

Esclarecimiento de relaciones de parentesco en *Salmo salar* L., 1758 utilizando *loci* microsatélites

Y. Borrell^{1,2}, E. Vázquez¹, J. A. Sánchez Prado¹ y G. Blanco¹

¹ Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. Julián Clavería, s/n. E-33006 Oviedo (Asturias), España. Correo electrónico: gbl@correo.uniovi.es

² Departamento de Bioquímica. Universidad de la Habana. Calle 25 entre J e I. # 455. Vedado. Plaza. Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

En este trabajo se analiza la capacidad de siete *loci* microsatélites para establecer relaciones de parentesco entre individuos en muestras de salmón atlántico *Salmo salar* L., 1758. Para ello, se han utilizado 105 individuos procedentes de 21 familias creadas por cruzamientos individuales entre reproductores pertenecientes a los ríos asturianos Narcea, Cares y Sella. Aunque sólo dos de los *loci* analizados (SSOSL311 y SSOSL417) presentan altos niveles de variabilidad en estas muestras ($H_e > 0,7$), en conjunto permiten asignar correctamente a ambos parentales al menos al 80 % de los descendientes. Las distribuciones de los coeficientes de relación genética (R) entre hermanos completos y no relacionados exhiben medias cercanas a las esperadas teóricamente ($R = 0,5$ y $R = 0$, respectivamente) y solamente el 4 % (en el río Narcea), el 6 % (en el Sella) y el 12,5 % (en el Cares) de las comparaciones entre hermanos completos muestran valores de R menores que cero.

Palabras clave: Paternidades, conservación, acuicultura, genética.

ABSTRACT

Parentage studies in Salmo salar L., 1758 using microsatellites

Seven microsatellite loci were examined to assess their usefulness in parentage studies of *Salmo salar* L., 1758, using 105 offspring from 21 families of salmon proceeding from the Cares, Sella and Narcea Rivers in Asturias (northwestern Spain). Although we found that only the SSOSL311 and SSOSL417 loci had high levels of variability ($H_e > 0.7$), the entire set of loci enabled us to correctly assign both parents for at least 80 % of all samples. Full siblings and non-related individuals presented means of relatedness coefficients close to those theoretically expected for each group of individuals ($R = 0.5$, and $R = 0$, respectively), and pairs of full sibling individuals with R values of less than zero were only 4 % (Narcea), 6 % (Sella) and 12.5 % (Cares) of the samples.

Keywords: Relatedness, paternity inferences, conservation, aquaculture, genetics.

INTRODUCCIÓN

El salmón atlántico *Salmo salar* L., 1758 no sólo está afectado por los mismos factores que inciden negativamente sobre otras especies de interés eco-

nómico en ríos y mares, sino que, como otros peces diadromos, plantean problemas específicos de conservación. La destrucción de hábitats como consecuencia de procesos de deforestación, erosión y sedimentación en las cuencas, el uso de pesticidas y

agentes químicos en la agricultura, la introducción de especies exóticas y la competencia con ellas, la contaminación ambiental y, por último, la retención de aguas para la generación de energía eléctrica, son factores que están incidiendo negativamente en la conservación del salmón atlántico, y que hay que sumar a las interferencias en los movimientos migratorios, componente esencial de su ciclo vital y que propicia su explotación en diferentes áreas, con distintas modalidades de pesca y antes de poder reproducirse en el río de origen (Larkin, 1988; McDowall, 1988; Vrijenhoek, 1998).

Los datos de capturas de FAO (FAO, 1998) evidencian un claro descenso del volumen total de capturas en los últimos 15 años. En 1998 se pescaron de 5 178 toneladas de salmón atlántico: el 49 % del total capturado en 1984. En Asturias (región que aporta más del 80 % de las capturas en España), las estadísticas también reflejan una disminución de casi el 50 % de ejemplares capturados en la última década con respecto a la anterior.

Desde organismos como la Organización para la Conservación del Salmón del Atlántico Norte (NASCO) se ha establecido el Principio de Precaución, sustentado en una menor y más racional explotación del recurso mediante la creación y aplicación de normativas sobre la reducción de la temporada de pesca, la limitación de capturas, la selección de tallas capturables para lograr la protección de las hembras de primavera o el fomento de la pesca sin muerte.

La preservación de poblaciones de salmón en peligro ha sido abordada en muchas ocasiones solamente con una política de reproducción asistida y, excepcionalmente, con una verdadera recuperación del entorno en el que vive la especie. El objetivo ha sido preservar o reintroducir salmones en aquellas zonas donde ya han desaparecido o su número es escaso, dando prioridad sobre cualquier otro tipo de acción a las repoblaciones masivas con individuos procedentes de piscifactorías.

Los estudios genéticos ponen de manifiesto que esta especie tiene poblaciones naturales subestructuradas, diferenciadas genéticamente y más o menos aisladas reproductivamente (Stahl, 1987; Verspoor, 1988; Blanco *et al.*, 1992; Sánchez *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 1996; Ramos, 1998). La diferenciación genética entre ellas aumenta, además, con la distancia geográfica (Blanco *et al.*, 1992). Las adaptaciones locales que revelan estos estudios son una importante característica que contribuye a la

diversidad genética y, también, a la estabilidad y persistencia de poblaciones autóctonas, y que aun no ha sido suficientemente valorada en los programas de gestión, pese a la insistencia de genetistas y biólogos.

Ante la limitada utilización de las enzimas como herramienta genética en selección asistida por marcadores moleculares (MAS) y en el manejo de poblaciones en cultivo debido a su baja variabilidad (Cross y Ward, 1980; Stahl, 1987; Davidson, Birt y Green, 1989; Blanco *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 1991), se han requerido métodos alternativos para ser utilizados al abordar estos objetivos. Hoy ya se han desarrollado marcadores moleculares de ADN (RFLP, minisatélites, RAPD, microsatélites, SNP's y otros) y cada uno posee, potencialmente, la ventaja sobre las enzimas de presentar una mayor variabilidad.

Los marcadores microsatélites consisten en secuencias cortas de repeticiones en tándem de entre uno y seis nucleótidos, flanqueados por regiones únicas de ADN y distribuidos ampliamente por todo el genoma (Tautz, 1989). Los *loci* microsatélites, son codominantes y con herencia mendeliana, lo cual es una ventaja sobre otros marcadores de ADN que son dominantes, como los RAPDS; además, se pueden amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo que permite trabajar con cantidades mínimas de tejido evitando muestreos lesivos en los individuos, trabajar con colecciones de escamas e, incluso, con ejemplares depositados en museos (Nielsen, Hansen y Loeschcke, 1997 y 1999).

La alta variabilidad de los *loci* microsatélites permite realizar estudios individualizados, con la posibilidad de encontrar combinaciones genotípicas únicas para cada individuo y familia con muy pocos *loci* (Estoup y Anger, 1998). Este hecho ha potenciado en los últimos años los estudios que utilizan *loci* microsatélites para esclarecer estrategias reproductivas de las especies, estimar números efectivos de poblaciones y sus fluctuaciones en el tiempo y determinar relaciones genéticas entre individuos con origen desconocido en poblaciones naturales y en cultivo, entre otros objetivos (Parker y Kornfield, 1996; Jones y Avise, 1997; Palsboll, Allen y Berude, 1997; García de León *et al.*, 1998; Estoup *et al.*, 1998; Pérez Enríquez, Takagi y Taniguchi, 1999; Norris, Bradley y Cunningham, 2000).

La aplicación de estas herramientas genéticas permitiría potenciar programas de mejora genética

mediante el esclarecimiento de pedigríes para mejorar el rendimiento en poblaciones de cultivo (control de endogamia, identificación de parentales en cultivos en marcha, cálculos de heredabilidad...), o valorar y gestionar las poblaciones naturales (cálculos de números efectivos de reproductores, identificación de subpoblaciones y migraciones, entre otros). Este tipo de estudios podrían ayudar, también, a esclarecer problemáticas como la de los niveles de endogamia que han alcanzado las poblaciones naturales en zonas límites de distribución, como es el caso de Asturias, para explicar la dificultad de recuperación de estas poblaciones pese a los esfuerzos proteccionistas de las últimas décadas.

En este trabajo se analiza, concretamente, la capacidad de siete *loci* microsatélites utilizados habitualmente en nuestro laboratorio en los análisis de poblaciones de salmón atlántico (Ramos, 1998; Pineda *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2000) para su utilización en estudios de parentesco en los salmones de los ríos asturianos Cares, Sella y Narcea.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron individuos adultos que retornan a los ríos asturianos (norte de España) Narcea (5 machos y 5 hembras), Sella (7 machos y 7 hembras) y Cares (9 machos y 5 hembras). Estos individuos fueron transferidos a una estación experimental y se obtuvieron 5 (Narcea), 7 (Sella) y 9 (Cares) familias de hermanos completos que se mantuvieron en estanques separados.

El ADN se extrajo utilizando la resina Chelex® 100 (Walsh, Metzger e Higuchi, 1991) en los 38 reproductores (tejido de la aleta adiposa colectados en etanol 100 % y conservados a 4 °C) y en los 105 descendientes (aproximadamente 6 huevos fertilizados o alevines vesiculados de cada familia).

PCR. Condiciones de amplificación y electroforesis

Se analizaron siete *loci* microsatélites: SsaF43, Ssa20-19, Ssa13-37 (Sánchez *et al.*, 1996), SSOSL1.14, SSOSL311, SSOSL417 (Slettan,

Olsaker y Lie, 1993, 1995), y Str15 (Presa y Guyomard, 1996). Los *loci* microsatélites se amplificaron mediante PCR siguiendo las condiciones de los trabajos donde han sido utilizados. Los productos de la amplificación fueron separados en geles de poliacrilamida desnaturalizante (6 %). El revelado de los geles se realizó con tinción de plata (Promega Silver Sequence® DNA Staining).

Procesamiento de los datos

Se utilizaron dos paquetes informáticos desarrollados para estudios de parentesco: Relatedness versión 5.0.6, a partir de Queller y Goodnight (1989) y Cervus versión 1.0 (Marshall *et al.*, 1998).

El programa Cervus, diseñado para marcadores codominantes, calcula las frecuencias alélicas, los contenidos de información polimórfica (PIC) y el poder de exclusión de los *loci* (EXC) (probabilidad de que un adulto escogido al azar sea excluido como parental de un descendiente (Chakraborty, Meagher y Smouse, 1988)) utilizando solamente los genotipos de los individuos; posteriormente realiza simulaciones de asignaciones de paternidad mediante procedimientos de máxima probabilidad a parentales generados a partir de esas frecuencias alélicas. El usuario escoge el número de ciclos y el número de parentales candidatos para las asignaciones durante la simulación. En una tercera etapa se resuelven las paternidades con la determinación de parental o parentales más probables (mayor LOD) dentro del conjunto de posibles reproductores. El programa tiene en cuenta errores de asignación de genotipo y las simulaciones pueden ser utilizadas, también, a partir de datos reales o imaginarios de frecuencias alélicas, para estimar, a partir de la variabilidad de un grupo de marcadores moleculares, la posible utilidad de éstos en el análisis de parentesco.

En este trabajo se ensayó la utilidad de los *loci* seleccionados para la asignación correcta de los descendientes de cada población analizada a sus parentales.

Relatedness 5.0.6 (Queller y Goodnight, 1989) calcula el promedio de relación genética (R) entre individuos o grupos de individuos definidos por variables demográficas. El programa estima errores estándar e intervalos de confianza utilizando un procedimiento de remuestreo *jackknife* por *locus*, familias u otros. La fórmula básica para los cálculos es

$$R = \frac{\sum_x \sum_k \sum_l (P_y - P^*)}{\sum_x \sum_k \sum_l (P_x - P^*)}$$

donde x son los individuos, k los *loci* y l las posiciones alélicas (l = 1 para individuos haploides ó l = 2 para individuos diploides).

Entre las variables, P_x es la frecuencia encontrada en el individuo x, *locus* k y posición alélica l, y en un individuo diploide debe ser 0, 0,5 ó 1,0; P_y es la frecuencia del mismo alelo en el grupo de individuos con el que se compara x (aquellos con respecto a los que se quiere medir la relación genética); P^* es la frecuencia de ese alelo en toda la población, excluyendo a todos los posibles parientes de x (corrección de sesgo, cuando es aplicable).

Teóricamente, el valor de R entre individuos o grupos de individuos que comparten ambos parentales (hermanos completos) debe ser como mínimo $R = 0,5$, mientras que los medio-hermanos que sólo comparten el 25 % de su genoma, deben exhibir, como mínimo, el valor $R = 0,25$ (Queller y Goodnight, 1989).

Este programa fue utilizado para evaluar la eficiencia de nuestros *loci* en los análisis de parentesco entre individuos con origen desconocido a partir de la valoración de los coeficientes de relación genética que se obtienen cuando (a): se analizan individuos emparentados (hermanos completos); (b) se analizan individuos no emparentados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se ha investigado la utilidad en los análisis de parentesco de 7 *loci* microsatélites que actualmente se utilizan en genética de poblaciones de salmón atlántico y de los que se dispone de un gran número de datos previos (Ramos, 1998; Pineda *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2000), información que resultaría muy valiosa de confirmarse la eficacia del análisis.

Variabilidad genética

En este estudio, el nivel de variabilidad de los *loci* estudiados en las tres poblaciones se divide en dos grupos bien diferenciados: *loci* con variabilidad baja o media ($H_e > 0,700$) (Str15, Ssa13-37, SSOSL1.14, Ssa20-19, y SsaF43) y *loci* con variabili-

dad alta ($H_e > 0,700$) (SSOSL311 y SSOSL417) (tabla Ia,b,c). Los niveles medios por población del número medio de alelos por *locus* (N_a) y contenidos de información polimórfica, además de heterocigosidades observadas (H_o) y esperadas (H_e), también se muestran en la tabla I.

Ramos (1998), utilizando 3 *loci* microsatélites (SsaD30, Ssa20-19 y SsaF43) describió la variabilidad genética en muestras de las tres poblaciones estudiadas en este trabajo (Narcea: $H_e = 0,408$; Sella: $H_e = 0,450$; Cares: $H_e = 0,389$). Pineda *et al.* (1999) utilizaron, además, los *loci* Str15 y Ssa13-37 y analizaron dos muestras del río Sella (años 1993 y 1994) encontrando heterocigosidades medias, respectivamente, de $H_o = 0,395$ y $H_o = 0,382$. Estos mismos *loci*, en su conjunto, permiten una correcta identificación a nivel continental de individuos procedentes de poblaciones de salmón atlántico (poblaciones europeas y americanas) e, incluso, aunque con niveles de eficiencia inferiores, de asignaciones correctas de los individuos a zonas geográficas cercanas a su origen dentro de cada uno de los continentes (Sánchez *et al.*, 2000). En estos estudios los valores de variabilidad, pese a ser superiores a los encontrados anteriormente con enzimas, no alcanzaron, sin embargo, los teóricamente planteados como necesarios ($H_e > 0,700$) para los estudios de parentesco (Blouin *et al.*, 1996). En este trabajo, aunque los nuevos *loci* utilizados (SSOSL311 y SSOSL417) presentan altos niveles de variabilidad y contribuyen sustancialmente a un aumento general de la misma en las poblaciones en estudio, la variabilidad genética media encontrada tampoco alcanza valores suficientemente altos para este tipo de estudios en ninguna de las poblaciones (tabla Ia,b,c).

Asignación de individuos a sus parentales

La asignación correcta a parentales depende del nivel de variación genética existente en las poblaciones en estudio, factor que determina la probabilidad de exclusión, es decir, que un adulto escogido al azar sea excluido como parental de un descendiente. La probabilidad de exclusión aumenta con el número de *loci* ensayados, el número de alelos por *locus* y las frecuencias alélicas en los *loci* (Chakraborty, Meagher y Smouse, 1988).

García de León *et al.* (1998), utilizando sólo dos *loci* microsatélites, asignaron correctamente a sus

Tabla I. Resumen de estadísticos para la inferencia de paternidades de 7 loci microsatélites estudiados en familias de salmón atlántico. (a): río Narcea (10 reproductores, 5 familias de hermanos completos, 30 descendientes); (b): río Cares (14 reproductores, 9 familias de hermanos completos, 34 descendientes); (c): río Sella (14 reproductores, 7 familias de hermanos completos, 41 descendientes).

| (a): río Narcea | | | | | |
|---|----|----------------|-------|--------|--------|
| Locus | Na | H _e | PIC | EXC(1) | EXC(2) |
| Str15 | 2 | 0,096 | 0,090 | 0,005 | 0,045 |
| Ssa13-37 | 2 | 0,505 | 0,374 | 0,124 | 0,187 |
| Ssa20-19 | 3 | 0,630 | 0,551 | 0,194 | 0,339 |
| SsaF43 | 5 | 0,458 | 0,429 | 0,112 | 0,270 |
| SSOSL1.14 | 3 | 0,590 | 0,493 | 0,169 | 0,289 |
| SSOSL311 | 6 | 0,762 | 0,719 | 0,363 | 0,544 |
| SSOSL417 | 8 | 0,795 | 0,762 | 0,425 | 0,606 |
| Media N. ^o de alelos por locus Na | | | 4,14 | | |
| Media heterocigosidad observada (H ₀) | | | 0,580 | | |
| Media heterocigosidad esperada (H _e) | | | 0,548 | | |
| Media contenido información polimórfica (PIC) | | | 0,489 | | |
| Poder exclusión (sin parentales conocidos) (EXC(1)) | | | 0,810 | | |
| Poder exclusión (1 parental conocido) (EXC(2)) | | | 0,952 | | |
| (b): río Cares | | | | | |
| Locus | Na | H _e | PIC | EXC(1) | EXC(2) |
| Str15 | 2 | 0,172 | 0,155 | 0,014 | 0,078 |
| Ssa13-37 | 2 | 0,399 | 0,317 | 0,078 | 0,158 |
| Ssa20-19 | 4 | 0,608 | 0,559 | 0,199 | 0,370 |
| SsaF43 | 3 | 0,634 | 0,550 | 0,197 | 0,336 |
| SSOSL1.14 | 5 | 0,604 | 0,553 | 0,198 | 0,365 |
| SSOSL311 | 10 | 0,822 | 0,795 | 0,478 | 0,653 |
| SSOSL417 | 8 | 0,803 | 0,764 | 0,420 | 0,597 |
| Media N. ^o de alelos por locus Na | | | 4,86 | | |
| Media heterocigosidad observada (H ₀) | | | 0,556 | | |
| Media heterocigosidad esperada (H _e) | | | 0,577 | | |
| Media contenido información polimórfica (PIC) | | | 0,528 | | |
| Poder exclusión (sin parentales conocidos) (EXC(1)) | | | 0,858 | | |
| Poder exclusión (1 parental conocido) (EXC(2)) | | | 0,971 | | |
| (c): río Sella | | | | | |
| Locus | Na | H _e | PIC | EXC(1) | EXC(2) |
| Str15 | 1 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Ssa13-37 | 2 | 0,400 | 0,318 | 0,079 | 0,159 |
| Ssa20-19 | 4 | 0,536 | 0,495 | 0,152 | 0,316 |
| SsaF43 | 5 | 0,677 | 0,619 | 0,255 | 0,422 |
| SSOSL1.14 | 2 | 0,251 | 0,218 | 0,031 | 0,109 |
| SSOSL311 | 10 | 0,808 | 0,777 | 0,451 | 0,626 |
| SSOSL417 | 9 | 0,809 | 0,782 | 0,456 | 0,634 |
| Media N. ^o de alelos por locus Na | | | 4,71 | | |
| Media heterocigosidad observada (H ₀) | | | 0,509 | | |
| Media heterocigosidad esperada (H _e) | | | 0,497 | | |
| Media contenido información polimórfica (PIC) | | | 0,458 | | |
| Poder exclusión (sin parentales conocidos) (EXC(1)) | | | 0,831 | | |
| Poder exclusión (1 parental conocido) (EXC(2)) | | | 0,959 | | |

parentales a 300 individuos de lubina *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) y demostraron la utilidad de los microsatélites en los programas de selección basa-

dos en familias en las que los descendientes son cultivados en los mismos estanques. Pérez Enríquez, Takagi y Taniguchi (1999) utilizaron 4 loci

microsatélites muy variables ($H_e = 0,86$) en *Pagrus major* (Temminck y Schlegel, 1843) y lograron aclarar el pedigrí de más del 73 % de la progenie de 91 reproductores. Norris, Bradley y Cunningham (2000) utilizaron 8 *loci* microsatélites muy variables ($H_e = 0,85$) de un total de 15 *loci* en estudio en *Salmo salar* y lograron una asignación correcta de un 98 % de los descendientes a más de 100 parentales en 10 familias de hermanos completos.

En este trabajo, a pesar de los niveles de variabilidad con los que se ha trabajado (tabla Ia,b,c), los poderes de exclusión (EXC) del conjunto de *loci* en la asignación a parentales calculados con el programa Cervus 1.0, predicen, en todas las poblaciones, niveles por encima del 80 % de asignaciones correctas cuando se desconocen ambos parentales (EXC(1)), y por encima del 95 % en caso de conocer alguno de ellos (EXC(2)). En nuestro caso, y en correspondencia con lo anterior, las asignaciones correctas a ambos padres de los descendientes, alcanzaron, en todas las poblaciones, al menos el 80 % (tabla II).

En el Cares se obtienen valores de asignación correcta a ambos parentales ligeramente inferiores a los encontrados en las poblaciones del Sella y el Narcea (tabla II). En esta población no fue posible analizar el mismo número de descendientes en todas las familias estudiadas y, en general, se analizaron menos individuos por familia que en las otras dos poblaciones; sin embargo, resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (5 *loci* microsatélites: SsaF43, Ssa20-19, Ssa13-37, SSOSL1.14, y Str15), no reportaron diferencias significativas, en cuanto a la asignación correcta a parentales y el comportamiento de los coeficientes de relación genética, al utilizar 20 o 6 individuos por familia en un estudio con las poblaciones del Sella y del Cares (datos no publicados). El menor grado de asignación obtenido en esta última población parece responder a

que, a pesar de que en ella se esperan mayores valores de heterocigosidad (H_e), que son la base sobre la que se calculan los niveles de exclusión de los *loci* y los PIC, es precisamente en la que se encuentra menor heterocigosidad (H_o) (tabla I).

Cuando solamente se utilizan los *loci* con H_e mayores de 0,700 (SSOSL311 y SSOSL417) los resultados reflejan que estos dos *loci* son los principales responsables de las asignaciones correctas a ambos parentales en las poblaciones, aunque ellos, por sí solos, no pueden resolver satisfactoriamente las asignaciones en ningún caso (tablas II y III).

Marshall *et al.* (1998) han demostrado que, mientras los niveles de exclusión pueden ser un buen punto de partida en este tipo de estudios, a medida que aumenta el número de posibles padres candidatos, aumenta, también dentro de ese conjunto, el número de individuos que no pueden ser excluidos por su parecido genético con los padres verdaderos. Ante esa situación, el programa Cervus 1.0 aporta rutinas de simulación (cuantos ciclos quiera el usuario) de asignación de paternidades, fijando el número de padres candidatos (que se generan a partir de las frecuencias génicas de la población en estudio) y sus descendientes (también creados en la simulación) y evaluando entonces si las asignaciones entre todos los padres candidatos son, o no, correctas. Este procedimiento permite predecir con mayor certeza en situaciones con un número elevado de potenciales padres a elegir (por ejemplo, reproductores de una población natural, un stock grande de reproductores de una piscifactoría u otros) si los *loci* utilizados son, o no, útiles para las inferencias de paternidad. En nuestro caso, utilizando las frecuencias génicas de los siete *loci* microsatélites del río Sella (los mejores resultados en la asignación a parentales en este estudio) y asumiendo ahora un número teórico de padres candidatos de 100 individuos, sólo se obtiene

Tabla II. Porcentajes de asignación de descendientes a sus verdaderos parentales utilizando 7 *loci* microsatélites en salmón atlántico.

| | Narcea | Sella | Cares |
|--|--------|-------|-------|
| Ambos parentales asignados correctamente | 83,3 | 85,3 | 79,4 |
| Sólo un parental asignado correctamente | 10,0 | 4,8 | 2,9 |
| Asignación incorrecta a ambos parentales | 0 | 2,4 | 2,9 |
| No asignación | 6,6 | 7,3 | 14,7 |

Tabla III. Porcentajes de asignación de descendientes a sus verdaderos parentales utilizando sólo 2 *loci* microsatélites ($H_e > 0,700$) en salmón atlántico.

| | Narcea | Sella | Cares |
|--|--------|-------|-------|
| Ambos parentales asignados correctamente | 33,3 | 56,0 | 50,0 |
| Sólo un parental asignado correctamente | 20,0 | 9,7 | 5,8 |
| Asignación incorrecta a ambos parentales | 0 | 0 | 8,8 |
| No asignación | 46,6 | 34,1 | 35,2 |

el 32 % y el 55 % de asignación correcta en las simulaciones llevadas a cabo en situaciones de ninguno o algún parental conocido (10 000 ciclos de asignación). Estos resultados apuntan a la necesidad de trabajar con un número mayor de *loci* que posean alta variabilidad (por ejemplo, SSOSL311 y SSOSL417) para aplicar eficientemente los microsatélites en los estudios de parentesco y contribuir, así, al manejo del salmón en piscifactorías.

Relaciones genéticas entre individuos

El análisis de los coeficientes de relación genética (R) entre individuos, en función del tipo de parentesco que existe entre ellos, permitiría validar estos coeficientes para su utilización al evaluar el grado de parentesco entre individuos con origen desconocido (Norris, Bradey y Cunningham, 2000). De esta forma, llevando a cabo una evaluación previa de los marcadores microsatélites, se podrían establecer puntos de corte (rangos reales, y no teóricos, de R para esos *loci* asociados a probabilidades de acierto) con respecto a los cuales clasificar a individuos de origen desconocido como posibles hermanos completos, medio-hermanos o individuos no relacionados.

En este trabajo, las medias de los coeficientes de relación genética entre los individuos no relacionados que se han hallado son: $R_m = -0,07$ en el Narcea, $R_m = -0,08$ en el Sella y $R_m = -0,10$ en el Cares, ajustándose a lo esperado para este tipo de individuos. La distribución de los coeficientes de relación genética entre individuos que son hermanos completos también tiene medias cercanas a las esperadas teóricamente (Narcea: $R_m = +0,48$; Sella: $R_m = +0,47$; Cares: $R_m = +0,37$) (figura 1). La distribución de los coeficientes (R) entre individuos con ambos tipo de parentesco abarcan todos los valores posibles ($-1 \leq R \leq 1$), sin embargo, por debajo del valor $R = 0$ sólo se encuentran el 4 % (Narcea), el 6 % (Sella) y el 12,5 % (Cares) de las comparaciones entre individuos hermanos completos (tabla IV). Este tipo de distribución sugiere límites o rangos de R (por ejemplo, $R < 0$) en los que con más del 90 % de certeza no encontraríamos individuos hermanos completos en las poblaciones del Sella y del Narcea. Tomando como valores de corte los valores medios de R de los individuos no relacionados de cada población (en lugar del valor $R = 0$), el porcentaje de individuos

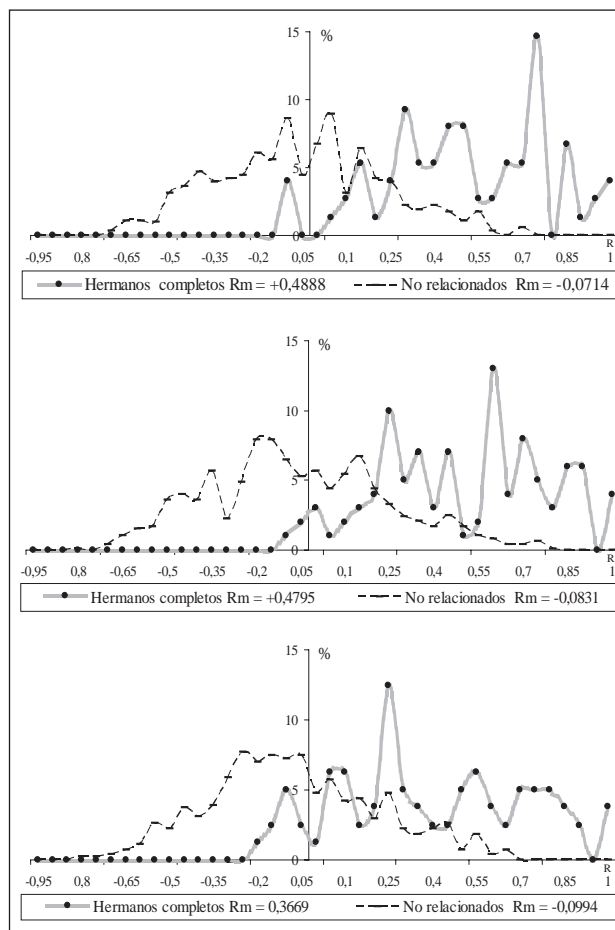


Figura 1. Distribución de coeficientes de relación genética utilizando 7 *loci* microsatélites en salmón atlántico. (a): Narcea; (b): Sella; (c): Cares.

hermanos completos erróneamente clasificados como no relacionados, lógicamente, disminuye (tabla IV).

La utilización exclusiva de aquellos *loci* con valores H_e mayores que 0,700 (SSOSL311 y SSOSL417) revela resultados considerablemente inferiores en cuanto al porcentaje de hermanos completos que

Tabla IV. Porcentajes de coeficientes de relación genética R entre pares de individuos (7 *loci* microsatélites) que se clasificarían como no relacionados en cada clase de parentesco estudiada en salmón atlántico cuando se utiliza: (a): valor de corte $R = 0$; (b): valor de corte $R = R_{media}$ de los ejemplares no relacionados.

| (a) | Narcea | Sella | Cares |
|--------------------|--------|-------|-------|
| Hermanos completos | 14,7 | 7 | 20,7 |
| No relacionados | 60,6 | 66,4 | 59,4 |
| (b) | Narcea | Sella | Cares |
| Hermanos completos | 14,7 | 0 | 23,2 |
| No relacionados | 43,3 | 42,1 | 33,8 |

serían erróneamente clasificados como no relacionados (tabla V).

Nuestros resultados apuntan a que dos individuos de los que se conoce el genotipo para estos siete loci microsatélites y con coeficientes de relación genética entre ellos menores que $R = 0$, tendrán una alta probabilidad de, al menos, no ser hermanos completos y, por tanto, podrían ser utilizados como posible pareja dentro de un stock de reproductores. Es necesario evaluar, además del comportamiento de los coeficientes de relación genética entre hermanos completos, qué sucede cuando se analizan individuos medio-hermanos o con otras relaciones de parentesco, para aseverar con cierta consistencia que dos individuos tampoco están emparentados a otro nivel.

Este tipo de estudios ayudarán en la selección de salmones adultos salvajes no relacionados para utilizarlos como reproductores en las piscifactorías o en la selección de esguines colectados en las zonas bajas de los ríos, y no relacionados, para su posterior cultivo en el mar, evitando, de esta forma, procesos endogámicos altamente perjudiciales. De hecho, algunos programas de suplementación de salmones en la naturaleza, pueden, sin saberlo, estar utilizando animales muy emparentados o cantidades insuficientes de reproductores, y pueden ya estar afectando de forma muy negativa a las poblaciones naturales debido al bajo nivel de variabilidad genética de los individuos liberados (Pérez Enríquez, Takagi y Taniguchi, 1999).

Finalmente, los coeficientes de relación genética también pueden tener aplicación en poblaciones naturales para evaluar cómo evolucionan éstas en cuanto a tamaños efectivos (N_e). El número efectivo de una población, definido como el tamaño de una población ideal que puede explicar

el aumento de la varianza de cambio de las frecuencias génicas, y la tasa de endogamia observadas en la población actual (Caballero, 1994) requieren estimaciones de factores demográficos y conductuales que raramente son conocidos para las poblaciones naturales de peces (Estoup y Anger, 1998). La disminución de N_e aumenta la endogamia dentro de una población y, por tanto, las relaciones de parentesco entre los individuos que la componen (reflejadas en los coeficientes de relación genética entre ellos). Partiendo de ese criterio, sería interesante evaluar la evolución de R a lo largo del tiempo en muestreos sucesivos de las poblaciones naturales de salmón atlántico.

A partir de los datos de Pineda *et al.* (1999) llevamos a cabo una comparación de los coeficientes de relación genética entre dos muestras de individuos que retornaron para reproducirse en el río Sella en los años 1993 (44 individuos) y 1994 (46 individuos) analizados con los loci Str15, Ssa13-37, SsaD30, Ssa20-19, y SsaF43. Las medias de los coeficientes de relación genética de las muestras del Sella son menores para la muestra del año 1993 ($R_m = -0,17$) que la del año 1994 ($R_m = -0,04$) (figuras 2 y 3), resultado que concuerda con una disminución de la heterocigidad en los loci microsa-

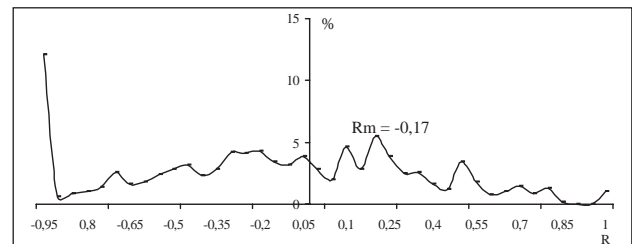


Figura 2. Coeficientes de relación genética entre 44 individuos procedentes de un muestreo en el río Sella en el año 1993 utilizando 5 loci microsatélites (Str15, Ssa13-37, SsaD30, Ssa20-19, y SsaF43) (datos de Pineda *et al.*, 1999).

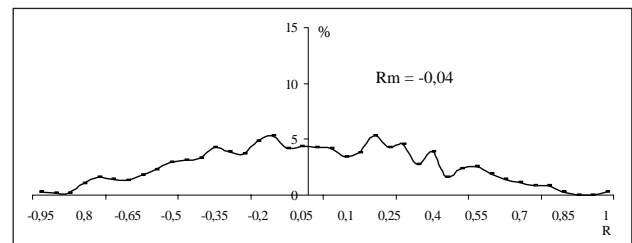


Figura 3. Coeficientes de relación genética entre 46 individuos procedentes de un muestreo en el río Sella en el año 1994 utilizando 5 loci microsatélites (Str15, Ssa13-37, SsaD30, Ssa20-19, y SsaF43) (datos de Pineda *et al.*, 1999).

Tabla V. Porcentajes de coeficientes de relación genética R entre pares de individuos (2 loci microsatélites ($H_e > 0,700$)) que se clasificarían como no relacionados en cada clase de parentesco estudiada en salmón atlántico cuando se utiliza: (a): valor de corte $R = 0$; (b) valor de corte $R = R_{media}$ de los ejemplares no relacionados.

| (a) | Narcea | Sella | Cares |
|--------------------|--------|-------|-------|
| Hermanos completos | 4 | 6 | 12,5 |
| No relacionados | 59,7 | 62,1 | 65,8 |
| (b) | Narcea | Sella | Cares |
| Hermanos completos | 4 | 2 | 8,8 |
| No relacionados | 50,3 | 47,2 | 47,8 |

télites encontrada en ese estudio: Sella, 1993 ($H_o = 0,395$) y Sella, 1994 ($H_o = 0,382$) (Pineda *et al.*, 1999) y quizás con un aumento de la endogamia en esta población.

El seguimiento de los coeficientes de relación genética entre muestras de salmónes de poblaciones naturales en diferentes años podría ayudar a esclarecer problemáticas como la implicación de las causas genéticas en la dificultad de recuperación de las poblaciones asturianas de salmón pese a los esfuerzos proteccionistas de las últimas décadas, y, en general, constituiría un complemento en el estudio de los cambios en niveles de variabilidad genética de las poblaciones naturales y sus consecuencias para la conservación de las especies.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al Servicio de Recursos Naturales y Protección Ambiental de la Consejería de Medio Ambiente del Principado de Asturias, que aportó las muestras para este trabajo; a la Agencia Española de Cooperación Iberoamericana (AECI) por la concesión de una beca de doctorado (1998-2001); y a los fondos procedentes de los proyectos UE (96-036) y MEC-UE98-0017.

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, G., J. A. Sánchez, E. Vázquez, E. García y J. Rubio. 1990. Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in *Salmo salar* L. *Aquaculture* 84: 199-209.
- Blanco, G., J. A. Sánchez, E. Vázquez, J. Rubio y F. M. Utter. 1992. Genetic differentiation among natural European populations of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., from drainages of Atlantic Ocean. *Animal Genetics* 23: 11-18.
- Blouin, M. S., M. Parson, V. Lacaillie y S. Lotz. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393-401.
- Caballero, A. 1994. Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* 73: 657-679.
- Chakraborty, R., T. Meagher y P. E. Smouse. 1988. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics* 118: 527-536.
- Cross, T. F. y R. D. Ward. 1980. Protein variation and duplicate loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Genetical Research* 36: 147-165.
- Davidson, W. S., T. P. Birt y J. M. Green. 1989. A review of genetic variation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and its importance for stock identification, enhancement programmes and aquaculture. *Journal of Fish Biology* 34: 547-560.
- Estoup, A. y B. Angers. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. En: *Advances in Molecular Ecology*. G. R. Carvalho (ed.). IOS Press. Amsterdam: 51-86.
- Estoup, A., K. Gharbi, M. San Cristobal, C. Chevalet, P. Haffray y R. Guyomard. 1998. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Canadian Journal of Fish Aquatic Sciences* 55: 715-725.
- FAO. 1998. Capture production 1984-1998. Fishtat Plus. Universal software for fishery statistical time series. <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>
- García de León, F. J., M. Cannonne, E. Quillet, F. Bonhomme y B. Chatain. 1998. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 159: 303-316.
- Jones, A. G. y J. C. Avise. 1997. Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. *Marine Biology* 6: 203-213.
- Larkin, P. A. 1988. Pacific salmon. En: *Fish population dynamics*. J. A. Gulland (ed.). Wiley. Chichester: 153-183.
- Marshall, T. C., J. Slate, L. E. B. Kruuk, y J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7 (5): 639-655.
- McDowall, R. M. 1988. Diadromy in fishes. En: *Migrations between freshwater and marine environments*. Croom Helm. Londres.
- Nielsen, E. E., M. M. Hansen y V. Loeschcke. 1997. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years. *Molecular Ecology* 6: 487-492.
- Nielsen, E. E., M. M. Hansen y V. Loeschcke. 1999. Genetic variation in time and space: Microsatellite analysis of old extinct and extant populations of Atlantic salmon. *Evolution* 53 (1): 261-268.
- Norris, A. T., D. G. Bradley y E. P. Cunningham. 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* 182: 73-83.
- Palsboll, P. J., J. Allen, y M. Berude. 1997. Genetic tagging of humpback whales. *Nature* 388: 767-769.
- Parker, A. e I. Kornfield. 1996. Polygynandry in *Pseudotropheus zebra*, a cichlid fish from lake Malawi. *Environmental Biology of fishes* 47: 345-352.
- Pérez Enríquez, R., M. Takagi y N. Taniguchi. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite markers. *Aquaculture* 173: 413-423.
- Pineda, H., E. Vázquez, G. Blanco, y J. A. Sánchez. 1999. Variabilidad de loci microsatélites en salmón atlántico (*Salmo salar* L.). *Actualidad Biológica* 21: 19-28.
- Presca, P. y R. Guyomard. 1996. Conservation of microsatellites in three species of Salmonids. *Journal of Fish Biology* 49: 1326-1329.

- Queller, D. C. y K. F. Goodnight. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43 (2): 258-275.
- Ramos, M. D. 1998. *Polimorfismo en loci enzimáticos y microsatélites de locus único en salmón atlántico, Salmo salar (L.)*. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. Oviedo, España.
- Sánchez, J. A., G. Blanco, E. Vázquez, E. García y J. Rubio. 1991. Allozyme variation in natural populations of Atlantic salmon in Asturias (northern Spain). *Aquaculture* 93: 291-298.
- Sánchez, J. A., C. Clabby, D. Ramos, G. Blanco, F. Flavin, E. Vázquez y R. Powell. 1996. Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L. (Atlantic salmon). *Heredity* 77: 423-432.
- Sánchez, J. A., M. D. Ramos, H. Pineda, Y. J. Borrell, E. Vázquez y G. Blanco. 2000. The application of genetic variation at microsatellite loci in atlántic salmon (*Salmo salar* L.) stock identification. En: *2000 ICES Annual Science Conference* (27-30 de septiembre, 2000. Brujas, Bélgica). ICES C.M. 2000/Y:06.
- Slettan, A., I. Olsaker y O. Lie. 1993. Isolation and characterization of variable (GT)_n repetitive sequences from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Animal Genetics* 24: 195-197.
- Slettan, A., I. Olsaker y O. Lie. 1995. Atlantic salmon, *Salmo salar* L, microsatellites at the SSOSL311, SSOSL417, SSOSL85, SSOSL25 loci. *Animal Genetics* 26: 277-285.
- Stahl, G. 1987. Genetic population structure of Atlantic salmon. En: *Population Genetics and Fishery Management*. N. Ryman y F. Utter (eds.): 121-140. Universidad de Washintong Press. Seattle.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of single sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Verspoor, E. 1988. Identification of stocks in the Atlantic salmon. En: *Proceeding of the Symposium on future Atlantic salmon management* (Marine Recreational Fisheries Series). R. H. Stroud (ed.): 37-46. Savannah. EE UU.
- Vrijenhoek, R. C. 1998. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of fish Biology* 53 (A): 394-412.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger y R. Higuchi. 1991. Chelex® 100 as a médium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechnics* 10: 506-510.