

Genetic characterization, based on microsatellite loci, of *Solea senegalensis* (Soleidae, Pleuronectiformes) in Atlantic coast populations of the SW Iberian Peninsula

Caracterización genética mediante microsatélites de *Solea senegalensis* (Soleidae, Pleuronectiformes) en poblaciones naturales de la costa atlántica del suroeste de la Península Ibérica

E Díaz-Ferguson^{1,3}, I Cross¹, M Barrios¹, A Pino², J Castro², C Bouza², P Martínez², L Rebordinos^{1*}

¹ Laboratorio de Genética, Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias del Mar, Polígono Río San Pedro s/n, Puerto Real 11510 Cádiz, Spain.

² Departamento de Genética, Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria, 27002 Lugo, Spain.

³ Present address: Department of Biology, University of Florida, Gainesville FL, 32611-8525, USA.

*Corresponding author. E-mail: laureana.rebordinos@uca.es

ABSTRACT. The Senegalese sole, *Solea senegalensis*, is an important commercial flatfish species with major fisheries located off the Atlantic coast of the SW Iberian Peninsula. Past information about the genetic structure and connectivity among natural populations of this species has been restricted to mitochondrial DNA analysis. The present analysis of eight natural Atlantic populations fished from Lisbon to the Gulf of Cádiz, using nine microsatellite loci, identifies high intrapopulation genetic variability. Out of 72 tests performed, a total of 19 statistically significant deviations from Hardy-Weinberg (H-W) expectations (24%), and 7 after Bonferroni corrections (9%), were observed in the populations examined. Most deviations from H-W expectations were caused by heterozygote deficiencies (positive *Fis* values) attributed to null alleles predominantly occurring in two loci (*Sol GA12* and *Sol MIJ*) and one population (Río San Pedro). Pairwise genetic differentiation among populations was only found in comparisons involving Río San Pedro samples (five out of seven comparisons) and Barbate samples (two out of seven comparisons). The observed genetic structure complements existing information from mitochondrial data and should contribute to future management of fisheries of this species, since some fisheries are not environmentally sustainable.

Key words: flatfish fisheries, genetic characterization, microsatellites, sole, *Solea senegalensis*.

RESUMEN. El lenguado senegalés, *Solea senegalensis*, es una especie de pez plano importante desde el punto de vista comercial, cuyas pesquerías principales están localizadas en las costas atlánticas del suroeste de la Península Ibérica. La información existente sobre la estructura genética y conectividad entre poblaciones naturales de esta especie es muy reducida y está limitada a la utilización de marcadores de ADN mitocondrial. Este trabajo presenta el análisis de ocho poblaciones naturales del Atlántico situadas entre Lisboa y el golfo de Cádiz, usando nueve *loci* microsatélites, mediante los que se detecta una alta variabilidad genética intrapoblacional. De un total de 72 pruebas realizadas, 19 mostraron desviaciones estadísticamente significativas de las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (24%) y 7 después de aplicar las correcciones de Bonferroni (9%) en las poblaciones analizadas. La mayoría de las desviaciones en las poblaciones fueron debidas al déficit de heterocigotos (valores de *Fis* positivos) atribuidos a alelos nulos observados principalmente en dos *loci* (*Sol GA12* y *Sol MIJ*) y una población (Río San Pedro). Solamente se detectó diferenciación genética entre parejas de poblaciones que incluían muestras de Río San Pedro (cinco de siete comparaciones) y Barbate (dos de siete comparaciones). La estructura genética observada complementa la información existente con datos mitocondriales y debería contribuir a la futura gestión de pesquerías de esta especie, puesto que algunas pesquerías no son ambientalmente sostenibles.

Palabras clave: pesquerías de peces planos, caracterización genética, microsatélites, lenguado, *Solea senegalensis*.

INTRODUCTION

Solea senegalensis (Kaup 1858) is a common inshore flatfish occurring off the Atlantic coast, from northern Senegal to Perthuis Charantais (France), and in the Mediterranean Sea, from the Strait of Gibraltar to the coast of Tunisia. The Senegalese sole is a gonochoric species, well adapted to warm climates, and commonly raised in extensive earthen ponds along the southern coast of Portugal and Spain.

INTRODUCCIÓN

Solea senegalensis (Kaup 1858) es un pez plano común que se encuentra en la costa atlántica desde el norte de Senegal hasta Perthuis Charantais (Francia) y en el mar Mediterráneo desde el estrecho de Gibraltar hasta la costa de Túnez. El lenguado senegalés es una especie gonocórica, bien adaptada a climas cálidos, y comúnmente criada en extensos estanques de tierra en la costa sur de Portugal y

In this region, it is considered the most important commercial species due to its high economic value and the high quality of its flesh (Imsland *et al.* 2003, APROMAR 2010). This species reaches sexual maturity between three and four years of age (Cabral *et al.* 2007). Spawning takes place in estuarine zones where the fish live for about two years before the larvae migrate to inshore areas characterized by sandy bottoms (Dinis *et al.* 1999). Since spawning grounds are distant from the nursery areas, transport of eggs and larvae is an important issue. Like other fish with pelagic development, physical factors (currents, depth, temperature, salinity boundaries, hydrodynamic eddies, and sea floor topography) and biological factors (predation and competition) exert strong influences on the distribution and genetic structure of its populations (Wegner *et al.* 2003). In addition, anthropogenic factors such as pollution, habitat degradation, and overfishing also impact fish distribution and population structure (Mustafa 1999, Cabral *et al.* 2007).

The study of genetic structure and connectivity of marine populations is essential for understanding their evolutionary potential, fitness, and sustainability; however, despite much previous work, there is little knowledge about the connectivity among the habitats occupied by this species, covering its entire distribution range (Feral 2002, Vinagre *et al.* 2008). In flatfishes, several markers have been applied to study genetic structure and connectivity: these include isoenzymes, blood proteins, random amplified polymorphic DNA fragments, microsatellites, and amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) (Bouza *et al.* 2002, Guarniero *et al.* 2002, Exadactylos *et al.* 2003, Florin and Höglund 2007, Garoia *et al.* 2007). Despite similar life-history patterns among flatfish species, contrary results have been obtained in terms of gene flow, genetic diversity, and genetic differentiation (Borsa *et al.* 1997, Garoia *et al.* 2007).

Different patterns of differentiation have been observed at different geographical scales within species. For instance, the absence of genetic differentiation in the turbot from Atlantic populations contrasts with significant divergence observed in the Baltic Sea (Bouza *et al.* 2002, Nielsen *et al.* 2004). Differences have also been reported in the population structure among demersal and pelagic spawners of the European flounder (Florin and Höglund 2008).

Genetic studies in *S. senegalensis* have previously been performed using allozymes and mitochondrial DNA (mtDNA) (Díaz-Ferguson *et al.* 2002, 2007; Cabral *et al.* 2003; Díaz-Ferguson 2004). Results from mtDNA-restriction fragment length polymorphism (RFLP) studies have indicated low genetic diversity and high differentiation among populations of the SW Iberian Peninsula and Gulf of Cádiz, particularly off the Portuguese coast; these results suggest that this species displays homing behavior (Díaz-Ferguson *et al.* 2007) and that genetic structure is absent and connectivity is elevated within the Gulf of Cádiz area.

Although microsatellite sequences have been developed and tested in cultured and wild individuals, to date no

España. En esta región, es considerada la especie de mayor importancia comercial por su alto valor económico y la elevada calidad nutricional de su carne (Imsland *et al.* 2003, APROMAR 2010). Esta especie alcanza la madurez sexual entre los tres y cuatro años de edad (Cabral *et al.* 2007). Los peces desovan en zonas estuarinas donde permanecen durante unos dos años antes de que las larvas migren a zonas costeras caracterizadas por fondos arenosos (Dinis *et al.* 1999). En vista de que las zonas de desove se encuentran alejadas de las zonas de crianza, el transporte de huevos y larvas es un aspecto importante. Al igual que en otros peces pelágicos, factores físicos (corrientes, profundidad, temperatura, límites de salinidad, giros hidrodinámicos y topografía del fondo marino) y biológicos (depredación y competencia) ejercen una gran influencia en la distribución y estructura genética de sus poblaciones (Wegner *et al.* 2003). Además, factores antropogénicos como la contaminación, degradación de hábitat y sobrepesca también afectan la distribución de peces y la estructura poblacional (Mustafa 1999, Cabral *et al.* 2007).

El estudio de la estructura genética y la conectividad de las poblaciones marinas es esencial para comprender el potencial evolutivo, la salud y la sostenibilidad de éstas; sin embargo, a pesar de mucho trabajo previo, existe poco conocimiento acerca de la conectividad entre los hábitats ocupados por esta especie a través de su distribución geográfica (Feral 2002, Vinagre *et al.* 2008). En peces planos, se han aplicado varios marcadores para estudiar la estructura genética y conectividad, incluyendo isoenzimas, proteínas sanguíneas, fragmentos de ADN polimórfico amplificados al azar, microsatélites y polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) (Bouza *et al.* 2002, Guarniero *et al.* 2002, Exadactylos *et al.* 2003, Florin y Höglund 2007, Garoia *et al.* 2007). A pesar de patrones de historia de vida similares entre las especies de peces planos, se han obtenido resultados opuestos en cuanto al flujo de genes y la diferenciación y diversidad genética (Borsa *et al.* 1997, Garoia *et al.* 2007).

Se han observado diferentes patrones de diferenciación a diversas escalas geográficas entre especies. Por ejemplo, la falta de diferenciación genética en el rodaballo de las poblaciones del Atlántico contrasta con la alta divergencia observada en el mar Báltico (Bouza *et al.* 2002, Nielsen *et al.* 2004). Asimismo, se han documentado diferencias en la estructura poblacional entre los desovadores demersales y pelágicos de la platija europea (Florin y Höglund 2008).

Los estudios genéticos en *S. senegalensis* se han desarrollado usando alozimas y ADN mitocondrial (ADNmt) (Díaz-Ferguson *et al.* 2002, 2007; Cabral *et al.* 2003; Díaz-Ferguson 2004). Los resultados de estudios de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) del ADNmt han mostrado una baja diversidad genética y alta diferenciación entre poblaciones del suroeste de la Península Ibérica y el golfo de Cádiz, especialmente en la costa portuguesa; los resultados sugieren que esta

population genetic studies based on these markers have been carried out in wild populations of *S. senegalensis* (Funes *et al.* 2004, Castro *et al.* 2006, Porta *et al.* 2006). This study is the first application of these highly variable nuclear markers to wild populations of this species, at micro spatial scale, across one of the most important fishery areas for the species, with the object of contributing to its future fisheries management, some of these fisheries being considered not environmentally sustainable (Baeta *et al.* 2005).

MATERIAL AND METHODS

Samples and DNA extraction

A total of 265 adults of *S. senegalensis* were taken from two Portuguese and six Spanish populations located in the Gulf of Cádiz (fig. 1). Sampling sites were chosen because they represent the species' main distribution areas. The Tagus Estuary is a nursery area for *S. senegalensis* (Vasconcelos *et al.* 2010). Fish from this location (Lisbon) and Portimão were purchased directly from commercial fishing vessels after confirming the origin of the fish. Six sampling sites

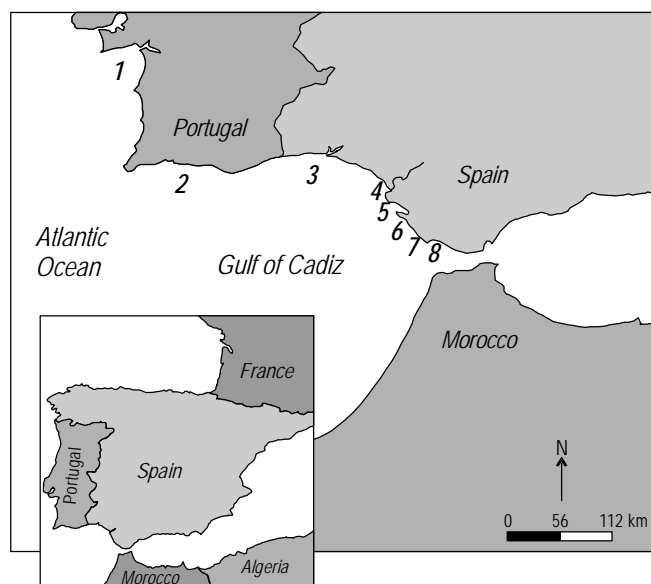


Figure 1. Geographical location of eight populations of *Solea senegalensis* from the Atlantic coast of the SW Iberian Peninsula: (1) Lisbon (38°30' N, 9° W), (2) Portimão (37° N, 8°30' W), (3) Punta Umbria, (4) Chipiona, (5) Valdelagrana, (6) Río San Pedro, (7) Cádiz, and (8) Barbate. Populations 3, 4, 5, 6, 7, and 8 are located within the Gulf of Cádiz (area between Cape Santa María [37° N, 8° W] and Cape Trafalgar [36°10' N, 6° W]).

Figura 1. Localización geográfica de ocho poblaciones de *Solea senegalensis* de la costa Atlántica del suroeste de la Península Ibérica: (1) Lisboa (38°30' N, 9° W), (2) Portimão (37° N, 8°30' W), (3) Punta Umbria, (4) Chipiona, (5) Valdelagrana, (6) Río San Pedro, (7) Cádiz y (8) Barbate. Las poblaciones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se localizan dentro del golfo de Cádiz (área entre los cabos de Santa María [37° N, 8° W] y Trafalgar [36°10' N, 6° W]).

especie muestra un comportamiento “hogareño” (*homing behavior*) (Díaz-Ferguson *et al.* 2007) y que la estructura genética está ausente y la conectividad es alta dentro del área del golfo de Cádiz.

A pesar de que secuencias microsatelitales han sido desarrolladas y probadas en individuos cultivados y salvajes, a la fecha no se han realizado estudios genéticos poblacionales con base en estos marcadores en poblaciones naturales de *S. senegalensis* (Funes *et al.* 2004, Castro *et al.* 2006, Porta *et al.* 2006). Este estudio es el primero en aplicar estos marcadores nucleares muy variables a poblaciones naturales de esta especie, a microescala espacial, en una de las principales zonas pesqueras de esta especie, con el objetivo de contribuir a la futura gestión de sus pesquerías, ya que algunas pesquerías existentes no se consideran ambientalmente sostenibles (Baeta *et al.* 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y extracción de ADN

Se recolectaron un total de 265 adultos de *S. senegalensis* de dos poblaciones portuguesas y seis españolas localizadas en el golfo de Cádiz (fig. 1). Los sitios de muestreo se seleccionaron porque representan las principales áreas de distribución de la especie. El estuario del Tago es una zona de crianza de *S. senegalensis* (Vasconcelos *et al.* 2010). Los ejemplares de este sitio (Lisboa) y Portimão fueron adquiridos directamente de barcos pesqueros comerciales después de confirmar el origen de los peces. Se establecieron seis sitios de muestreo en la costa de España, dada sus características conocidas. Esta zona es parte del golfo de Cádiz y es influenciada por la corriente superficial del Atlántico; el efecto de tal corriente aumenta debido a su proximidad al estrecho de Gibraltar, el cual promueve un flujo de agua importante entre el océano Atlántico y el mar Mediterráneo. Además, la topografía de la costa puede representar una barrera física entre las poblaciones. La población 3 fue muestreada por E Díaz-Ferguson durante un crucero científico, mientras que las poblaciones 4, 5, 6, 7 y 8 fueron muestreadas durante cruceros contratados para este proyecto.

El ADN se obtuvo de una muestra pequeña de la aleta caudal, usando el procedimiento con resina Chelex 100 (Walsh *et al.* 1991).

Amplificación de loci microsatélites y genotipado

Las secuencias de los cebadores y las temperaturas de fusión de los nueve loci microsatélites se tomaron de la base de datos GenBank (Coughlan *et al.* 1996, Iyengar *et al.* 2000, Funes *et al.* 2004, Porta y Alvarez 2004) (tabla 1). Se realizaron reacciones en cadena de la polimerase en una mezcla de 15 µL conteniendo 30 ng de ADN genómico total, 1.5 mM de MgCl₂, 0.1 mM de dNTP, 1 µM de cada partidor, 0.5 unidades de AmpliTaq Gold DNA Polymerase y 1×

were established for the Spanish coast, given its known characteristics. This area is part of the Gulf of Cádiz and it is influenced by the Atlantic surface current; the effect of this current is increased due to its proximity to the Strait of Gibraltar, which promotes significant water flow between the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. In addition, the topography of the coast can represent physical barriers between populations. Population 3 was sampled during a scientific cruise by E Díaz-Ferguson. Populations 4, 5, 6, 7, and 8 were obtained on sampling cruises contracted for the project.

DNA was obtained from a small sample of the caudal fin, using the Chelex 100 resin procedure (Walsh *et al.* 1991).

Amplification of microsatellite loci and genotyping

Primer sequences and annealing temperatures of nine microsatellite loci were taken from GenBank accessions (Coughlan *et al.* 1996, Iyengar *et al.* 2000, Funes *et al.* 2004, Porta and Alvarez 2004) (table 1). Polymerase chain reactions were performed in a reaction mix of 15 μ L containing 30 ng of total genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP, 1 μ M forward and reverse primer, 0.5 units of AmpliTaq Gold DNA Polymerase, and 1 \times polymerase buffer (supplied by the manufacturer). Amplifications were performed as follows: pre-denaturation at 95 °C for 10 min, followed by

de amortiguador de polimerasa (proporcionado por el fabricante). Las amplificaciones se llevaron a cabo según el siguiente programa: predenaturación a 95 °C por 10 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 45 s, 50 s a la temperatura de fusión específica, y extensión a 72 °C por 50 s; la extensión final se realizó a 72 °C por 10 min. El tamaño de los fragmentos de los loci microsatélites se determinó en un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). El tamaño de los alelos se determinó por comparación con un estándar interno de peso molecular de 500 pares de bases (pb) y el programa GeneScan Analysis Software 3.7. Los genotipos de cada *locus* se formatearon según programas estadísticos específicos para su posterior análisis.

Variabilidad genética y expectativas de Hardy-Weinberg

Se estimaron la frecuencia de alelos, el número de alelos (N_a), y la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) por *locus* por población y la heterocigosidad total (H_t) con el programa de cómputo GENETIX 4.01 (Belkhir *et al.* 2001). Se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis (SYSTAT 11.0) para determinar las diferencias en los parámetros de diversidad genética (valores promedio de alelos, H_e y H_o entre los *loci*) entre las poblaciones. Para evaluar la conformidad con las expectativas de Hardy-Weinberg (H-W) por población y *locus*, se realizaron pruebas exactas con el método de la

Table 1. Locus, GenBank access number, repeat motif, primer sequence, and melting temperature (MT) of each of the nine microsatellites used in this study of *Solea senegalensis*.

Tabla 1. *Locus*, número de acceso en GenBank, motivo de repetición, secuencia de los cebadores y temperatura de fusión (MT) de cada uno de los nueve microsatélites usados en este estudio con *Solea senegalensis*.

Locus	GenBank access	Repeat motif	Primer sequence (5'–3')	MT
<i>Sol 9A</i>	AF441389	(CA) ₉ (GA) ₉	F 5' TCTCGTCGAGTCAAATGTCC 3' R 5' CTCAGAATAAAGCTCGTTTAGC 3'	59 °C
<i>Smax-02</i>	Coughlan <i>et al.</i> (1996)	(TG) ₁₆	F 5' GGAGGATGTATTGAAAGTGT 3' R 5' AGAGCAGGTCATTATACAGC 3'	56 °C
<i>Sol 13D</i>	AF441385	(GT) ₁₂	F 5' GATCATTAGAGAGGTCACACGAGC 3' R 5' CATGACATCATCGCAGACC 3'	59 °C
<i>Sol 19A</i>	AF441387	(GT) ₁₂	F 5' GATCCTCTGTGCCACGACGTTGG 3' R 5' GATCTGGCCGAGAGCAGATGC 3'	59 °C
<i>Sol MIJ</i>	AF441392	(CA) ₁₅	F 5' TCCTTTCTTTAAGCCCTCTGG 3' R 5' CATCCAAGGATACTCAGACTGC 3'	57 °C
<i>F13-II8/4/7</i>	AF173849	(TG) ₈ CGC(GT) ₄ (GA) ₇	F 5' GGCTGCAGAACGATCTTTAC 3' R 5' GCAACCTTGAGCTGTGACC 3'	61 °C
<i>Sol GA12</i>	AF441391	(GA) ₁₉	F 5' GATCCGCTTGGGGTGAGG 3' R 5' TGCCATACTTCACTTGTTTCG 3'	59 °C
<i>Sol MII</i>	AY426693	(CTG) ₁₀	F 5' TCAAAGCAGTCGTCCTCAGG 3' R 5' ACGAGGTAGGTGAAAAGCTGC 3'	56 °C
<i>SseGATA38</i>	AB177534	(GATA) ₂₀	F 5' ATATCATCAGGCAGTAAAACGGTCGCAAATG3' R 5' GCAATCTGCAAACCTGACCACTAGATGCCAGT3'	59 °C

35 cycles at 94 °C for 45 s, 50 s at the specific annealing temperature, and 50 s at 72 °C for extension; a final elongation step of 10 min at 72 °C was performed. Microsatellite fragment sizes were determined using a DNA ABI Prism 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems). Allele sizes were obtained by comparison with a 500 base pair (bp) molecular weight internal size standard and GeneScan Analysis Software 3.7. Genotypes for each locus were then formatted to specific statistical software for further analysis.

Genetic variability and Hardy-Weinberg expectations

Estimates of allele frequency, number of alleles (N_a), and observed and expected heterozygosity (H_o and H_e , respectively) per locus per population and total heterozygosity (H_t) were calculated using the computer program GENETIX 4.01 (Belkhir *et al.* 2001). Kruskal-Wallis tests (SYSTAT 11.0) were performed to check for differences in genetic diversity parameters (mean values of alleles, H_e and H_o among loci) between populations. To assess conformance to Hardy-Weinberg (H-W) expectations by population and locus, exact tests were performed using the Markov-Chain method implemented in GENEPOP 3.1 software (Raymond and Rousset 1995). The Markov-Chain parameters used were 5000 steps and a de-memorization value of 1000. A global test across loci within populations was applied using Fisher's method. F_{is} estimates for checking the magnitude and sign of deviations at each locus were obtained following Weir and Cockerham (1984) by using FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995). Tests for the presence of null alleles and scoring errors were made with MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004). Bonferroni adjustment was applied to multiple comparisons (Rice 1989).

Genetic differentiation among populations

Exact probability tests were performed to check for homogeneity between all sample pairs and across all samples and loci using GENEPOP 3.1 (Raymond and Rousset 1995). The relative components of genetic diversity (global F -statistics) were calculated using FSTAT 2.9.3: G_{st} (Nei 1987) and R_{st} (Slatkin 1995) based on the infinite alleles model and the stepwise mutation model, respectively. To test for genetic differentiation between locations, pairwise F_{st} was calculated, and the significance of results was checked by permutation tests using FSTAT 2.9.3. In addition, the level of structure was also tested by an estimation of the population number (K) using the software STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000). The program was run with six independent replicates for K (i.e., distinct populations or gene pools with K set from one to eight). The burn-in period was 10,000 replicates followed by 50,000 Monte Carlo simulations run in a model that assumed no admixture and independent allele frequencies. The most probable number of groups was determined using the method proposed by Evanno *et al.* (2005).

cadena de Markov implementado en el programa GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset 1995). Los parámetros de la cadena de Markov fueron 5000 pasos y un valor de demorización de 1000. Se realizó una prueba global de los *loci* dentro de las poblaciones con el método de Fisher. Las estimaciones de F_{is} para examinar la magnitud y el signo de las desviaciones en cada *locus* fueron obtenidas siguiendo a Weir y Cockerham (1984) con FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995). Se realizaron pruebas para la presencia de alelos nulos y errores de puntuación con MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004). Se aplicó el ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice 1989).

Diferenciación genética entre las poblaciones

Se realizaron pruebas de probabilidad exacta para determinar la homogeneidad entre todos los pares de muestras y en todas las muestras y los *loci* mediante GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset 1995). Los componentes relativos de la diversidad genética (prueba estadística global F) fueron calculados con FSTAT 2.9.3: G_{st} (Nei 1987) y R_{st} (Slatkin 1995) con base en el modelo de alelos infinitos y el modelo de pasos (*stepwise*), respectivamente. Para determinar la diferenciación genética entre sitios, se calculó F_{st} por pares, y la significación de los resultados se probó mediante pruebas de permutación con FSTAT 2.9.3. Además, también se examinó el nivel de estructura mediante una estimación del número de población (K) con el programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000). El programa se corrió con seis réplicas independientes para K (i.e., poblaciones distintas o grupos de genes con K de uno a ocho). El periodo de descarte fue 10,000 réplicas seguido de 50,000 simulaciones de Monte Carlo en un modelo que supone que no hay mezclas y frecuencias de alelos independientes. El número más probable de grupos se determinó mediante el método propuesto por Evanno *et al.* (2005).

Las relaciones genéticas entre sitios se visualizaron mediante un dendrograma del vecino más próximo (*neighbor-joining*; Saitou y Nei 1987) generado mediante el programa POPULATIONS 1.2.28, con 1000 réplicas de remuestreo (*bootstrapping*) (Langella 1999, obtenido de www.pge.cnrs-gif.fr/bioinfo/populations). Las réplicas se obtuvieron de la matriz de distancia genética Da (Nei 1987, Takezaki y Nei 1996).

RESULTADOS

Diversidad genética y expectativas de Hardy-Weinberg

De las 72 pruebas realizadas, 19 mostraron desviaciones significativas de las expectativas de H-W y 7 de éstas persistieron después de aplicar la corrección de Bonferroni (no se muestran los datos). La mayoría de las 19 desviaciones se debieron a un déficit de heterocigotos (tabla 2; F_{is} promedio = 0.076 ± 0.021), asociado principalmente con los *loci*

Genetic relationships among sites were visualized using a neighbor-joining dendrogram (Saitou and Nei 1987) generated with the POPULATIONS 1.2.28 software, using 1000 bootstrapping replications (Langella 1999, downloaded from www.pge.cnrs-gif.fr/bioinfo/populations). Bootstrapping replications were obtained from the *Da* genetic distance matrix (Nei 1987, Takezaki and Nei 1996).

RESULTS

Genetic diversity and Hardy-Weinberg expectations

Out of the 72 tests performed, there were 19 significant deviations from H-W expectations, and 7 of these 19 persisted after Bonferroni correction (data not shown), and were due mostly to heterozygote deficiency (table 2; mean $Fis = 0.076 \pm 0.021$). These deviations were associated mainly with the loci *Sol GA12* ($Fis = 0.135 \pm 0.022$) and *Sol MIJ* ($Fis = 0.119 \pm 0.040$), and were particularly high in the Río San Pedro population (mean $Fis = 0.188 \pm 0.072$); 66.7% of the tests were significant in this population (table 2, appendix). MICROCHECKER analysis revealed the presence of null alleles in different loci, but mainly in those that presented heterozygote deficiency (*Sol GA12* and *Sol MIJ*). The analysis showed that the Río San Pedro sample had the highest number of loci with null alleles (*Sse 38*, *Sol 9A*, *Sol MII*, *Sol MIJ*, and *Sol GA12*). With respect to genotyping errors, MICROCHECKER suggested a stuttering error in *Sse 38* in the Río San Pedro sample.

High genetic variability, both in the number of alleles and heterozygosity per locus, was observed at the nine microsatellites analyzed after the genetic characterization of 265 individuals from eight natural populations. A mean of 14.65 ± 0.62 alleles per locus per population was obtained

Sol GA12 ($Fis = 0.135 \pm 0.022$) y *Sol MIJ* ($Fis = 0.119 \pm 0.040$), y fueron particularmente altas en la población de Río San Pedro (Fis promedio = 0.188 ± 0.072); 66.7% de las pruebas fueron significativas en esta población (tabla 2, apéndice). El análisis con MICROCHECKER mostró la presencia de alelos nulos en diferentes *loci*, pero principalmente en los que presentaron un déficit de heterocigotos (*Sol GA12* y *Sol MIJ*), e indicó que la muestra de Río San Pedro tenía el mayor número de *loci* con alelos nulos (*Sse 38*, *Sol 9A*, *Sol MII*, *Sol MIJ* y *Sol GA12*). Con respecto a los errores de genotipado, el análisis sugirió un error de tartamudeo en el *locus Sse 38* de la muestra de Río San Pedro.

Se observó una alta variabilidad genética, tanto del número de alelos y la heterocigosidad por *locus*, en los nueve microsatélites analizados después de la caracterización genética de 265 individuos de ocho poblaciones naturales. Se obtuvo un promedio de 14.65 ± 0.62 alelos por *locus* por población (tablas 2, 3). El número de alelos varió de 9 en *Sol 19* a 68 en *Sol MJI*, la mayoría de los *loci* mostrando entre 20 y 30 alelos. Se observaron diferencias ligeras y no significativas ($P > 0.05$) en el número de alelos entre poblaciones; el valor más bajo correspondió a la muestra de Río San Pedro (11.22) y los valores más altos a las poblaciones portuguesas (16.11 y 17.00 para Portimão y Lisboa, respectivamente). Las diferencias entre la heterocigosidad esperada de cada población no fueron significativas y variaron de 0.8 a 0.9 para la mayoría de los *loci*, con un promedio de 0.860 ± 0.005 por *locus* por población.

Diferenciación genética entre las poblaciones

Se observó una diferenciación genética reducida pero significativa ($P < 0.001$) para todos los *loci* y para sus

Table 2. Summary of genetic parameters by population. Intrapopulation genetic diversity estimates and standard errors (in parentheses) using nine microsatellite loci in eight natural populations of *Solea senegalensis*. *N*: sample size; *Na*: mean number of alleles per locus and population; *Np*: number of private alleles; *Ho*: mean observed heterozygosity; *He*: mean expected heterozygosity; *Fis*: mean *Fis* estimate per population and significance.

Tabla 2. Resumen de los parámetros genéticos por población. Estimaciones de la diversidad genética intrapoblacional y errores estándar (entre paréntesis) con nueve *loci* microsatélites en ocho poblaciones naturales de *Solea senegalensis*. *N*: tamaño de muestra; *Na*: número medio de alelos por *locus* y población; *Np*: número de alelos privados; *Ho*: heterocigosidad media observada; *He*: heterocigosidad media esperada; *Fis*: estimación media de *Fis* por población y significación.

Population	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Np</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>
1. Lisbon	33	17.00 (2.67)	7	0.809 (0.048)	0.872 (0.027)	0.065***
2. Portimão	31	16.11 (2.10)	11	0.858 (0.078)	0.877 (0.022)	0.018
3. Punta Umbria	40	14.22 (1.76)	10	0.781 (0.077)	0.864 (0.022)	0.091***
4. Chipiona	26	15.77 (2.21)	22	0.811 (0.098)	0.892 (0.021)	0.089**
5. Valdelagrana	29	13.77 (1.66)	7	0.783 (0.078)	0.863 (0.022)	0.087**
6. Río San Pedro	55	11.22 (1.74)	1	0.674 (0.175)	0.840 (0.016)	0.194***
7. Cádiz Bay	21	14.22 (1.76)	11	0.833 (0.114)	0.869 (0.027)	0.044**
8. Barbate	30	14.88 (1.73)	10	0.837 (0.115)	0.854 (0.097)	0.015**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Table 3. Analysis of genetic diversity based on nine microsatellite loci in eight natural populations of *Solea senegalensis*.**Tabla 3.** Análisis de la diversidad genética basada en nueve *loci* microsatélites en ocho poblaciones naturales de *Solea senegalensis*.

Locus	<i>Na</i>	Allelic size (bp)	<i>Ht</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Gst</i>	<i>Rst</i>	<i>P</i>
<i>Sol 9A</i>	21	201–262	0.857	0.719	0.854	0.004	0.001	0.025
<i>Smax-02</i>	24	81–132	0.846	0.753	0.836	0.013	0.018	0.000
<i>Sol 13D</i>	20	116–158	0.893	0.872	0.892	0.001	0.014	0.406
<i>Sol 19A</i>	9	133–149	0.723	0.741	0.720	0.004	0.012	0.100
<i>Sol MIJ</i>	68	220–334	0.952	0.831	0.942	0.010	0.004	0.000
<i>F1318/4/7</i>	36	170–310	0.900	0.810	0.906	0.000	0.005	0.180
<i>Sol GA12</i>	55	72–190	0.925	0.797	0.920	0.005	0.013	0.000
<i>Sol MII</i>	17	133–187	0.866	0.861	0.863	0.003	0.008	0.049
<i>Sse 38</i>	30	130–250	0.863	0.801	0.860	0.004	0.021	0.003
Overall			0.870	0.798	0.866	0.005	0.009	<0.001
Error			0.022	0.018	0.022	0.001	0.003	

Na: number of alleles per locus; *Ht*: total heterozygosity; *Ho*: observed heterozygosity; *He*: expected intrapopulation heterozygosity; *Gst*: Nei's genetic differentiation index; *Rst*: estimate of interpopulation differentiation under a stepwise mutation model; *P*: probability values of the exact tests to check for homogeneity of gene frequencies among populations.

(tables 2, 3). The number of alleles ranged from 9 at *Sol 19* to 68 at *Sol MIJ*, most loci ranging between 20 and 30 alleles. Slight and non-significant ($P > 0.05$) differences were observed in the number of alleles among populations, with the lowest value in the Río San Pedro sample (11.22) and the highest values in the Portuguese populations (16.11 and 17.00 for Portimão and Lisbon, respectively). Differences between expected heterozygosity of each population were non-significant and ranged from 0.8 to 0.9 for most loci, with a mean of 0.860 ± 0.005 per locus per population.

Genetic differentiation between populations

Reduced but significant ($P < 0.001$) genetic differentiation was observed both for all loci and for their overall averages ($Rst = 0.009$ and $Gst = 0.005$) across populations (table 3); however, pairwise *Fst* comparisons only showed slight but significant values for comparisons involving the Barbate and, especially, the Río San Pedro populations (table 4). No evidence of separation was found between the Portuguese and Gulf of Cádiz populations. This was reflected in the consensus unrooted tree, based on genetic distances *Da*; the tree showed long branches for all populations, and low or moderate bootstrap rooting for most groupings. This consensus unrooted tree did not show any specific geographical trend; only two geographically close populations, Bay of Cádiz and Chipiona, constituted a moderately supported group (bootstrap value = 76%) (fig. 2). However, the estimation of *K* (number of populations) using STRUCTURE 2.2 failed to find any group structure in the analyzed data, and their values ($K = 1$) corroborated the existence of a single panmictic population for the species, extending along the entire length of the Iberian Peninsula coast covered by the study.

promedios globales ($Rst = 0.009$ y $Gst = 0.005$) en todas las poblaciones (tabla 3); sin embargo, las comparaciones de pares de *Fst* sólo mostraron valores pequeños pero significativos para las comparaciones incluyendo las poblaciones de Barbate y, particularmente, Río San Pedro (tabla 4). No se encontró evidencia de separación entre las poblaciones de Portugal y el golfo de Cádiz. Esto se reflejó en el árbol de consenso sin raíz, basado en las distancias genéticas *Da*; el árbol mostró ramas largas para todas las poblaciones, y una robustez baja o moderada para la mayoría de las agrupaciones. Este árbol de consenso sin raíz no mostró ninguna tendencia geográfica específica; sólo dos poblaciones geográficamente cercanas, bahía de Cádiz y Chipiona, constituyeron un grupo razonablemente robusto (valor de remuestreo = 76%) (fig. 2). No obstante, la estimación de *K* (número de poblaciones) con el programa STRUCTURE 2.2 no encontró ninguna estructura grupal en los datos analizados, y los valores ($K = 1$) corroboraron la existencia de una sola población panmictica para la especie, extendiéndose a lo largo de la costa de la Península Ibérica cubierta por el estudio.

DISCUSIÓN

Variabilidad genética y expectativas de Hardy-Weinberg

La diversidad genética proporciona estimaciones precisas del grado de salud y sostenibilidad de las poblaciones marinas (Díaz-Ferguson *et al.* 2010). Los valores de diversidad genética por *locus* por población presentados aquí para *S. senegalensis* son similares a los documentados previamente para otras especies de peces planos como el rodaballo *Scophthalmus maximus* (Bouza *et al.* 2002), el lenguado

Table 4. Matrix of pairwise *Fst* values between populations^a.**Tabla 4.** Matriz de los valores de *Fst* al comparar pares de poblaciones^a.

Population	1-LB	2-PM	3-PU	4-CH	5-VA	6-SP	7-CA	8-BA
1-LB								
2-PM	-0.0002							
3-PU	0.0008	0.0016						
4-CH	-0.0010	-0.0017	0.0032					
5-VA	0.0068	-0.0023	0.0053	0.0590				
6-SP	0.0120*	0.0142*	0.0086*	0.0152	0.0187*			
7-CA	-0.0037	-0.0010	0.00893	-0.0031	0.0073	0.0065		
8-BA	0.0047	0.0000	0.0108**	0.032	0.059	0.1930***	0.0015	

^a 1-LB = Lisbon; 2-PM = Portimão; 3-PU = Punta Umbria; 4-CH = Chipiona; 5-VA = Valdelagrana; 6-SP = Río San Pedro; 7-CA = Cádiz Bay; 8-BA = Barbate.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

DISCUSSION

Genetic variability and Hardy-Weinberg expectations

Genetic diversity provides accurate estimates of the level of fitness and sustainability of marine stocks (Díaz-Ferguson *et al.* 2010). The values of genetic diversity per locus per population presented here for *S. senegalensis* are similar to those previously reported for other flatfish species such as the turbot *Scophthalmus maximus* (Bouza *et al.* 2002), Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Sekino and Hara 2001), plaice *Pleuronectes platessa* (Hourau *et al.* 2002), and European Dover sole *Solea solea* (Iyengar *et al.* 2000) using microsatellite loci. In addition, these values were homogeneous among Senegalese sole populations across the geographic range analyzed. Despite its estuarine condition, values of genetic diversity observed for *S. senegalensis* were similar to those reported in marine species according to the genetic diversity gradient related to habitat proposed by DeWoody and Avise (2000). These authors suggested that genetic diversity gradually increased from lower values in freshwater species to intermediate in estuarine ones, finally reaching its peak in marine species.

Marker choice obviously affects the genetic diversity observed in these populations. Previous genetic studies with isozymes and mtDNA segments found low genetic diversity for *S. senegalensis* in natural populations (Vega *et al.* 2002, Díaz-Ferguson 2004, Díaz-Ferguson *et al.* 2007) and cultured stocks (Díaz-Ferguson *et al.* 2002, Vega *et al.* 2002), as well as in other sole species such as the common sole *Solea vulgaris* (Kotoulas *et al.* 1995, Cabral *et al.* 2003). This could be explained by the existence of varied mutation rates among markers and intraspecific polymorphisms dependent on the number of nucleotide base pairs surveyed (Bouza *et al.* 2002, Díaz-Ferguson *et al.* 2007). A high proportion of significant departures from H-W equilibrium was detected in the

japonés *Paralichthys olivaceus* (Sekino y Hara 2001), la platija *Pleuronectes platessa* (Hourau *et al.* 2002) y el lenguado común *Solea solea* (Iyengar *et al.* 2000) usando loci microsatélites. Además, estos valores resultaron homogéneos entre las poblaciones del lenguado senegalés a través de la extensión geográfica analizada. A pesar de su condición estuarina, los valores de diversidad genética registrados para *S. senegalensis* fueron similares a los documentados para especies marinas de acuerdo con el gradiente de diversidad genética relacionado con el hábitat propuesto por DeWoody y Avise (2000). Estos autores sugieren que la diversidad genética incrementa gradualmente de valores menores en especies de agua dulce, a intermedios en especies estuarinas, a máximos en especies marinas.

El marcador seleccionado obviamente afecta la diversidad genética observada en estas poblaciones. Estudios previos con isozimas y segmentos de ADNmt encontraron una diversidad genética baja para *S. senegalensis* en poblaciones naturales (Vega *et al.* 2002, Díaz-Ferguson 2004, Díaz-Ferguson *et al.* 2007) y cultivadas (Díaz-Ferguson *et al.* 2002, Vega *et al.* 2002), así como en otras especies de lenguado como *Solea vulgaris* (Kotoulas *et al.* 1995, Cabral *et al.* 2003). Esto se podría atribuir a la existencia de diversas tasas de mutación entre los marcadores y los polimorfismos intraespecíficos dependiendo del número de pares de bases de nucleótidos examinados (Bouza *et al.* 2002, Díaz-Ferguson *et al.* 2007). En las poblaciones estudiadas se detectó una proporción alta de desviaciones significativas del equilibrio de H-W (26.4%, $P < 0.05$; 9.7% después de aplicar la corrección de Bonferroni). La mayoría de las desviaciones se debieron al déficit de heterocigotos y, a pesar de estar esparcidas a través de diferentes loci y poblaciones (todos los valores promedio de *Fis* de los loci y las poblaciones fueron positivos), estas desviaciones estuvieron particularmente asociadas con dos loci (*Sol GA12* y *Sol MIJ*) y una población (Río San Pedro). Se ha observado un déficit de heterocigotos

populations studied (26.4%, $P < 0.05$; 9.7% after Bonferroni correction). Most deviations were due to heterozygote deficit, and although they were scattered across different loci and populations (all mean F_{is} across loci and populations were positive), these deviations appeared to be particularly associated with two loci (*Sol GA12* and *Sol MIJ*) and one population (Río San Pedro). The existence of heterozygote deficit in other flatfish with estuarine behavior has been reported, for example, in *P. platessa* (Hourau *et al.* 2002), *Solea lascaris*, and *S. solea* (Kotoulas *et al.* 1995, Pinheiro *et al.* 2005). The high incidence of heterozygote deficit at specific loci (*Sol GA12*: mean $F_{is} = 0.135$; *Sol MIJ*: mean $F_{is} = 0.120$) could indicate the presence of null alleles at moderate frequencies, as has been confirmed by the MICROCHECKER analysis. Castro *et al.* (2006) found evidence of the presence of null alleles at locus *Sol GA12* using family data, which is considered the soundest approach for addressing this issue. The same authors reported technical difficulties at *Sol MIJ*, which presented three overlapping allelic series differing by 1 bp in some stretches. In this case, it was not possible to prove that there were genotyping errors at heterozygotes for consecutive alleles differing by 1 bp because the MICROCHECKER analysis showed only stutter bands in the *Sse 38* locus in one sample (Río San Pedro). At the population level, the high and heterogeneous heterozygote deficits among loci in the Río San Pedro samples ($F_{is} = 0.188$) could be explained by the presence of null alleles in several loci.

Genetic differentiation among populations

Overall genetic differentiation in *S. senegalensis* was low but significant, based on global relative estimators of genetic divergence ($G_{st} = 0.005$; $R_{st} = 0.009$). Among populations, slight but significant differentiation was observed in specific pairwise comparisons, particularly in the Río San Pedro population, which showed significant F_{st} values with respect to most populations, and also in the Barbate population, which was significantly differentiated from the other two populations. Highly significant genetic heterogeneity of allelic frequencies among samples was also demonstrated in our study by means of exact tests ($P < 0.001$), in agreement with the presence of a large number of private alleles, especially in the Chipiona population.

The use of absolute measures of divergence for highly variable markers, such as microsatellites, has been recommended because relative measures of differentiation between populations are dependent on the extent of within-population diversity (Hedrick 1999). Moderate but substantial genetic distance figures were observed between all population pairs (mean $Da = 0.1897 \pm 0.0059$) in Senegalese sole, much higher than observed in other flatfish in a similar geographic range (Bouza *et al.* 2002). In fact, the dendrogram obtained from genetic distances showed long branches without any geographic trend. It appears that populations of this species show some degree of isolation, but also a high degree of

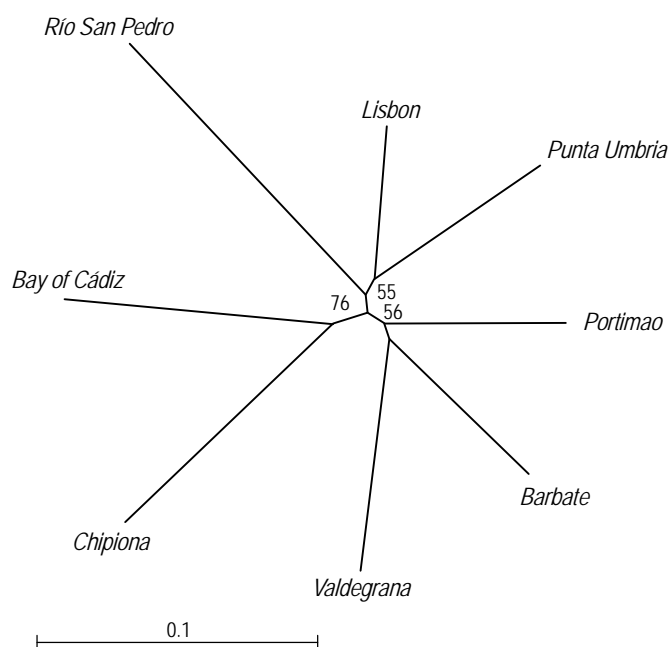


Figure 2. Visualization of genetic relationships among the analyzed sites using the neighbor-joining (N-J) algorithm (Saitou and Nei 1987) based on genetic distances Da (Nei 1987). Branch lengths are proportional to the amount of change, and N-J bootstrap values are based on 1000 replicates. Only bootstrap values higher than 50% are represented.

Figura 2. Visualización de las relaciones genéticas entre los sitios analizados mediante el algoritmo del vecino más cercano (Saitou y Nei 1987) con base en las distancias genéticas Da (Nei 1987). La longitud de las ramas son proporcionales a la cantidad de cambio y los valores de remuestreo se basan en 1000 réplicas. Sólo se presentan los valores de remuestreo $>50\%$.

en otros peces planos con comportamiento estuarino, como por ejemplo *P. platessa* (Hourau *et al.* 2002), *Solea lascaris* y *S. solea* (Kotoulas *et al.* 1995, Pinheiro *et al.* 2005). La alta incidencia del déficit de heterocigotos en loci específicos (*Sol GA12*: F_{is} promedio = 0.135; *Sol MIJ*: F_{is} promedio = 0.120) podría indicar la presencia de alelos nulos a frecuencias moderadas, como ha sido confirmado mediante el análisis con MICROCHECKER. Castro *et al.* (2006) encontraron evidencia de la presencia de alelos nulos en el locus *Sol GA12* utilizando datos de familia, considerado el mejor enfoque para abordar esta cuestión. Los mismos autores documentaron dificultades técnicas para *Sol MIJ*, que presentó tres series alélicas solapadas difiriendo por 1 pb en algunas partes. En este caso, no fue posible comprobar que hubo errores de genotipado en los heterocigotos para alelos consecutivos difiriendo por 1 pb ya que el análisis con MICROCHECKER mostró sólo bandas de tartamudeo en el locus *Sse 38* de una muestra (Río San Pedro). A nivel poblacional, los déficits altos y heterogéneos entre los loci de las muestras de Río San Pedro ($F_{is} = 0.188$) podrían ser explicados por la presencia de alelos nulos en varios loci.

exchange of migrants with one or more other populations in a random way. It is possible that the effect of the Atlantic surface current flow promotes enough gene flow to homogenize allelic frequencies among the majority of the populations analyzed, but without any trend by geography. The discrepancy observed between relative and absolute figures could be explained by the high intrapopulation heterozygosity figures found in our study (close to 0.90), which would limit the reliability of these figures for revealing significant relative differentiation, as has been suggested for highly variable loci (Hedrick 1999).

Previous population studies on the Senegalese sole have suggested the existence of a panmictic model for Portuguese estuarine systems, with a slight differentiation between the Lisbon and Gulf of Cádiz populations; one previous study also suggests a lack of apparent genetic structure among populations of the Gulf of Cádiz region (Díaz-Ferguson *et al.* 2007). The low genetic differentiation observed here would be mostly in accordance with the population structure of the common sole, *S. solea*, in which Atlantic populations ranging from Denmark to Portugal are considered representative of a single panmictic unit (Rolland *et al.* 2007). Nevertheless, comparative analysis of AFLP and SSR markers in Mediterranean *S. vulgaris* populations has revealed contradictory differentiation data, showing genetic homogeneity among Adriatic and Tyrrhenian samples with microsatellite markers, but highly significant *Fst* values with AFLP markers (Garoia *et al.* 2007). In other inshore flatfish species like the Japanese flounder *P. olivaceus*, similar *Fst* values have been found for species that inhabit coastal areas of the same range of the Gulf of Cádiz (Sekino and Hara 2001). Despite the small *Fst* values, these authors suggested that populations of this species do not represent a single panmictic population, since pairwise comparisons indicated significant differences for at least one locus and one population. Thus, in our micro-scale study (based on finer scale markers), the integrated analysis of global and pairwise data using absolute and relative estimators of genetic divergence pointed to the existence of slight but significant genetic differentiation. The present study did not support previous mtDNA data that suggested the genetic separation between Portuguese and Gulf of Cádiz populations of Senegalese sole (Díaz-Ferguson *et al.* 2007). On the contrary, microsatellite results support the existence of panmixia for the Iberian Peninsula. The existence of sex-differential migration rates, lower in females than in males, could partially explain the discrepancy between mitochondrial and nuclear markers.

In conclusion, the results obtained in this study showed low global genetic differentiation and absence of genetic structure for Senegalese sole; these are similar to the results of previous studies conducted on other marine flatfish species distributed along the Iberian Peninsula coast. The existence of a single panmictic unit demonstrated that these results should be considered for future management and conservation plans for the species throughout its distributional range.

Diferenciación genética entre las poblaciones

La diferenciación genética en *S. senegalensis* fue baja pero significativa, con base en estimadores relativos globales de divergencia genética ($Gst = 0.005$; $Rst = 0.009$). Entre las poblaciones se observó una diferenciación ligera pero significativa en las comparaciones por pares, especialmente para la población de Río San Pedro, la cual mostró valores significativos de *Fst* con respecto a la mayoría de las poblaciones, así como para la población de Barbate, la cual se diferenció significativamente de las otras dos poblaciones. En el presente estudio también se demostró una heterogeneidad genética altamente significativa en las frecuencias alélicas entre las muestras mediante pruebas de exactitud ($P < 0.001$), coincidiendo con la presencia de un gran número de alelos privados, especialmente en la población de Chipiona.

Se ha recomendado el uso de medidas absolutas de divergencia para marcadores altamente variables, como los microsatélites, ya que las medidas relativas de diferenciación entre poblaciones dependen del grado de diversidad intrapoblacional (Hedrick 1999). Se observaron cifras moderadas pero sustanciales de la distancia genética entre todos los pares poblacionales (Da promedio = 0.1897 ± 0.0059) para el lenguado senegalés, mucho más altas que las documentadas para otros peces planos con una distribución geográfica similar (Bouza *et al.* 2002). De hecho, el dendrograma obtenido a partir de las distancias genéticas mostró ramas largas sin ninguna tendencia geográfica. Aparentemente las poblaciones de esta especie muestran algún grado de aislamiento, pero también un alto grado de intercambio de migrantes con una o más poblaciones de forma aleatoria. Es posible que el efecto de la corriente superficial del Atlántico promueva suficiente flujo de genes para homogeneizar las frecuencias alélicas entre la mayoría de las poblaciones analizadas, pero sin ninguna tendencia geográfica. La discrepancia observada entre los valores relativos y absolutos puede ser explicada por los altos valores de heterocigosidad intrapoblacional registrados en este estudio (cerca de 0.90), lo cual limitaría la fiabilidad de estas cifras para mostrar una diferenciación relativa significativa, como ha sido sugerido para *loci* muy variables (Hedrick 1999).

Estudios poblacionales anteriores del lenguado senegalés han sugerido la existencia de un modelo panmítico para los sistemas estuarinos de Portugal, con una ligera diferenciación entre las poblaciones de Lisboa y el golfo de Cádiz; un estudio previo también muestra la ausencia de una estructura genética aparente entre las poblaciones de la región del golfo de Cádiz (Díaz-Ferguson *et al.* 2007). La baja diferenciación genética observada aquí concuerda más con la estructura poblacional del lenguado común, *S. solea*, en donde las poblaciones del Atlántico desde Dinamarca hasta Portugal se consideran representativas de una sola unidad panmítica (Rolland *et al.* 2007). No obstante, un análisis comparativo de marcadores AFLP y SSR en las poblaciones mediterráneas de *S. vulgaris* arrojó datos de diferenciación contradictorios,

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author would like to thank the International Spanish Cooperation Agency (AECI) for the PhD grant made available during the first three years of research. The authors also thank the OPAM (INTERREG IIIA) project for technical and logistic support during the last year of research, and FM Utter and C Figiel Jr. for their comments and suggestions for drafting the final version of this article.

REFERENCES

- APROMAR. 2010. Informe APROMAR. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos, www.apromar.es.
- Baeta F, Pinheiro P, Corte-Real M, Costa J, de Almeida P, Cabral H, Costa M. 2005. Are the fisheries in Tagus sustainable? *Fish. Res.* 76: 243–251.
- Borsa P, Blanquer A, Barrebi P. 1997. Genetic structure of the flounder *Platichthys flesus* and *P. stellatus* at different geographic scales. *Mar. Biol.* 129: 233–246.
- Bouza C, Presa P, Castro J, Sánchez M, Martínez P. 2002. Allozyme and microsatellite diversity in natural and domestic populations of turbot (*Scophthalmus maximus*) in comparison with other pleuronectiforms. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 1460–1473.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 2001. Genetix: Logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS (France) UPR 9060. Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Cabral H, Castro F, Linhares D, Alexandrinho P. 2003. Genetic differentiation of *Solea solea* (Linnaeus 1758) and *Solea senegalensis* Kaup 1858 (Pisces: Pleuronectiformes) from several estuarine systems of the Portuguese coast. *Sci. Mar.* 67: 43–52.
- Cabral NH, Vasconcelos RP, Vinagre C, Franc A, Fonseca S, Maia V, Reis-Santos A, Lopes P, Ruano M, Campos M, Freitas J, Santos V, Costa MJ. 2007. Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast. *J. Sea Res.* 57: 209–217.
- Castro J, Pino A, Hermida M, Bouza C, Rianza A, Ferreiro I, Sanchez L, Martínez P. 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.
- Coughlan J, McCarthy E, McGregor D, O'Donoghue P, Galvin P, Fitzgerald R, Daemen E, Imsland A, Stefansson S, Cross T. 1996. Four polymorphic microsatellites in turbot *Scophthalmus maximus*. *Anim. Genet.* 27: 441.
- DeWoody JA, Avise JC. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56: 461–473.
- Díaz-Ferguson E. 2004. Development of genetic markers and genetic structure of natural populations of *Solea senegalensis* (Soleidae, Pleuronectiformes) from the Gulf of Cádiz (in Spanish). PhD thesis, University of Cádiz, Spain. 118 pp.
- Díaz-Ferguson E, Vega L, Cross I, Rebordinos L. 2002. Genetic characterization of a stock of breeders of *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes: Soleidae) using haemoglobin and transferrin. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France.
- Díaz-Ferguson E, Cross I, Barrios MM, Rebordinos L. 2007. Genetic relationships among populations of the Senegalese sole *Solea senegalensis* in the southwestern Iberian Peninsula
- mostrando una homogeneidad genética entre las muestras de los mares Adriático y Tirreno con marcadores microsatélites, pero valores de *Fst* altamente significativos con marcadores AFLP (Garoia *et al.* 2007). En otros peces planos costeros como el lenguado japonés *P. olivaceus*, se han encontrado valores similares de *Fst* para especies que habitan zonas costeras en el mismo rango del golfo de Cádiz (Sekino y Hara 2001). A pesar de los valores bajos de *Fst*, estos autores sugieren que las poblaciones de esta especie no representan una sola población panmíctica, ya que las comparaciones por pares mostraron diferencias significativas para por lo menos un *locus* y una población. Así, en nuestro estudio a microescala (con marcadores de escala más fina), el análisis integrado de datos globales y de pares con estimadores absolutos y relativos de divergencia genética indicó la existencia de una diferenciación genética ligera pero significativa. Este estudio no apoya previos datos de ADNmt que sugieren una separación genética entre las poblaciones de Portugal y el golfo de Cádiz del lenguado senegalés (Díaz-Ferguson *et al.* 2007). Al contrario, los resultados apoyan la existencia de panmixia para la Península Ibérica. La existencia de diferentes tasas de migración por sexo, menor para hembras que machos, podría explicar parcialmente la discrepancia entre los marcadores mitocondriales y nucleares.
- En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio mostraron una baja diferenciación genética global y ausencia de una estructura genética para el lenguado senegalés. Estos resultados son similares a los de estudios previos realizados con otros peces planos distribuidos en la costa de la Península Ibérica. La existencia de una sola unidad panmíctica demostró que estos resultados deberían ser tomados en cuenta para futuros planes de manejo y conservación para la especie en toda su distribución geográfica.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor recibió una beca doctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) durante los primeros tres años de la investigación. Los autores agradecen el apoyo técnico y logístico proporcionado por el proyecto OPAM (INTERREG IIIA) durante el último año de estudio, y a FM Utter y C Figiel Jr. sus comentarios y sugerencias para la versión final del artículo.

Traducido al español por Christine Harris.

detected by mitochondrial DNA-restriction fragment length polymorphisms. *Trans. Am. Fish. Soc.* 136: 484–491.

Díaz-Ferguson E, Haney RA, Wares JP, Silliman BR. 2010. Population genetics of a trochid gastropod broadens picture of Caribbean Sea connectivity. *PLoS ONE* 5: e12675.

Dinis MT, Ribeiro L, Soares F, Sarasquete C. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176: 27–38.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol. Notes* 14: 2611–2620.

- Exadactylos A, Geffen A, Panagiotaki P, Thorpe J. 2003. Population structure of Dover sole *Solea solea*: RAPD and allozyme data indicate divergence in European stocks. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 246: 253–264.
- Feral JP. 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268: 121–145.
- Florin AB, Höglund J. 2007. Absence of population structure of turbot (*Psetta maxima*) in the Baltic Sea. *Mol. Ecol.* 16: 115–126.
- Florin AB, Höglund J. 2008. Population structure of flounder (*Platichthys flesus*) in the Baltic Sea: Differences among demersal and pelagic spawners. *Heredity* 101: 27–38.
- Funes V, Zuasti E, Catanese G, Infante C, Machado M. 2004. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Mol. Ecol. Notes* 4: 339–341.
- Garoia F, Guarniero I, Grifoni D, Marzola S, Tinti F. 2007. Comparative analysis of AFLP and SSRs efficiency in resolving population genetic structure of Mediterranean *Solea vulgaris*. *Mol. Ecol.* 16: 1377–1387.
- Goudet J. 1995. *Fstat* (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86: 485–486.
- Guarniero I, Franzellitti S, Ungaro N, Tommasini S, Piccinetti C, Tinti F. 2002. Control region haplotype variation in the central Mediterranean common sole indicates geographical isolation and population structuring in Italian stocks. *J. Fish Biol.* 60: 1459–1474.
- Hedrick PW. 1999. *Genetics of Populations*. Jones & Bartlett Publishers, London. 658 pp.
- Hourau G, Rijnsdorp D, Van Der Veer HW, Stam T, Olsen JL. 2002. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: Microsatellites revealed large-scale spatial and temporal homogeneity. *Mol. Ecol.* 11: 1165–1176.
- Imsland AK, Foss A, Conceição LEC, Dinis MT, Delbare D, Schram E, Kamstra A, Rema P, White P. 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish Biol. Fish.* 13: 379–407.
- Iyengar A, Piyapattanakorn S, Stone D. 2000. Identification of microsatellite repeats in turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dover sole (*Solea solea*) using a RAPD-based technique: Characterization of microsatellite markers in Dover sole. *Mar. Biotechnol.* 2: 49–56.
- Kotoulas G, Bonhomme F, Borsa P. 1995. Genetic structures of the common sole *Solea vulgaris* at different geographic scales. *Mar. Biol.* 122: 361–375.
- Langella O. 1999. Populations 1.2.28. Centre National de la Recherche Scientifique (France) UPR9034. Available at <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/lea/index>.
- Mustafa S (ed.). 1999. *Genetics in Sustainable Fisheries Management*. Wiley-Blackwell, London, 223 pp.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 512 pp.
- Nielsen E, Nielsen P, Meldrup D, Hansen M. 2004. Genetic population structure of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) supports the presence of multiple hybrid zones for marine fishes in the transition zone between the Baltic Sea and the North Sea. *Mol. Ecol.* 13: 585–595.
- Pinheiro A, Teixeira CM, Rego AL, Marques JF, Cabral HN. 2005. Genetic and morphological variation of *Solea lascaris* (Risso 1810) along the Portuguese coast. *Fish. Res.* 73: 67–78.
- Porta J, Alvarez MC. 2004. Development and characterization of microsatellites from Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Mol. Ecol. Notes* 4: 277–279.
- Porta J, Porta JM, Martinez-Rodriguez G, Alvarez MC. 2006. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* 256: 159–166.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multi-locus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (Version 3.1): Population genetics software for exact test and ecumenecism. *J. Hered.* 86: 248–249.
- Rice WR. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- Rolland JL, Bonhomme F, Lagardere F, Hassan M, Guinand B. 2007. Population structure of the common sole (*Solea solea*) in the northeastern Atlantic and the Mediterranean Sea: Revisiting the divide with EPIC markers. *Mar. Biol.* 151: 327–341.
- Saitou N, Nei N. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- Sekino M, Hara M. 2001. Application of microsatellite markers to population genetics studies of Japanese flounder *Paralichthys olivaceous*. *Mar. Biotech.* 3: 572–589.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 89: 583–589.
- Takezaki N, Nei M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389–399.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. MICROCHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535–538.
- Vega L, Díaz-Ferguson E, Cross I, Rebordinos L. 2002. Caracterización citogenética e isoenzimática del lenguado *Solea senegalensis* Kaup 1858. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18: 245–250.
- Vasconcelos RP, Reis-Santos P, Maia A, Fonseca A, Fraça S, Wouters N, Costa MJ, Cabral HN. 2010. Nursery use patterns of commercially important marine fish species in estuarine systems along the Portuguese coast. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 86: 613–624.
- Vinagre C, Fonseca A, Maia A, Amara R, Cabral H. 2008. Habitat specific growth rates and condition indices for the sympatric soles *Solea solea* (Linnaeus 1758) and *Solea senegalensis* (Kaup 1858) in the Tagus Estuary, Portugal, based on otolith daily increments and RNA-DNA ratio. *J. Appl. Ichthyol.* 24: 163–169.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506–513.
- Wegner GW, Damm U, Purps M. 2003. Physical influences on the stock dynamics of plaice and sole in the North Sea. *Sci. Mar.* 67: 219–234.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.

Received March 2010,
received in revised form May 2011,
accepted August 2011.

Appendix. Summary statistics^a for all microsatellite loci analyzed in eight natural populations of *Solea senegalensis*.

Apéndice. Resumen de las estadísticas^a para todos los *loci* microsatélites analizados en ocho poblaciones naturales de *Solea senegalensis*.

Locus	Population							
	Lisbon	Portimão	Punta Umbria	Chipiona	Valdelagrana	Río San Pedro	Cádiz Bay	Barbate
Sol 9A								
<i>N</i>	33	28	18	23	19	7	19	29
<i>Na</i>	14	14	11	10	13	5	12	11
<i>Np</i>	1	1	1	0	1	0	1	0
Range	209–262	205–241	209–241	209–237	201–237	209–237	201–259	209–237
<i>Ho</i>	0.879	0.714	0.833	0.826	0.684	0.286	0.947	0.586
<i>He</i>	0.896	0.873	0.781	0.875	0.829	0.802	0.872	0.871
<i>Fis</i>	0.020	0.184	–0.069	0.057	0.179	0.662*	–0.089	0.331**
Smax-02								
<i>N</i>	33	30	35	24	28	40	21	26
<i>Na</i>	14	14	12	13	13	10	16	10
<i>Np</i>	1	1	1	0	2	0	3	0
Range	86–124	86–118	86–132	81–116	86–126	86–114	81–125	86–116
<i>Ho</i>	0.848	0.867	0.600	0.708	0.786	0.600	0.809	0.808
<i>He</i>	0.847	0.867	0.860	0.892	0.866	0.771	0.827	0.744
<i>Fis</i>	–0.002	0	0.306***	0.209*	0.095	0.224***	0.022	–0.088
Sol 13D								
<i>N</i>	33	31	36	26	29	48	21	28
<i>Na</i>	15	13	14	13	14	13	14	9
<i>Np</i>	0	0	2	0	0	0	0	0
Range	122–158	122–146	122–158	116–148	116–146	122–148	116–146	126–144
<i>Ho</i>	0.818	0.903	0.861	0.808	0.897	0.854	0.905	0.929
<i>He</i>	0.912	0.904	0.885	0.894	0.900	0.871	0.911	0.856
<i>Fis</i>	0.104	0.001	0.027	0.098	0.004	0.019	0.007	–0.087
Sol 19A								
<i>N</i>	33	31	39	25	29	37	21	29
<i>Na</i>	6	5	7	6	6	6	6	5
<i>Np</i>	0	0	1	1	0	0	1	0
Range	133–147	133–143	133–147	133–143	133–147	133–147	133–149	133–143
<i>Ho</i>	0.758	0.806	0.769	0.640	0.897	0.865	0.571	0.724
<i>He</i>	0.676	0.711	0.765	0.735	0.722	0.784	0.674	0.700
<i>Fis</i>	–0.122	–0.137	–0.005	0.131	–0.101	–0.105	0.155	–0.035
Sol MIJ								
<i>N</i>	31	28	23	23	22	15	21	29
<i>Na</i>	29	27	23	24	23	11	24	28
<i>Np</i>	1	2	4	8	1	1	3	4
Range	228–306	220–306	228–302	223–306	228–301	237–290	222–334	223–294
<i>Ho</i>	0.839	0.964	0.783	0.783	0.727	0.667	0.952	0.931
<i>He</i>	0.948	0.927	0.955	0.949	0.941	0.890	0.958	0.949
<i>Fis</i>	0.117	–0.041	0.184***	0.178*	0.231**	0.257*	0.006	0.019

(Continued)

Locus	Population							
	Lisbon	Portimão	Punta Umbria	Chipiona	Valdelagrana	Río San Pedro	Cádiz Bay	Barbate
F13-II8/4/7								
<i>N</i>	32	30	22	26	21	17	20	29
<i>Na</i>	21	18	14	17	13	11	13	18
<i>Np</i>	2	2	0	6	1	0	1	2
Range	206–270	206–270	206–270	170–310	206–270	210–270	180–270	180–304
<i>Ho</i>	0.750	0.900	0.773	0.923	0.714	0.706	0.850	0.862
<i>He</i>	0.919	0.915	0.912	0.903	0.898	0.877	0.901	0.909
<i>Fis</i>	0.186*	0.016	0.156	-0.022	0.208*	0.200*	0.058	0.052
Sol GA12								
<i>N</i>	33	31	37	26	29	37	21	30
<i>Na</i>	29	22	22	25	19	23	19	28
<i>Np</i>	2	2	1	3	1	0	1	2
Range	83–157	83–153	83–150	76–150	72–148	72–150	80–148	78–190
<i>Ho</i>	0.758	0.839	0.757	0.808	0.828	0.676	0.809	0.900
<i>He</i>	0.925	0.920	0.921	0.936	0.900	0.880	0.915	0.947
<i>Fis</i>	0.183***	0.090	0.235	0.139*	0.081	0.181***	0.118***	0.050
Sol MII								
<i>N</i>	33	29	31	26	29	30	20	29
<i>Na</i>	9	13	10	12	9	9	9	12
<i>Np</i>	0	2	0	2	0	0	0	2
Range	146–173	146–185	146–173	133–179	146–173	146–173	146–167	146–187
<i>Ho</i>	0.848	0.793	0.839	0.961	0.897	0.800	0.850	0.897
<i>He</i>	0.856	0.875	0.872	0.897	0.861	0.818	0.859	0.866
<i>Fis</i>	0.009	0.095	0.039	-0.073	-0.041	0.022	0.011	-0.036**
Sse 38								
<i>N</i>	32	30	37	26	29	44	20	29
<i>Na</i>	16	19	15	22	14	13	15	13
<i>Np</i>	0	1	0	2	1	0	1	0
Range	134–230	134–234	138–238	130–234	138–250	138–234	134–234	138–238
<i>Ho</i>	0.781	0.933	0.811	0.846	0.724	0.614	0.800	0.897
<i>He</i>	0.863	0.895	0.811	0.931	0.834	0.801	0.895	0.840
<i>Fis</i>	0.096	-0.044	0.000	0.092	0.134	0.236***	0.109*	-0.069

^a *N*: number of individuals analyzed; *Na*: number of alleles; *Np*: number of private alleles; Range: range of allele size in base pairs; *Ho*: observed heterozygosity; *He*: expected heterozygosity; *Fis*: deviation of Hardy-Weinberg equilibrium per locus. Probability values (*P*) of *Fis* significance calculated per locus and population: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001.