNA que s'ha aparellat malament és la del DNA sintetitzat de nou, l'al·lel de nova formació tindrà més unitats de repetició que l'al·lel del DNA motlle. Per contra, si la cadena de DNA que s'ha aparellat malament és la del DNA motlle, el resultat serà la pèrdua d'unitats de repetició de l'al·lel nou.

## QUI SOM I ON FEM

**LA NOSTRA RECERCA** Aquesta recerca sobre la gamba rosada s'ha dut a terme al Laboratori d'Ictiologia Genètica que es troba al Departament de Biologia de la Facultat de Ciències de la Universitat de Girona.



Facultat de Ciències ubicada al campus Montilivi de la Universitat de Girona.

Foto: María Inés Roldán

L'equip de recerca que ha dut a terme tot el treball està constituït per tres investigadores, especialitzades en genètica, l'estudiant de doctorat de la UdG Laia Planella, la Dra. Sandra Heras i la Dra. MI Roldán. També hem tingut el plaer de gaudir de la participació, durant les fases de treball de laboratori, de la *Laureata* Ilaria Caldarazzo durant la seva estada d'investigació dins el nostre equip de recerca.



Equip de recerca que ha realitzat el treball corresponent a la Beca Cooperativa la Equitativa 2013-2014 concedida per l'Ajuntament de Palamós.

D'esquerra a dreta: Laia Planella, Maria Inés Roldán i Sandra Heras.

Foto: Laia Planella.

**ELS NOSTRES OBJECTIUS** Els objectius d'aquesta recerca són a) identificar i seleccionar nous marcadors genètics moleculars denominats microsatèl·lits per a la gamba rosada. Aquest marcadors de DNA s'han dissenyat especialment per a la gamba rosada a partir de l'anàlisi bioinformàtica del seu genoma, b) desenvolupar un nombre mínim de microsatèl·lits polimòrfics per a la gamba rosada. Aquesta recerca és un pas necessari i fonamental per a posteriorment, en un futur proper, desenvolupar les reaccions d'amplificació múltiples (*PCR múltiple*), les quals permetran conèixer els genotips d'una elevada quantitat d'individus en un període de temps curt i, tal com s'ha mencionat anteriorment, conèixer la connectivitat entre les poblacions locals.



## ASPECTES METODOLÒGICS

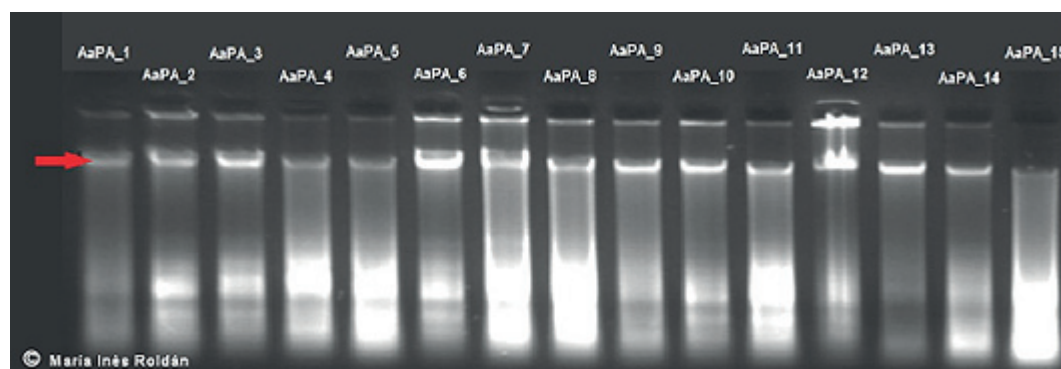
### Tractament bioinformàtic dels fragments de DNA de la gamba rosada

Durant l'any 2012 i dins del projecte AGL2009-09228 finançat pel *Ministerio de Ciencia e Innovación*, es va realitzar, per primera vegada en la gamba rosada, la *Next Generation Sequencing* (NGS) seguint la tecnologia de piroseqüenciació 454 de *Life Science Corporation* (seqüenciador GS Junior de Roche). La NGS és una tècnica moderna d'anàlisi del genoma, és a dir, que permet conèixer en més detall el DNA total de l'espècie que s'ha analitzat. Aquesta tècnica genera aproximadament uns 150.000 fragments de DNA d'entre 100 i 1.000 parells de bases denominats *reads*, en un total de 56 milions de parells de bases a partir d'una sola reacció de seqüenciació.

Seguidament i partint del conjunt total de fragments trobats, s'emprà un programari informàtic per a cercar possibles marcadors microsatèl·lits. Posteriorment, es dissenyaren els iniciadors *forward* i *reverse* de cadascun dels microsatèl·lits seleccionats utilitzant un altre programari informàtic. El disseny dels iniciadors es realitzà en base a ambdues seqüències adjacents al microsatèl·lit, les quals són regions conservades del genoma.

Després de tot aquest procés, els microsatèl·lits candidats a validar al laboratori foren 97. La validació és el procés de laboratori pel qual es comprova que els microsatèl·lits seleccionats informàticament en realitat amplifiquen mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Per a realitzar aquest procés s'elaborà un disseny experimental que assegurés que els resultats obtinguts fossin el més òptims possible. Aquest disseny es mostra a la figura 4 i, com es pot observar a la pàgina següent, és un procés complex amb molts passos. El primer pas va consistir a realitzar l'extracció de DNA de cada individu sobre el qual es va realitzar tot el procés posterior.

**EXTRACCIÓ DE DNA** La validació dels microsatèl·lits seleccionats informàticament es va realitzar en individus adults recol·lectats a la localitat de Palamós. A cadascun d'ells se'ls va treure un tros de teixit muscular que es va conservar en etanol 95% al Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona fins al moment de l'extracció del DNA. L'extracció de DNA es realitza a partir d'un petit fragment de teixit i consisteix a extreure el DNA total del conjunt de cèl·lules del teixit. Per a l'extracció de DNA es va seguir el protocol clàssic de fenol - cloroform. Posteriorment es va comprovar que totes les extraccions de DNA s'havien realitzat correctament.



**Gel de comprovació de l'extracció de DNA dels 15 individus frescos de gamba rosada (des d' AaPA\_1 fins a AaPA\_15). Les bandes indicades amb la fletxa vermella corresponen al DNA extret de cada individu.**

Foto: María Inés Roldán.

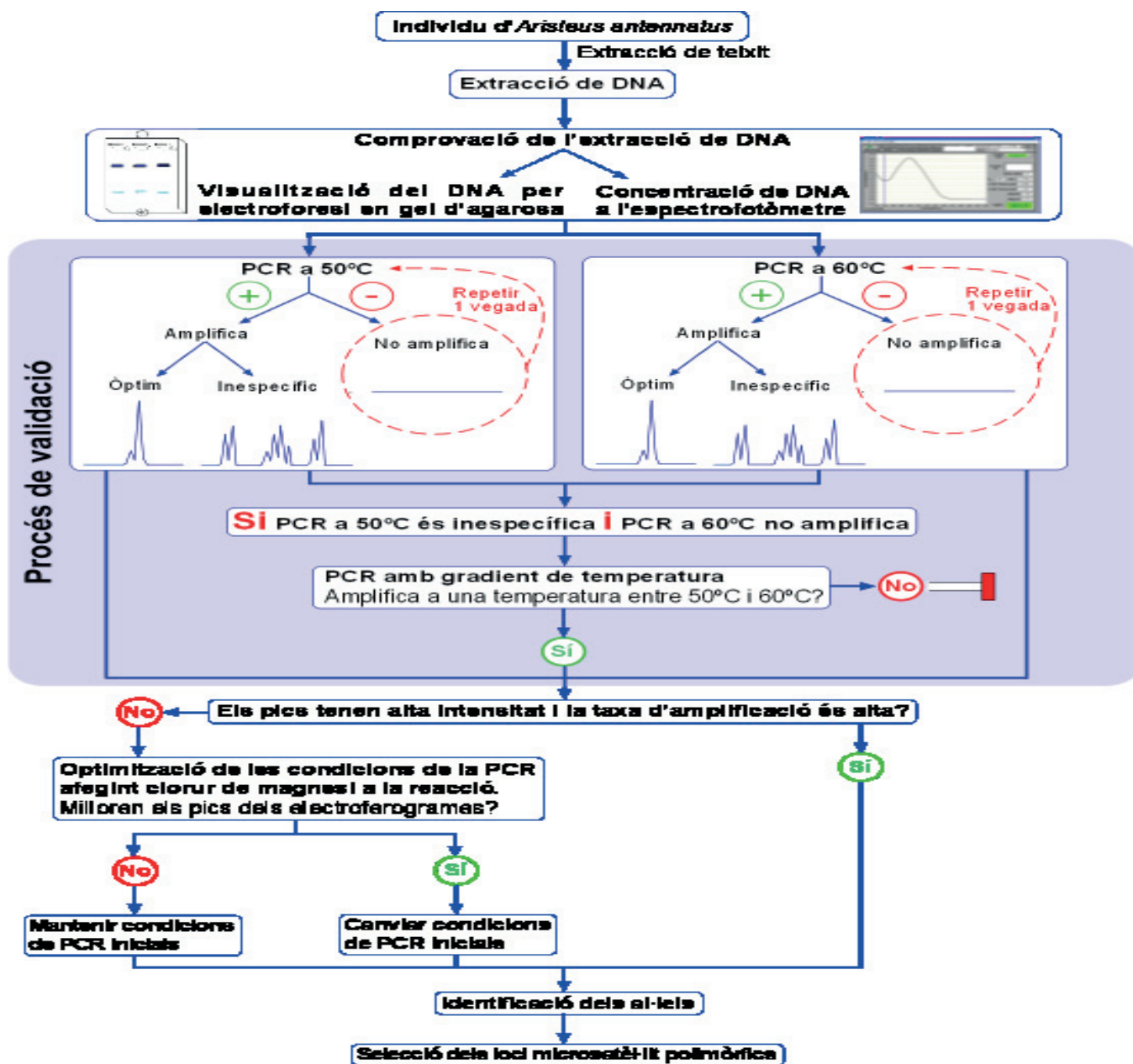


Figura 4. Disseny experimental seguit per a la validació dels microsatèl·lits putatius en la gamba rosada, *Aristeus antennatus*.

Font: Laia Planella.

## PROCÉS DE VALIDACIÓ

**DELS MICROSATÈL·LITS** Per a dur a terme el procés de validació, s'utilitzà la tècnica desenvolupada per l'investigador americà Kary B. Mullis a principis dels anys 80 que es denomina: reacció en cadena de la polimerasa i per la qual va guanyar el premi Nobel de Química el 1993. Aquesta reacció permet generar una gran quantitat de còpies d'un fragment concret del genoma per posteriorment poder-lo visualitzar i analitzar mitjançant una electroforesi capil·lar d'alta resolució. Aquesta electroforesi separa els fragments de DNA que difereixen entre ells en el nombre de bases nitrogenades, és a dir, els diferents al·lels.



Visió general dels termocicladors del Laboratori d'Ictiologia Genètica de la UdG on s'han dut a terme les diverses reaccions en cadena de la polimerasa per a amplificar el DNA.

Font: Laia Planella.

## IDENTIFICACIÓ DELS AL·LELS DE CADA MICROSATÈL·LIT

**AMPLIFICAT** De cadascun dels microsatèl·lits amplificats correctament, es va definir la pauta de lectura dels al·lels amb l'objectiu d'etiquetar-los correctament i evitar sobreestimar la variabilitat al·lèlica de cada microsatèl·lit. Per fer-ho se seguiren els següents passos:

1. Visualitzar tots els electroferogrames per a un determinat microsatèl·lit.
2. Observar si la forma dels pics dels al·lels era constant en els electroferogrames de tots els individus analitzats.
3. Si la forma dels pics no variava, s'escollia el pic més alt com a al·lel. Per contra, si la forma del pic era molt variable, si s'observava inversió de pics o el pic més alt no era sempre el mateix, s'escollia per consens el primer o el segon pic començant per la dreta, però sempre es mantenia la mateixa pauta de lectura al llarg d'aquell microsatèl·lit concret.
4. Assignar un valor numèric a cada al·lel.
5. Fer recompte del nombre d'al·lels diferents per a aquell microsatèl·lit.

**ELS NOSTRES RESULTATS** Els resultats de les reaccions en cadena de la polimerasa a 50°C i a 60°C de cadascun dels 97 microsatèl·lits putatius es van llegir amb un programari informàtic específic. Segons el nombre de pics presents a l'electroferograma i la claredat amb la qual aquests es podien llegir, es va classificar cada microsatèl·lit en alguna de les següents tres categories:

**1. No amplifica:** quan no s'observaven pics a l'electroferograma.

**2. Inespecífic:** quan s'observaven més de dos pics a l'electroferograma i per tant, no es podien identificar els dos al·lels presents de cada individu. Les gambes només poden tenir un màxim de dos al·lels diferents, dels quals un prové del pare i l'altre de la mare. Si el pare i la mare presenten el mateix al·lel, aleshores només es visualitzarà un pic.

**3. Amplifica:** quan s'observaven un o dos pics a l'electroferograma de cada individu que corresponien als al·lels per a aquell microsatèl·lit.

Dels 97 microsatèl·lits putatius validats a 50°C i a 60°C, 46 microsatèl·lits van amplificar correctament, 41 microsatèl·lits foren inespecífics ja que presentaven pics difosos i amb molt soroll de fons i 10 microsatèl·lits no van amplificar ja que presentaven resultat negatiu després d'haver-se testat dues vegades a cada temperatura.

Dels 46 microsatèl·lits que van amplificar correctament, 15 presentaven una temperatura òptima d'hibridació dels iniciadors a 50°C i els restants 31 microsatèl·lits a 60°C. D'aquest total de 46 microsatèl·lits, 6 microsatèl·lits presentaven un al·lel, 11 microsatèl·lits dos al·lels, 14 microsatèl·lits tres al·lels, 8 microsatèl·lits quatre al·lels i 7 microsatèl·lits més de quatre al·lels. Per tant, atès que els microsatèl·lits útils per a l'anàlisi poblacional són els que presenten dos o més al·lels en total, s'han seleccionat 40 microsatèl·lits optimitzats per a la gamba rosada.

**CAP ON ANEM** Els 40 microsatèl·lits polimòrfics resultants d'aquest estudi, dissenyats, desenvolupats i optimitzats específicament per a la gamba rosada, serviran de base per al muntatge de diverses PCR *multiplex*. Les PCR *multiplex* són amplificacions de diversos microsatèl·lits simultàniament en una mateixa reacció de PCR. Per tant, les PCR *multiplex* faran possible l'assignació del genotip d'un individu per a diversos microsatèl·lits inclosos alhora en una única reacció. Aquesta moderna metodologia presenta dos avantatges importants: 1) per una banda abaratir costos de reactius de laboratori quan el nombre d'individus a analitzar és molt elevat i 2) per l'altra, accelerar tot el procés experimental de cada individu analitzat.

Per tant, a partir d'ara centrarem el nostre esforç en el desenvolupament de les PCR *multiplex*. Les que se'n derivin d'aquest estudi seran el punt de partida per a futurs estudis genètics de la gamba rosada, per tal de determinar el grau de connectivitat entre els diferents caladors explotats a les comarques gironines tals com el Port de la Selva, Palamós i Blanes.

Conèixer la genètica poblacional a escala local de la gamba rosada, *Aristeus antennatus*, al llarg de la seva distribució geogràfica serà possible aplicant els marcadors microsatèl·lits que s'han desenvolupat, testat i seleccionat en aquest estudi.

Tot el treball realitzat servirà per a millorar la gestió de les pesqueries de gamba rosada i mantenir el recurs pesquer al llarg dels anys amb el fi de garantir la seva sostenibilitat a la Confraria de Palamós. El nostre recurs marí més preuat s'ho mereix! ■

Setembre de 2014